50376
1975
177

N° D Ordre

50376
1975
177

MÉMOIRE PRÉSENTÉ

A

L UNIVERSITE DES SCIENCES & TECHNIQUES DE LILLE 1

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR DE 3ème CYCLE

Spécialité BIOCHIMIE

par André NOUVELOT

---

# ÉTUDE EXPÉRIMENTALE CHEZ LE MINI-PORC ET LE RAT DU MÉTABOLISME DES ÉMULSIONS LIPIDIQUES ARTIFICIELLES INJECTÉES PAR VOIE INTRAVEINEUSE.

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

PRÉSENTÉ LE SEPTEMBRE 1975 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MEMBRES DU JURY :

M.M. J. MONTREUIL Président

J. JAILLARD Rapporteur

C. SEZILLE } Examinateurs

J. KREMBEL }

Ce travail a été réalisé dans le cadre du Laboratoire de Physiopathologie des Lipides de l'Institut Pasteur sous la direction de Monsieur le Professeur JAILLARD et Monsieur le Docteur SEZILLE.

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, Monsieur le Professeur MONTREUIL, d'avoir bien voulu diriger l'ensemble de notre travail, et accepter la présidence de notre jury et Monsieur le Professeur KREMBEL de nous faire l'honneur d'être parmi nos juges.

Nous tenons à assurer Monsieur le Professeur JAILLARD de toute notre reconnaissance, pour l'accueil chaleureux qu'il nous a toujours réservé en son Laboratoire de Physiopathologie des Lipides, et pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger ce travail.

Nous voulons également témoigner notre profonde gratitude à Monsieur le Docteur SEZILLE, pour la compréhension et la sympathie qu'il n'a cessé de nous prodiguer depuis notre entrée au Laboratoire. Sa rigueur scientifique et son esprit de synthèse sont pour nous un exemple de tous les jours.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur FRUCHART qui a dirigé et guidé nos expériences au sein d'une équipe qu'il anime avec beaucoup d'enthousiasme et de disponibilité . Que ce travail soit le témoignage de notre amicale et profonde gratitude.

Nous sommes heureux de témoigner notre amitié à tous nos collègues de l'Equipe de Recherche du Laboratoire de Physiopathologie des Lipides, en particulier,

Messieurs BUASSA BU TSUMBU, DEWAILLY et ZANDECKI,
Mesdemoiselles CARPENTIER, DECOOPMAN, DESREUMAUX et RAULT,
Mesdames BERNARD, MONSTERLEET, MULLET, PONTHIEU et PORCHET.

Nous remercions, tout particulièrement, Mademoiselle CHABANNE pour sa précieuse collaboration dans la réalisation de ce travail.

# TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION. . . . . 1

A - Historique..... 1

B - Intérêt nutritionnel..... 3

C - Tolérance aux émulsions..... 5

D - Travaux personnels..... 6

PREMIÈRE PARTIE : Rappels métaboliques. . . . . 10

Chap I : Digestion et absorption intestinale des lipides alimentaires..... 11

1 - Action de la lipase pancréatique..... 11

a - Triglycérides à chaines longues..... 11

b - Triglycérides à chaines courtes..... 14

2 - Epuration des chylomicrons..... 19

Chap II : Epuration des émulsions lipidiques artificielles..... 22

1 - Composition des émulsions..... 22

2 - Comparaison physico-chimique des chylomicrons et des particules lipidiques des émulsions..... 27

3 - Etude de la vitesse d'épuration des différentes émulsions..... 29

Pages

DEUXIÈME PARTIE : Protocole expérimental. . . . . 33

Chap I : Expérimentation animale..... 34

1 - Animaux utilisés..... 34

2 - Nutrition parentérale complète..... 38

3 - Dosages effectués en cours d'expérimentation..... 41

a - Taux de bilirubine..... 46

b - Les transaminases..... 47

c - Numération globulaire..... 48

Chap II : Méthodes d'analyse..... 49

1 - Extraction des lipides..... 49

2 - Dosage des triglycérides et du cholestérol..... 50

3 - Séparation des lipides en classes par chromatographie sur couche mince de gel de silice..... 50

a - Les lipides neutres..... 51

b - Les phospholipides..... 51

α - Séparation monodimentionnelle. 51

β - Séparation bidimentionnelle... 53

4 - Dosage des phospholipides..... 59

5 - Analyse des Acides gras constitutifs des différentes classes lipidiques..... 64

Pages

a - Préparation des esters méthyliques... 64

α - Saponification-méthylation..... 65

β - Transestérification..... 65

b - Purification des esters méthyliques.. 67

c - Chromatographie gaz-liquide..... 68

d - Identification des acides gras..... 70

α - Comparaison des temps de rétention..... 70

β - Comparaison des temps de rétention obtenus sur des phases de polarité différente ..... 71

γ - Relation entre les temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone..... 72

θ - Hydrogénation..... 73

δ - Méthode utilisant les longueurs équivalentes de chaine carbonée (les E.C.L.)..... 73

TROISIÈME PARTIE : Résultats expérimentaux. . . . . 76

Chap I : Variations des constituants lipidiques sériques..... 77

1 - Le cholestérol..... 77

2 - Les triglycérides..... 78

Chap II : Teneur en lipides totaux des différents organes..... 81

1 - Le tissu hépatique..... 81

2 - Le muscle cardiaque..... 89

Pages

3 - Le rein..... 90

4 - Au niveau pulmonaire..... 90

5 - La rate..... 91

6 - Conclusions..... 92

Chap III : Répartition des triglycérides et du cholestérol dans les tissus..... 93

1 - Les triglycérides..... 93

2 - Le cholestérol..... 95

Chap IV : Teneur en phospholipides et répartition des constituants majeurs : phosphatidyl-choline et phosphatidyl-éthanolamine..... 97

Chap V : Répartition des acides gras dans les huiles et les phospholipides des émulsions..... 100

1 - Dans les huiles de coton et de soja..... 100

2 - Dans les phospholipides..... 101

Chap VI : Composition en acides gras des triglycérides tissulaires..... 103

Chap VII : Composition en acides gras des P.C. et des P.E..... 112

Chap VIII : Conclusions..... 121

Pages

QUATRIÈME PARTIE : Perfusions de foie isolé. . . . . 123

Chap I : Protocole expérimental..... 124

Chap II : Résultats..... 127

Chap III : Conclusions..... 135

CONCLUSIONS GÉNERALES. . . . . 136

APPENDICE TECHNIQUE. . . . . 140

BIBLIOGRAPHIE. . . . . 155

# INTRODUCTION

## A - HISTORIQUE :

La haute valeur calorique des lipides par rapport aux autres nutriments est connue depuis très longtemps, ATWATER a en effet montré que dans un régime alimentaire équilibré, de type occidental, les lipides fournissent 9 kilocalories par gramme, alors que glucides et protides n'apportent que 4 kilocalories.

Bien avant ATWATER, on savait de façon empirique que les graisses fournissaient de l'énergie et dès le 17e siècle un anglais WILLIAM COURTEN ( 1 ) réalise la première administration par voie intraveineuse de lipides. Méconnaissant la physiologie digestive des huiles, COURTEN perfuse dans les veines d'un chien, de l'huile d'olive chauffée. L'animal meurt pendant l'expérimentation, vraissemblablement d'une embolie graisseuse.

Il faut attendre le 19e siècle pour assister à un regain d'intérêt pour l'alimentation parentérale à base de lipides.

Au Canada, en 1873, HODDER E. , ( 2 ) réalise l'une des premières perfusions de lipides par voie intraveineuse chez l'Homme en injectant du lait à des sujets atteints de Choléra.

La voie veineuse est parfois supplantée par la voie sous-cutanée. En 1895, LEUBE W. ( 3 ) réalise avec succès l'administration

d'huile camphrée chez des cardiaques et conclut qu'elle peut-être utilisée de façon satisfaisante comme source calorique.

Ce n'est que vers 1920 que l'on voit apparaître les premières émulsions lipidiques artificielles.

En 1926, SAXL P. et DONATH F. ( 4 ) administrent une émulsion d'huile à 20% dans une solution saline, à des rats, des lapins, des chiens et des êtres humains. Pour la première fois ils utilisent une huile d'origine végétale. Ces auteurs s'attachent beaucoup plus à l'étude de la captation de l'émulsion par le système réticuloendothélial qu'à l'apport calorique.

JAFFE R. et BERMAN S.L( 5 ) reprennent en 1928 les travaux de SAXL et montrent que l'étude de l'activité du système réticuloendothélial est un bon test de fonctionnement hépatique.

Les premières études systématiques sur le rôle des émulsions administrées par voie veineuse sont entreprisent au Japon entre 1920 et 1930. Deux Japonais YMAKAWA S. et NOMURAT T. ( 6 ) préparent une émulsion à base d'huile de ricin stabilisée par des lécithines d'oeuf. Cette préparation est appelée YANOL. Le YANOL et d'autres émulsions similaires sont testées par de nombreux groupes sur l'animal et l'Homme.

Cependant ces émulsions ne remportent que peu de succès car elles sont relativement instables et induisent de nombreuses réactions secondaires chez le sujet expérimental. Elles sont très rapidement abandonnées.

Vers 1950, aux études Japonaises viennent s'ajouter des travaux Suisse, Allemand, Danois et surtout Suédois. De très nombreuses préparations

différant par la nature de l'huile et de l'émulsifiant, voient le jour. L'huile de coton et l'huile de soja ont la primeur, quant aux agents stabilisateurs, ils sont plus variés, on trouve des lécithines d'oeuf, des phosphatides de soja et même des émulsifiants synthétiques tel le polyoxyéthylène propylène ( Pluronic F 68 ).

En 1964 WRETLIND A. ( 7 ) montre cu'uné émulsion à base d'huile de soja peut couvrir la dépense calorique du chien pendant de longues périodes sans effets secondaires.

Plus récemment, ALLEN P.C. et LEE H.A. ( 8 ) en 1969, WILKINSON A.W. ( 9 ) en 1972 montrent que du point de vue physiopathologique, l'émulsion à base d'huile de soja est parfaitement saine.

## B - INTERET NUTRITIONNEL :

Les solutés dont on dispose, s'ils assurent des apports azotés et vitaminiques satisfaisants, ne permettent pas, dans le cadre d'une alimentation parentérale totale, des apports caloriques valables sans faire courir à l'organisme des risques de surcharge, aux veines des risques d'irritation ou de thrombose.

Les solutés glucosés isotoniques classiques n'apportent que 200 kcal/L. Si l'on veut assurer un apport suffisant, il faut utiliser de grands volumes de perfusat, ou bien augmenter la concentration molaire des solutions. Ces solutés hypertoniques sont très mal tolérés, induisant rapidement des irritations de l'endoveine ( même s'ils sont administrés dans des gros troncs veineux ) et des diurèses osmotiques.

Un apport de 2500 à 3000 kcal par jour est souvent préconisé lors d'une nutrition parentérale complète, il est donc tentant et logique, pour assurer ces apports importants de faire appel aux nutriments les plus énergétiques sous un faible volume, c'est à dire les lipides. Ces composés n'ont pas de pouvoir osmotique propre, ce qui laisse supposer une bonne tolèrance veineuse, de plus n'étant pas éliminés par les urines, ils ne provoquent pas de diurèse osmotique.

Un autre avantage de l'utilisation des graisses au cours de l'alimentation parentérale est l'apport d'acides gras essentiels et notamment d'acide linoleique (18: 2 ω 6). Cette carence étant d'ailleurs exacerbée par l'apport d'acides aminés et de glucides.

L'équilibre de la balance azotée semble également être influencé par l'addition de lipides aux acides aminés et aux glucides. En période post-opératoire, BEAL J. et coll. (10) ont réalisé une alimentation parentérale apportant des protides et 40 kcal/kg/jour sous forme de glucides, il obtient ainsi des bilans azotés équilibrés. En remplaçant 35 à 45 % des glucides par un apport lipidique de même valeur calorique, les bilans ne sont pas modifiés, alors qu'il n'apporte que 25 kcal/kg de glucides, taux normalement insuffisant pour équilibrer à lui seul le bilan azoté.

REID D.J. (11) a montré que, chez des patients dont l'état métabolique est stable, les lipides administrés par voie veineuse ont un effet d'épargne azotée, et que cette épargne est proportionnelle à l'apport calorique réalisé. Les bilans azotés effectués par cet auteur s'étalent sur des périodes de dix jours.

Il convient toutefois de souligner que, contrairement

aux glucides, les lipides seuls ne modifient pas la négativité d'un bilan azoté au cours du jeûne proteique. Par contre, si des glucides sont fournis et si l'apport calorique est complété par des lipides, l'effet d'épargne azotée persiste.

## C - TOLERANCE AUX EMULSIONS :

Si l'intérêt nutritionnel des lipides dans l'alimentation parentérale est largement reconnu, la tolérance à ces émulsions semble beaucoup plus discutée. Les divergences proviennent surtout du fait que les réactions sont très différentes suivant l'émulsion à laquelle on s'adresse.

En ce qui concerne la toxicité "aiguë" avec perfusion unique chez l'animal,des expériences ont montré que certaines de ces émulsions peuvent être administrées à des doses de 15 g/kg chez le rat et le chien, sans effet léthal. Des expériences similaires ont été entreprises chez l'Homme avec une émulsion à base d'huile de soja, utilisée à la dose de 3 à 4 g/kg sans entrainer aucun syndrome toxique. On peut donc en déduire que la toxicité aiguë est très faible pour cette émulsion . Par contre, avec des préparations à base d'huile de coton, on observe souvent et ce, dès le début de la perfusion, des manifestations que l'on peut rattacher au choc colloïdal qui se caractérise par des douleurs lombaires et articulaires, des céphalées, des vertiges, des nausées, des fourmillements, une hypo ou hypertension transitoire. Puis surviennent quelques heures après des frissons, une élévation de la température corporelle.

A long terme la tolérance aux perfusions itératives est

là aussi très différente suivant l'émulsion utilisée. L'étude de la toxicité n'étant pas l'objet de notre propos, nous ne mentionnerons à ce sujet que les expériences de HAKANSSONJ. et coll. ( 12 ). Des quatre types d'émulsions expérimentées, trois sont à base d'huile de coton et de phosphatides ou lécithines de soja et une à base d'huile de soja et de lécithines d'oeuf. Chacune d'entre elles est perfusée à raison de 9 g/kg pendant 4 à 5 heures par jour.

Au bout de 28 jours, tous les chiens ayant reçu la préparation d'huile de soja sont en bonne condition, par contre, tous les autres chiens sont morts dans un délai de 3 à 25 jours, variable avec le type d'émulsion utilisée. Les animaux ayant reçu de l'huile de coton présentent une dégénérescence graisseuse du foie et une anémie de type hémolytique ou hémorragique avec augmentation de la bilirubinémie. Ceux soumis à l'huile de soja ne présentent pas cette dégénérescence hépatique et ne présentent qu'une très légère anémie. Par contre, chez tous les animaux, quelque soit le type d'émulsion utilisée, les auteurs retrouvent un "pigment lipoïdique brun" dans le foie et dans la rate. THOMPSON et coll. ( 13 ) signalent que le dépôt de ce pigment gras est plus important avec les émulsions d'huile de coton qu'avec les émulsions d'huile de soja. Les différentes épreuves d'exploration des fonctions hépatiques n'ont pas permis à ces auteurs de démontrer que ce dépôt pigmentaire entrainait une quelconque perturbation du métabolisme hépatique, soit en cours de perfusions, soit après.

## D - TRAVAUX PERSONNELS :

La quasi totalité des travaux concernant les émulsions

lipidiques artificielles ont trait à l'étude de la tolérance à court terme ou à long terme, aux modifications anatomopathologiques induites par des perfusions répétées, ainsi qu'à la vitesse d'épuration plasmatique de ces particules lipidiques.

Par contre, le devenir métabolique des triglycérides et des phospholipides dans les tissus susceptibles de les incorporer, ainsi que les modifications de la composition en acide gras des lipides tissulaires, induites par les émulsions n'ont pas été , à notre connaissance, étudiés jusqu'alors.

Excepté les travaux de BERG G. ( 14 ) qui a utilisé le mini-porc comme animal d'expérience, toutes les autres études ont été faites soit sur le chien pour la plupart soit sur le rat.

Trois critères nous ont guidé dans le choix du mini-porc comme sujet expérimental :

- La taille de l'animal permet de pratiquer des perfusions pendant plusieurs semaines.
- Ne pouvant réaliser cette étude sur un grand nombre d'animaux, le mini-porc offre le grand avantage par rapport au chien, de fournir un matériel expérimental relativement homogène du point de vue génétique.
- Le mini-porc comme l'Homme et contrairement au chien possède une sorbitol-déshydrogénase dont nous verrons l'intérêt ultérieurement.

L'étude des perturbations de la composition en acides gras des lipides des différents tissus après perfusions d'émulsions lipidiques

artificielles chez le mini- porc a fait l'objet de la première partie de notre travail. Nous avons retenu les trois émulsions les plus couramment utilisées en clinique à l'heure actuelle.

- L'Intralipid (VITRUM) composé d'huile de soja et de lécithine d'oeuf.
- Le Lipiphysan (EGIC) renfermant de l'huile de coton et des phosphatides de soja.
- Le Trivénil (EGIC) à base d'huile de soja et de lécithine de soja. Cette dernière ayant la particularité d'apporter à la fois les lipides et les acides aminés.

Suivant l'émulsion considérée, les études s'étalent sur des périodes allant de une à quatre semaines.

A la lumière des résultats obtenus lors de cette première analyse, nous avons été conduits à envisager une seconde phase d'expérimentation afin, si non d'expliquer, du moins de mieux interpréter les résultats obtenus dans la première partie.

Dans cette seconde partie, nous nous sommes intéressés au mode d'épuration et d'utilisation des émulsions lipidiques citées précédemment, au niveau hépatique. Pour des raisons techniques, cette étude a été réalisée chez le rat en utilisant la méthode de perfusion de foie isolé décrite par MILLER L.L. (15).

Avant de présenter les résultats obtenus, nous croyons utile de rappeler certaines généralités, d'une part sur le métabolisme des triglycérides exogènes apportés par l'alimentation "per os" et d'autre part sur la vitesse d'épuration des triglycérides administrés par voie intraveineuse.

Ces rappels feront l'objet de la première partie de notre propos.

# P R E M I E R E  P A R T I E

## RAPPELS METABOLIQUES

# CHAPITRE I

## DIGESTION ET ABSORPTION INTESTINALE DES LIPIDES ALIMENTAIRES.

Les lipides alimentaires sont principalement constitués de triglycérides. Jusqu'à la sortie du pylore ces composés hydrophobes n'ont subit aucune modification, la lipase gastrique étant très peu active tout au moins chez l'Homme adulte; son activité est par contre beaucoup plus importante chez le nourrisson.

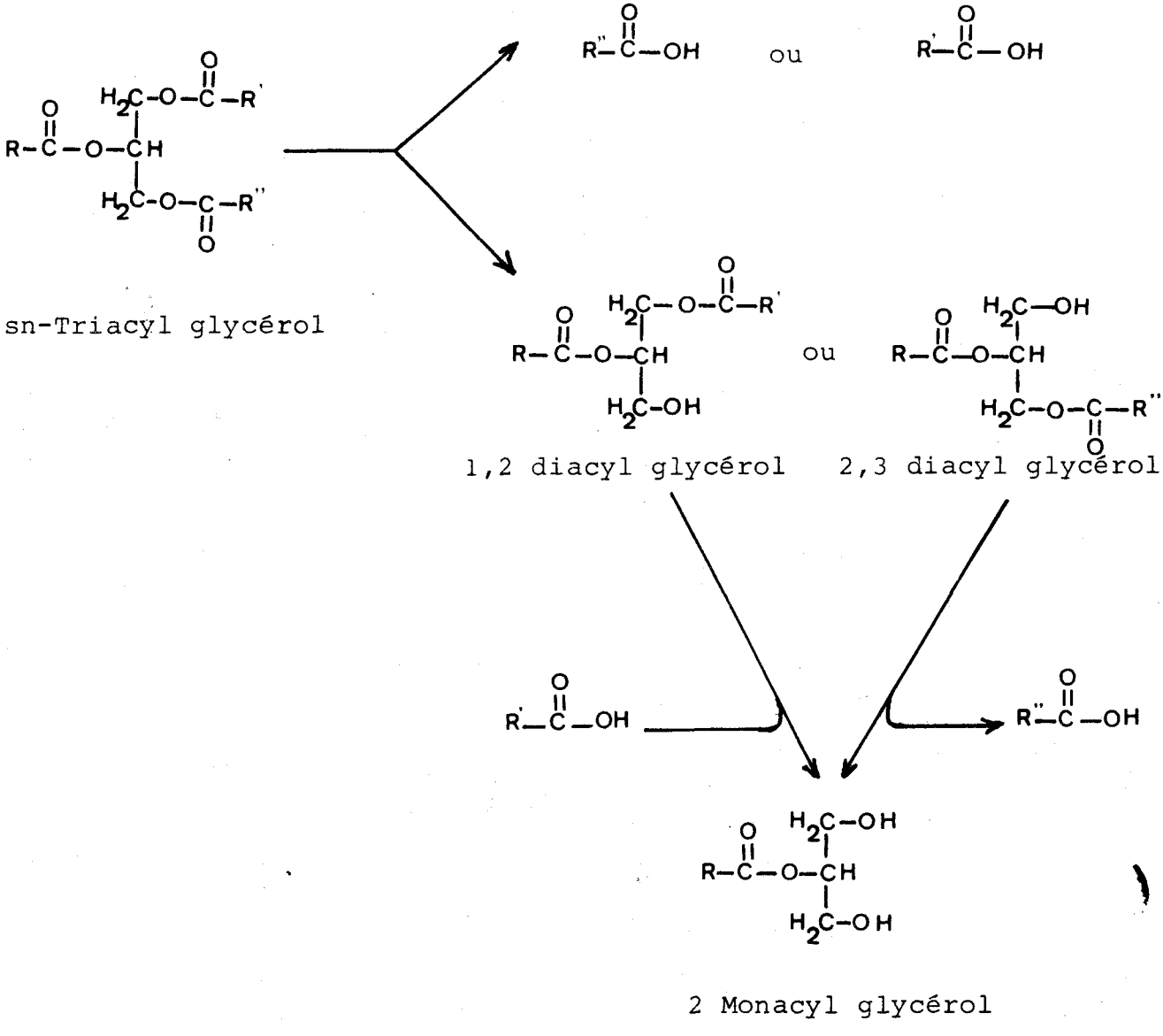
### 1 - Action de la lipase pancréatique :

Claude BERNARD et DASTRE ont montré que l'hydrolyse des triglycérides nécessite l'action conjuguée de la bile et du suc pancréatique. Sous l'action des sels biliaires et des lécithines de la bile, les globules graisseux libérés par l'estomac sont émulsionnés dans la phase aqueuse que constitue le contenu intestinal. Cette dispersion en fines particules des lipides permet d'augmenter la surface "d'attaque" des triglycérides par la lipase pancréatique.

Les triglycérides alimentaires sont mixtes, c'est à dire qu'ils renferment à la fois des acides gras à longues chaînes( $\geqslant$ C12 ) saturés ou non et des acides gras à chaînes courtes ( $\leqslant$ C10 ). Le devenir de ces deux catégories d'acides gras étant différent , nous allons, dans le but de clarifier l'exposé, distinguer arbitrairement le cas des triglycérides "à chaînes longues" et celui des triglycérides "à chaînes courtes"

#### a - Triglycérides à chaînes longues :

L'action de la lipase n'est pas identique sur les trois fonctions esters des triglycérides ; on sait, en effet, depuis les travaux de SAVARY P. et DESNUELLE P. (16) de MATTSON F.H. et BECK L.W. (17) de HOFMANN A.F. et BORGSTROM B. (18), que les positions 1 et 3 sont hydrolysées préférentiellement à la position 2. La spécificité de position de la lipase pancréatique aboutit donc à la formation d'une quantité importante de 2 monoacyl glycérol (2 - MG).



Ces 2-MG vont former avec les acides gras libres et les sels biliaires des micelles hydrophiles. Ces particules de très petite taille ( 500 nm de diamètre) vont pénétrer dans les microvillosités de la muqueuse intestinale ( JOHNSTON J.M. et BERGSTROM B. (19) et être incorporées dans les cellules du parenchyme intestinal. Les sels biliaires vont se dissocier des micelles et être réabsorbés dans la lumière intestinale. La pénétration des micelles semble se faire par l'intermédiaire de fins canalicules grâce à l'existence d'un potentiel de membrane lié à la répartition des ions de part et d'autre de cette menbrane. On expliquerait ainsi le déficit d'absorption des graisses à la suite d'une surrénalectomie puisque la répartition des électrolytes est sous la dépendance des minéralocorticoïdes.

Dans la cellule de la muqueuse intestinale les fractions lipidiques provenant de la digestion sont réestérifiées en triglycérides. Cette synthèse se déroule suivant deux processus : soit par la voie du phospho - 3 - glycérol à partir des acides gras intracellulaires, soit par la voie des 2-MG qui est d'ailleurs prépondérante pour les triglycérides. Cette estérification directe des fonctions alcool libres des 2 - MG fait intervenir un complexe enzymatique appelé triglycéride-synthétase (20).

Les acides gras issus de l'intestin rejoignent le "pool" intracellulaires qui est en partie composé d'acides gras issus des acides gras libres plasmatiques que la muqueuse intestinale capte également. Ils seront donc, après activation en acyl-CoA, intégrés dans la synthèse des triglycérides par l'une des voies citées précédemment, soit incorporés dans des molécules de phospholipides, dont les voies de synthèse se greffent sur celles des triglycérides à partir du phospho - 3 - glycérol (21).

Le cholestérol libre et estérifié alimentaire est absorbé

sous forme libre. Il rejoint le cholestérol libre intracellulaire que la muqueuse synthétise également assez activement comme le foie, à partir de l'acétyl-CoA. Une grande partie de ce "pool" de cholestérol est alors estérifié avec les acides gras cellulaires.

Au sein de la cellule de la muqueuse intestinale, les triglycérides et les esters de cholestérol vont s'associer en petites particules sur lesquelles viendront se greffer des phospholipides et une copule proteique. Ces gouttelettes qui renferment environ 90 % de triglycérides, 2 % de stérides, 1 % de cholestérol, 6 % de phospholipides et 1 % de proteines sont les chylomicrons. Ces chylomicrons apparaissent tout d'abord au niveau du réticulum endoplasmique lisse, puis migrent dans l'appareil de Golgi; qu'ils traversent avant d'être éjectés dans l'espace séparant deux cellules intestinales. Les chylomicrons émis par le parenchyme intestinal vont se rassembler dans la lymphe et rejoindrent la circulation générale par l'intermédiaire du canal thoracique au niveau de la veine sous-claviaire gauche.

L'étude de la figure(1)page (16)nous montre qu'il existe de nombreuses voies métaboliques secondaires et notamment au niveau de la lumière intestinale, une isomérisation possible des 2-MG en 1-MG (22) - voie 3 - et par suite une hydrolyse complète des triglycérides. Au niveau de la muqueuse intestinale, ces 1-MG obtenus par isomérisation et non hydrolysés peuvent être dégradés par une monoglycéride-lipase (23). Les voies - 12 et 17 - mettent en évidence la possibilité de synthèse des phospholipides à partir des acides phosphatidiques (phosphatidyl-inositol) et des diglycérides (phosphatidyl-choline et phosphatidyl-éthanolamine).

b - Triglycérides à chaînes courtes :

La lipase pancréatique conserve toujours sa spécificité de position que ce soit sur des triglycérides à chaînes longues ou sur des triglycérides à chaînes courtes, mais la vitesse d'hydrolyse est plus grande pour les chaînes courtes que pour les chaînes longues (24) ; la vitesse d'estérolyse étant maximale pour les chaînes Butyriques.

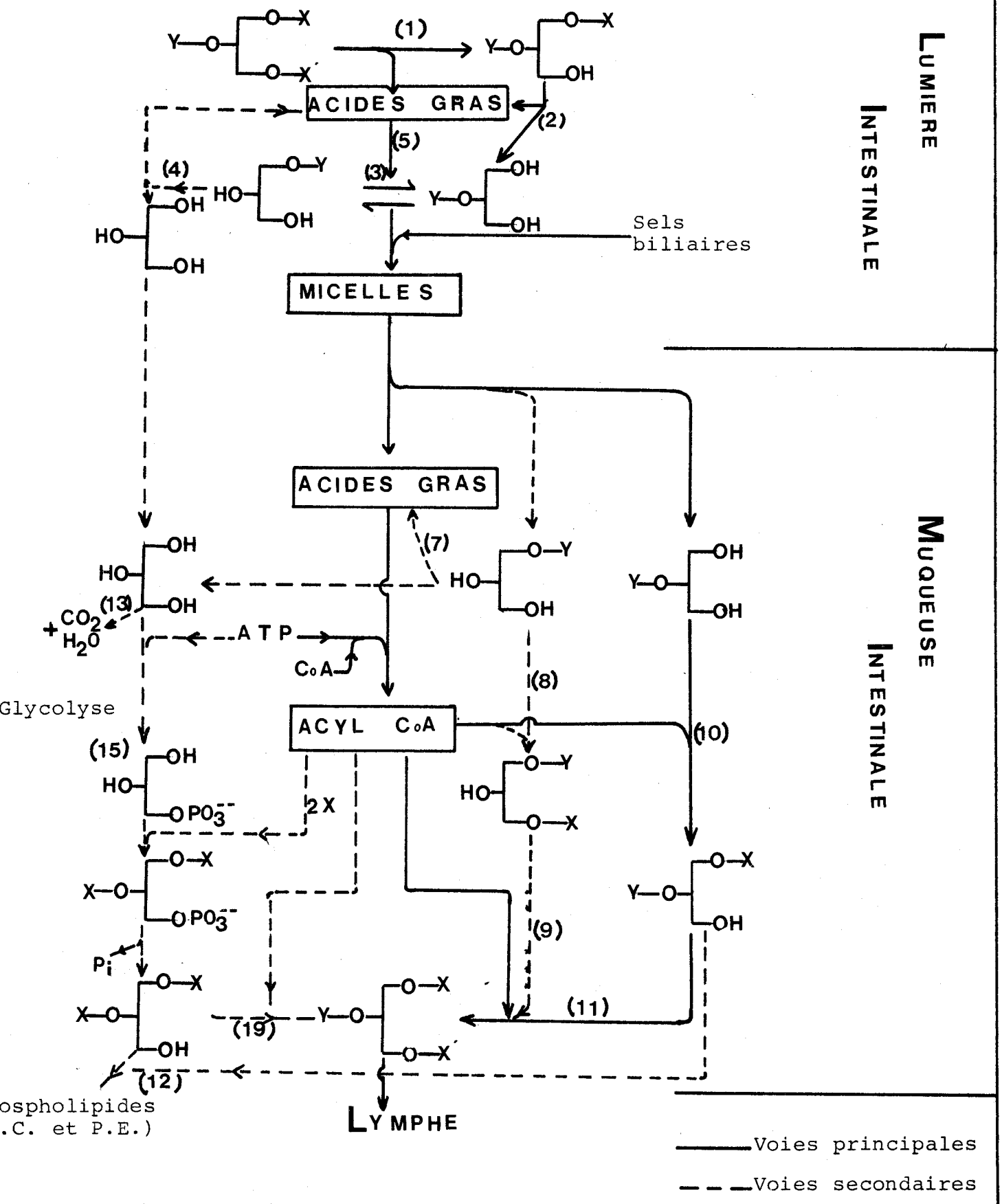
Comme précédemment, l'hydrolyse aboutit à la formation de 2-MG et d'acides gras, mais on sait depuis longtemps que lorsque le régime alimentaire renferme une grande proportion de triglycérides à acides gras courts en position 2, les proportions de chaînes courtes dans les glycérides lymphatiques sont relativement faibles. Cette observation appelle deux remarques :

- L'hydrolyse par la lipase pancréatique doit être complète, en dépit de leur position en 2.
- Leur incorporation dans les triglycérides doit être partiellement inhibée.

ENTRESSANGLES B. et coll. (25) ont montré qu'en fait la spécificité de position de la lipase pancréatique était respectée, mais que les acides gras courts en position 2 ont la propriété de migrer très facilement en position 1 (figure 2 page 17). Nous avons vu que cette possibilité d'isomérisation existe aussi pour les chaînes longues mais à un degré moindre (figure 3 page 18). D'autre part, ces acides gras devraient être activés sous forme d'acyl-CoA afin d'être incorporés dans les triglycérides, par l'une ou l'autre des voies décrites dans la synthèse des triglycérides, dans la muqueuse intestinale, or l'acyl-CoA synthétase active préférentiellement les chaînes longues en vue de leur estérification ultérieure (26).

Compte tenu de la particularité métabolique des acides

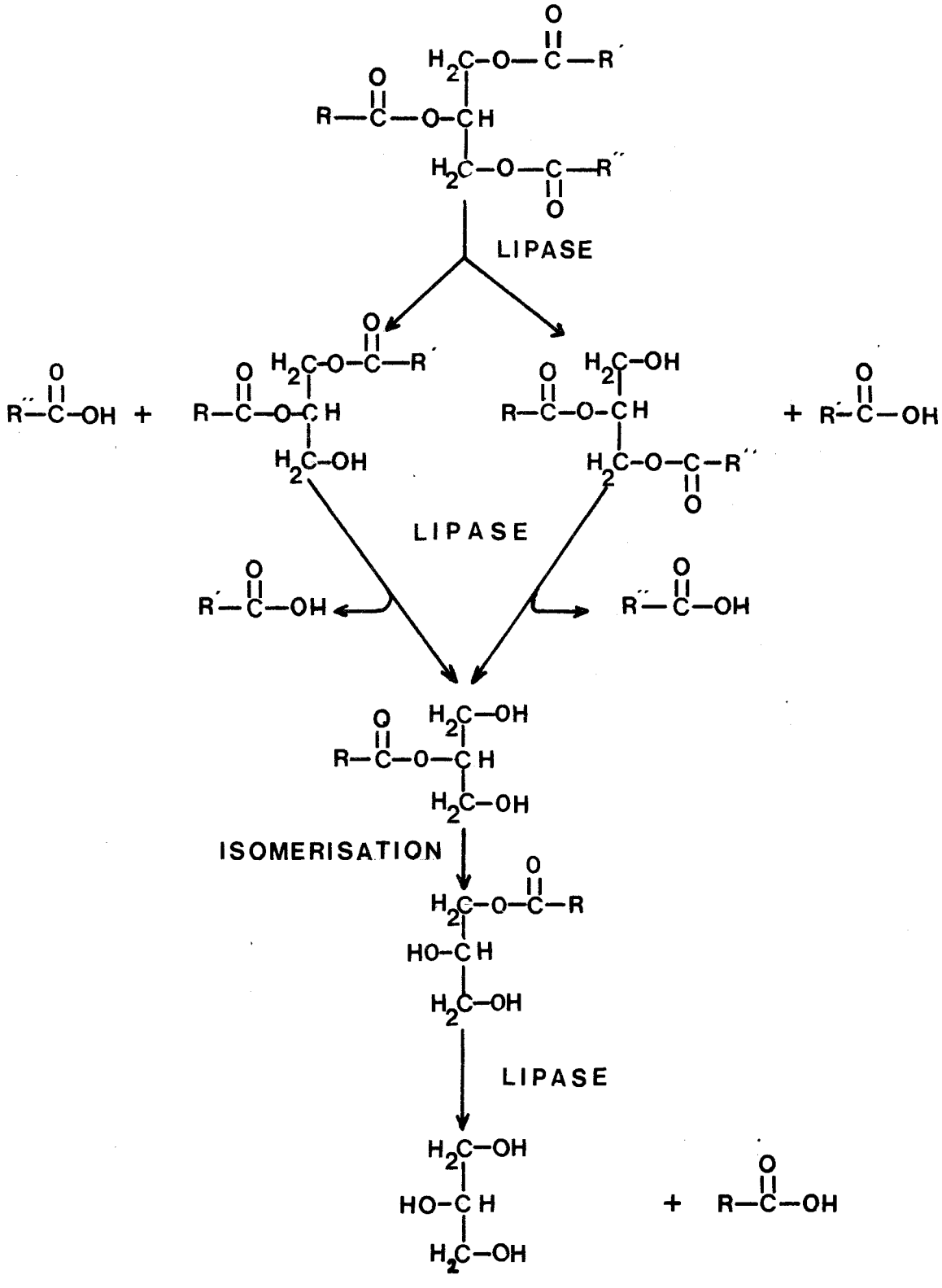
Figure 1




Métabolisme des triglycérides au niveau intestinal

BUS LILLE

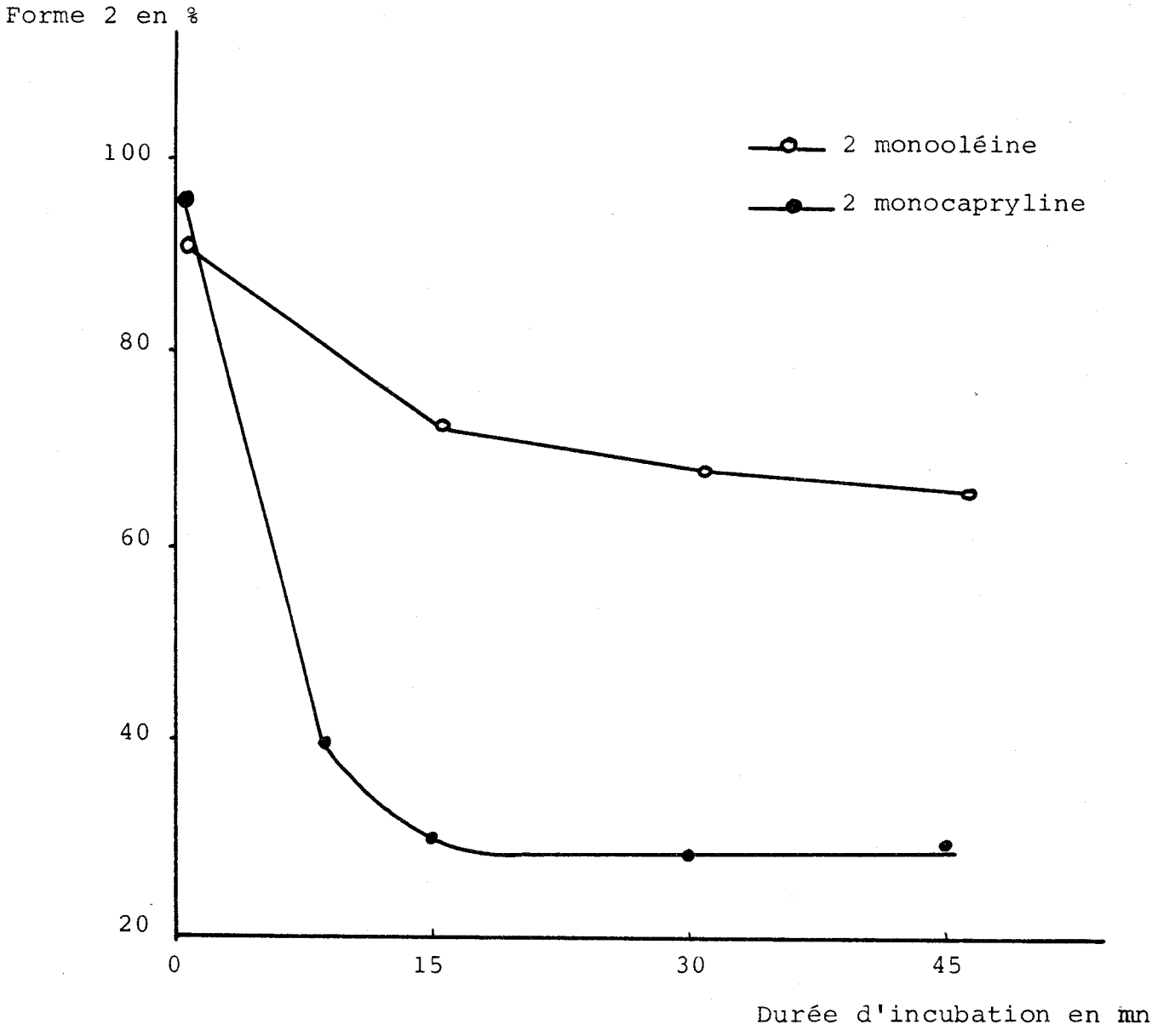
Figure 2




Action de la lipase pancréatique sur un triglycéride ayant un acide gras court en position 2

BUS LILLE

Figure 3




Isomérisation de la 2 monooléine et de la 2 monocapryline en milieu faiblement alcalin à 37° C d'après ENTRESSANGLES

BUS LILLE

gras courts, tant au niveau de l'hydrolyse qu'au niveau de l'estérification, on considère que les chaînes courtes des triglycérides ingérés quittent la muqueuse intestinale par le sang portal à l'état d'acides gras libres, alors que les chaînes longues sont évacuées par la lymphe à l'état estérifié.

La distinction entre ces deux types d'acides gras n'a sans doute pas le caractère absolu qu'on lui a souvent prêté. Des quantités importantes de chaînes courtes, notamment en C 10 ou en C 12 existent quelquefois dans les chylomicrons ( 27, 28 ). Une fraction de chaînes longues semble d'autre part échapper à la lymphe et pénètrer directement dans le sang portal.

2 - Epuration des chylomicrons :

Chez l'Homme sain les lipides ingérés lors d'un repas sont éliminés par l'estomac en 5 à 6 heures, par contre, les chylomicrons formés après "l'attaque" lipasique sont rapidement éliminés du courant sanguin ; leur demi-vie est inférieure à une heure chez l'Homme ( NESTEL P.J. ( 29 ). Tous les tissus, à l'exception du cerveau, participent à l'épuration des chylomicrons. Il semble que ce soit le tissu adipeux, puis le muscle squelettique qui soient les plus actifs, puisque 80 % des acides gras composant les triglycérides des chylomicrons sont retrouvés à ces niveaux ( OLIVECRONA T.H. et BELFRASE P. ) ( 30 ).

Compte tenu de la différence morphologique des capillaires sanguins au niveau du foie d'une part et des tissus extrahépatiques d'autre part, deux mécanismes d'épuration des chylomicrons peuvent être envisagés :

- Au niveau du foie, les capillaires sanguins étant

dépourvus de membrane basale, les particules lipidiques peuvent pénétrer dans l'espace de DISSE et être phagocytées par les cellules de Kupffer.

- Au contraire, au niveau des tissus extrahépatiques, la membrane basale existe et l'incorporation des lipides ne peut se faire qu'après hydrolyse des triglycérides des chylomicrons.

La captation directe par le foie des triglycérides alimentaires a été admise pendant longtemps. On admettait que ce processus concernait le tiers des triglycérides du régime, actuellement, il semble que la proportion de chylomicrons empruntant cette voie soit beaucoup plus faible, voire minime, et que l'incorporation des lipides dans le foie soit précédée d'une hydrolyse comme dans les tissus extrahépatiques. Cette hypothèse semble confirmée par l'identification dans le foie d'une triglycéride-lipase localisée dans la membrane plasmique des hépatocytes ( ASSMAN G. et coll. ) ( 31 ).

L'activité lipolytique de cette triglycéride lipase serait assez faible sur les chylomicrons eux-mêmes. Le rôle principal qui lui est attribué actuellement est une hydrolyse des glycérides contenus dans les "remnants". Les particules lipidiques désignées sous ce nom de remnants proviennent des chylomicrons dont les triglycérides ont été en partie hydrolysés au niveau des tissus extrahépatiques.

Si l'importance de la captation directe des chylomicrons par le foie semble remise en question, la captation par les cellules de Kupffer des particules lipidiques des émulsions artificielles administrées par voie intra-veineuse, semble en revanche très probable ( SCHOLLER K.L. ) ( 32 ). Il apparaît également d'après LAROSA J.C. et coll. ( 33 ) que

l'activité de la triglycéride-lipase hépatique soit plus grande sur les émulsions artificielles que sur les chylomicrons.

A l'exception du cerveau, ce sont donc les tissus extrahépatiques qui captent la majeure partie des acides gras des triglycérides des chylomicrons. Dans ces tissus, l'hydrolyse est sous la dépendance d'une enzyme appelée "Lipoproteine-Lipase" ou "facteur clarifiant" localisée à la surface des cellules endothéliales des capillaires sanguins. Deux tiers environ des acides gras libérés sont incorporés dans les triglycérides tissulaires après resynthèse, et le tiers restant est libéré avec le glycérol dans le flux sanguin venant grossir le "pool" des acides gras libres circulants transportés par la sérumalbumine et provenant normalement de l'hydrolyse des triglycérides intraadipocytaires.

En période post-prandiale, le tissu adipeux est le site majeure de l'épuration extra-hépatique des triglycérides alimentaires.

# CHAPITRE II

## EPURATION DES EMULSIONS LIPIDIQUES ARTIFICIELLES :

Avant d'envisager le mode de captation des particules lipidiques des émulsions, il nous semble utile d'étudier la composition et les propriétés physico-chimiques des différentes préparations utilisées en clinique.

### 1 - Composition des émulsions :

L'expérience de COURTEN W. (34) sur le chien montre que l'administration d'huile chauffée par voie intra-veineuse entraine la mort très rapidement par embolie graisseuse. Les lipides ne peuvent donc pas être injectés tels quels dans le flux sanguin.

Au cours de la digestion, il se produit pourtant plusieurs fois par jour un afflux de lipides dans la veine sous-claviaire gauche, mais à ce niveau les triglycérides ne sont pas à l'état libre, ils sont inclus dans les chylomicrons ; particules stables finement émulsionnées en milieu aqueux grâce à la présence de nombreux pôles hydrophiles à leur periphérie.

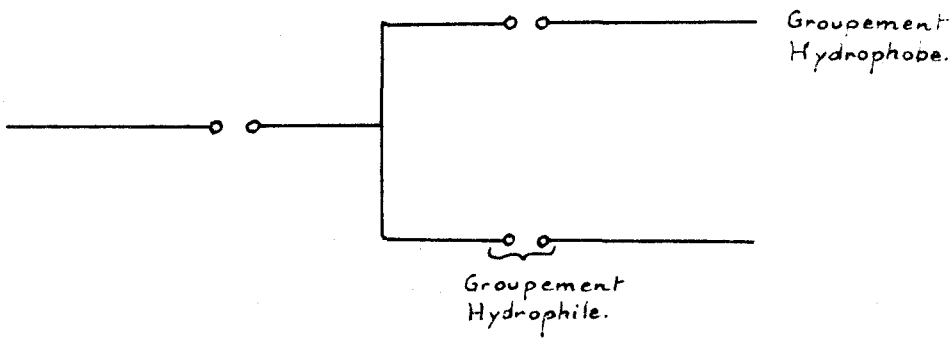
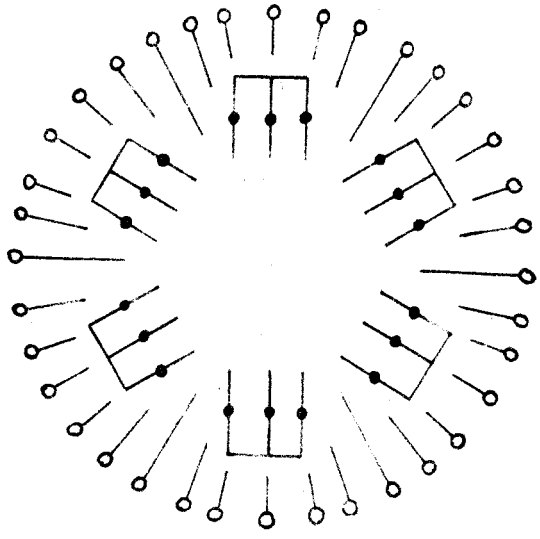



Schéma d'1 triglycéride.

Les groupements hydrophiles ( fonctions alcool du glycérol, fonctions acide des acides gras) se trouvent masqués par leur combinaison d'où la totale insolubilité des triglycérides dans l'eau. Pour les rendre solubles, il convient de les incorporer au sein des micelles dont la périphérie sera constituée de substances capables d'amener des groupements hydrophiles. Ces substances sont appelées émulsifiants. Il en existe deux types; naturels ou artificiels.



EMULSION THEORIQUE DE TRIGLYCERIDES

Les émulsifiants naturels restent les plus utilisés dans les émulsions lipidiques artificielles. En étudiant la composition des différentes préparations, on remarque que les émulsifiants les plus employés sont les phospholipides et plus particulièrement les lécithines ou phosphatidyl-choline.

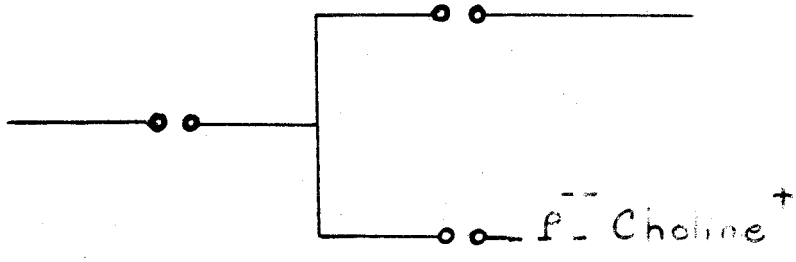
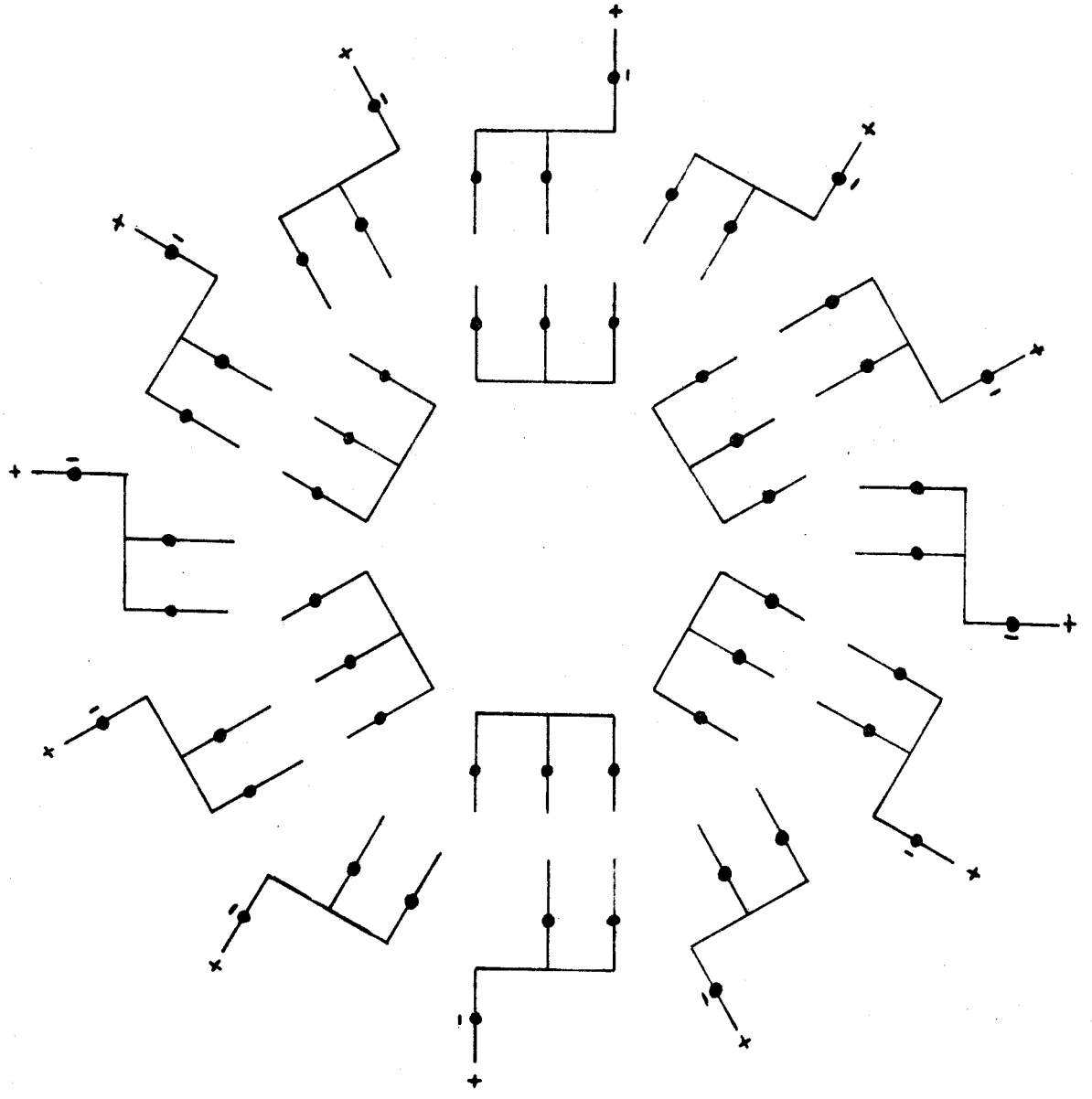



Schéma théorique d'une lécithine.

En milieu aqueux ces molécules vont orienter leur groupement hydrophile vers l'extérieur, emprisonnant les molécules de triglycérides. L'ensemble formera une émulsion stable.



Emulsion de T.G. à l'aide de lécithine.

BUS LILLE

Dans certaines préparations américaines des émulsifiants artificiels ( Pluronic F 68, TWEEN ) ont été ajoutés aux émulsifiants naturels. Du fait de la mauvaise tolérance de telles émulsions, les émulsifiants artificiels ont été rapidement abandonnés.

Compte tenu des quelques données physico-chimiques que nous venons de présenter, toutes les émulsions sont préparées suivant le même schéma, seule la nature des constituants diffère comme le montre le Tableau 2.p 28.

- Les triglycérides seront apportés soit par l'huile de soja; soit par l'huile de coton. Le tableau 1 page 26 nous montre que ces deux huiles sont peu différentes quant à leur composition en acides gras. Toutes deux sont riches en acides gras polyinsaturés et notamment en acide linoleique (18 : $\omega$ 6) (18 atomes de carbone et deux doubles liaisons). On remarque toutefois que l'huile de soja contient moins d'acides gras saturés que l'huile de coton, en particulier moins d'acide palmatique (16 : 0). L'Intérêt nutritionnel de telles huiles est donc double :

- Apport calorique.

-Apport d'éléments indispensables : les acides gras essentiels (acide linoleique et linolénique -(18 : 3 $\omega$3) dans le cas de l'huile de soja).

La stérilisation indispensable pose des problèmes matérialisés notamment par la formation éventuelle des peroxydes à partir des acides gras insaturés; il convient donc d'éviter ce processus en ajoutant des anti-oxydants. La vitamine E ou tocophérol est le plus utilisé surtout dans les préparations à base d'huile de coton, l'huile de soja en contient déjà naturellement.

Les agents émulsifiants les plus employés sont soit les lécithines de soja soit les lécithines d'oeuf.

TABLEAU 1

COMPOSITION EN ACIDES GRAS DANS 2 HUILES : SOJA - COTON

| | HUILE DE COTON | HUILE DE SOJA |
|---|---|---|
| Acide palmitique C16:0 | 22 % | 10 % |
| Acide oléïque C18:1 w6 | 31 % | 29 % |
| Acide linoléïque C18:2 w6 | 45 % | 51 % |
| Acide linolénique C18:3 w3 | 0 % | 7 % |
| Autres acides gras | 2 % | 3 % |

BUS

- Pour maintenir l'isotonicité du sang, la phase aqueuse contient du glucose, du sorbitol ou du glycérol. L'observation d'une coloration brune, lors de la stérilisation, dans les préparations à base de glucose, a conduit à l'élimination de ce composé dans les émulsions. Le sorbitol et le glycérol ne donnant aucune réaction au cours du chauffage sont plus couramment employés.

Actuellement, les émulsions présentées dans le tableau 2 page 28, trois seulement restent commercialisées. La plus récente étant le Trimévil qui diffère de toutes les autres préparations par la présence d'acides aminés.

## 2 - Comparaison physico-chimique des chylomicrons et des particules lipidiques des émulsions :

La plupart des chylomicrons ont un diamètre moyen variant entre 500 et 600 nm, les plus gros d'entre eux peuvent atteindre 1000 à 1500 nm de diamètre (ALBRINK M.J.) (35).

Les études de HALLBERG D. et WERSALL J. (36) et de SCHOEFL G.I. (37) en microscopie électronique montrent que les particules lipidiques des émulsions artificielles ont des tailles très voisines de celles des chylomicrons puisque leur diamètre est compris entre 100 et 800 nm. Signalons toutefois que les conditions de conservation ont une certaine influence sur l'évolution de la taille des particules émulsionnées. Des études entreprises sur l'Intralipid montrent qu'après deux ans de maintien à + 4 ° C, 99 % des particules ont un diamètre inférieur à 1000 nm et seulement 1 % dépassent 1000 nm. A + 4° C il y a une parfaite stabilité de la taille des particules, par contre à + 20° C pendant 2 ans, plus de 3 %

TABLEAU 2

COMPOSITION DES DIFFERENTES EMULSIONS

| | LIPOMUL (Upjohn Co) | LIPOFUNDIN (Braun) | LIPIPHYSAN 10% (Egic) | INTRALIPID 20% (Vitrum) | TRIVEMIL (Egic) |
|---|---|---|---|---|---|
| Huile de Coton | 150 g | 100 g | 100 g | | |
| Huile de Soja | | | | 200 g | 38 g |
| Lécithine de Soja | 12 g | | 15 g | | 7 g |
| Lécithine d'oeuf purifiée | | | | 12 g | |
| Phosphatides de Soja fractionnés | | 7,5 g | | | |
| Pluronic F 68 | 3 g | | | | |
| DL alphatocophérol | | 0,585 g | 0,5 g | | 0,4 g |
| Glucose | 44 g | | | | |
| Sorbitol | | 50 g | 50 g | | 100 g |
| Glycérol | | | | 25 g | |
| Acides aminés | | | | | 60 g |
| Eau distillée Q.S.P. | 1000 ml | 1000 ml | 1000 ml | 1000 ml | 1000 ml |

BUS LILLE

dépassent 1000 nm de diamètre.

Si chylomicrons et particules lipidiques des émulsions ne diffèrent pas par la taille, ils ne sont cependant pas identiques quant à leur composition. Les chylomicrons sont recouverts par une enveloppe constituée de phospholipides, de cholestérol libre et de proteines alors que les particules artificielles ne renferment pas de proteines puisque l'émulsion n'en contient pas. La couche externe n'est donc constituée que par des phospholipides.

3 - Etude de la vitesse d'épuration des différentes émulsions :

Les études relatives à la vitesse d'épuration des particules lipidiques des émulsions lipidiques artificielles ont été, dans la plupart des cas, effectuées sur un seul substrat : l'Intralipid.

BOBERG J. et CARLSON L.A. ( 38 ) montrent que les particules lipidiques de l'émulsion d'Intralipid sont hydrolysées à la même vitesse que les chylomicrons, ceci aussi bien chez l'Homme que chez le chien. HALLBERG D. ( 39 ) a montré qu'injectées dans de telles conditions, les particules lipidiques acquièrent une copule proteique et se comportent comme des chylomicrons dont on sait que l'épuration plasmatique s'opère surtout au niveau des sites extra-hépatiques sous l'action de la Lipoproteine-lipase.

La vitesse de l'épuration dépend du taux de lipides administrés. Elle est maximale et constante à haute concentration ( $K_1$ = mM/L/mn ) et ce, jusqu'à un certain seuil ( C = mM / L ) appelé "Concentration critique". En dessous de ce seuil, la cinétique d'épuration est de type exponentiel. CARLSON L.A. et HALLBERG D. ( 4o )ont observé

ce phénomène en administrant en une seule injection une émulsion lipidique artificielle chez le chien à un taux tel qu'il soit supérieur à la "concentration critique". Ils remarquent que la cinétique d'épuration des triglycérides dans le sang est bimodale. Dans un premier temps, lorsque le taux de triglycérides est élevé, la cinétique est d'ordre 0 ( c'est à dire à vitesse constante ), puis lorsque la concentration en triglycérides devient plus faible, la cinétique est d'ordre 1 ( c'est à dire que la vitesse est proportionnelle à la concentration du moment ). Dans la première phase, on considère que les sites d'épuration sont saturés d'où une vitesse constante et maximale.

Cette vitesse d'épuration est sous la dépendance de nombreux facteurs, et notamment de l'état nutritionnel et de l'émulsion considérée.

Le jeûne induit une augmentation de vitesse d'épuration. Après une nuit de jeûne, un adulte peut éliminer une quantité d"émulsion correspondante à 35 kcal/kg/24h/. Après 38 heures, la capacité d'élimination s'établit à 52 kcal/kg/24h. En période post-opératoire après environ deux jours de jeûne, la capacité d'épuration équivaut à 100 kcal/kg/24h.

WAREMBOURG et coll. ( 41 ) ont montré que la nature de l'émulsion interférait aussi sur la vitesse d'épuration. Leurs travaux ont trait à deux émulsions, le Lipiphysan et l'Intralipid, dont nous avons vu que la composition différait de part l'huile et l'émulsifiant utilisés. Ces auteurs retrouvent l'épuration en deux temps décrite précédemment. Ils montrent que le Lipiphysan est éliminé beaucoup plus rapidement que l'Intralipid, son épuration plasmatique s'opère essentiellement pendant les 5 premières minutes

suivant l'injection ( figure 4 ) p 32 .

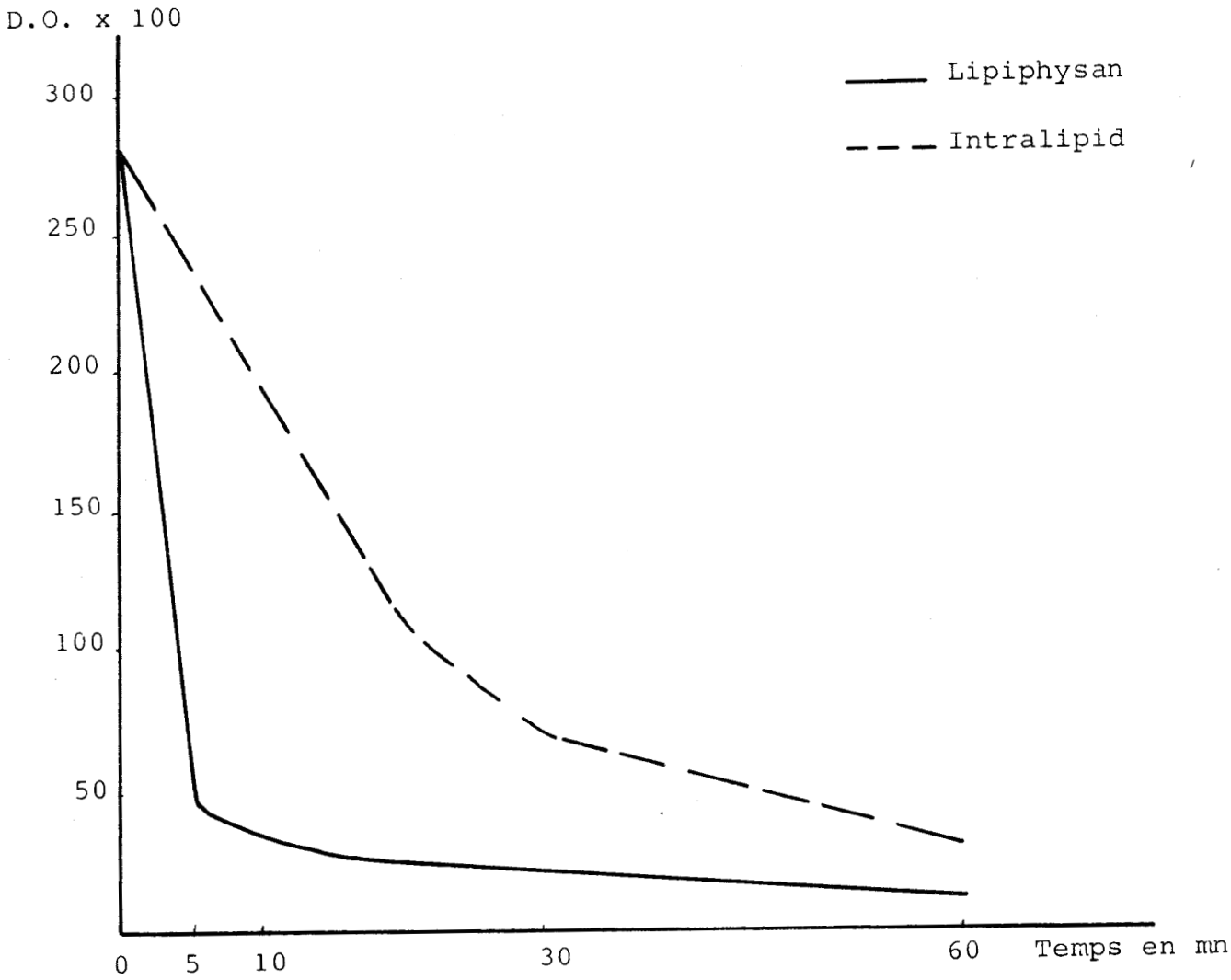
Cette différence de vitesse de disparition des particules lipidiques permet de penser que le mode d'épuration n'est pas le même suivant la composition de l'émulsion. Les résultats obtenus après injection d'émulsions dans le système porte du rat ou après ablation de la rate chez le lapin ( WAREMBOURG et coll. ( 42 ) suggèrent que l'épuration du Lipiphysan résulterait d'une captation hépatique quasi-instantanée et plus accessoirement d'une captation splénique. Ces phénomènes intervenant plus lentement pour l'Intralipid.

KESSLER J.I. ( 43 ), LEVEEN, H.H. et coll. ( 44 ), et WADDELL, W.R. et coll. ( 45 ) ont montré que le système réticulo-endothélial du foie et de la rate intervient en phagocytant les particules lipidiques des émulsions artificielles.

Pour FRASER A.C. et Coll ( 46 ) les triglycérides des émulsions sont hydrolysés par la Lipoproteine-Lipase intravasculaire de la même manière que ceux des chylomicrons, de plus une concentration importante de lipides dans le sang peut stimuler "invivo" la production de Lipoproteine-Lipase.

Il semble donc qu'il n'éxiste pas un seul type d'épuration des émulsions lipidiques artificielles, mais que plusieurs systèmes entrent en jeu ( captation directe, hydrolyse des triglycérides ) et la priorité de l'un ou l'autre de ces systèmes dépend de la composition de l'émulsion.

Figure 4




Comparaison des vitesses d'épuration de deux émulsions

BUS LILLE

# D E U X I E M E  P A R T I E

## PROTOCOLE EXPERIMENTAL

# CHAPITRE I

## Expérimentation animale :

### 1 - Animaux utilisés :

Le meilleur choix de l'espèce à utiliser pour obtenir des résultats susceptibles de contribuer au mieux aux essais préalables à toute expérimentation humaine est le souci primordial de tout chercheur.

Les rongeurs sont très largement utilisés en raison de leur reproduction rapide et de leur faible prix de revient. D'autres animaux plus gros et plus proches de l'Homme commencent à s'imposer : c'est le cas du singe et du porc-miniature.

Par certains aspects anatomiques, physiologiques, biochimiques et cliniques, le porc se révèle un modèle expérimental se rapprochant beaucoup de l'espèce humaine. Deux autres raisons nous ont fait préférer ce matériel d'expérience :

- La taille de l'animal permet très facilement de faire des perfusions pendant plusieurs semaines.
- Le porc possède, comme l'Homme une sorbitol-déshydrogénase permettant l'utilisation du sorbitol en le transformant en fructose; sorbitol qui, comme nous l'avons vu est présent dans certaines préparations d'émulsions lipidiques artificielles.

A partir de divers croisements de certains porcs classiques, une sélection sur la taille et le poids des animaux a été effectuée engendrant ainsi 3 principales lignées génétiquement naines :

- La lignée HORMEL issue d'une sélection d'animaux au cours de croisements entre le porc sauvage de l'île SANTA CALATINA, au large des côtes californiennes, du pourceau de GUINEE, du porc sauvage des îles de GUAM et du porc PINEY-WOODS de LOUISIANE.

- La lignée PITMAN MOORE obtenue par croisement de porcs des marécages de FLORIDE avec certaines espèces des Iles du Pacifique.

- La lignée de l'INSTITUT de ZOOTECHNIE et de GENETIQUE ANIMALE de GOTTINGEN issue d'un croisement entre le porc-miniature HORMEL, le porc nain vietnamien à ventre distendu et le porc tacheté vietnamien, en vue d'obtenir des animaux non pigmentés à robe blanche dominante.

Ce sont des porcs de cette dernière lignée que nous avons utilisés. Le fait de travailler avec des animaux de même lignée est encore un argument en faveur du porc-miniature.

Avant son utilisation, l'animal adulte pesant environ 20 kg est placé en cage individuelle et reçoit une alimentation "per os" sous forme de granulés. Pendant une semaine, il recevra un apport de 2000 kcal par jour. Ce taux calorique a été déterminé comme étant celui qui maintenait l'animal en équilibre pondéral ; ce sera donc sur ces mêmes bases que seront calculées les quantités des différents nutriments à apporter par voie intra-veineuse.

Après cette phase d'adaptation, on place un cathéter à demeure sur la veine jugulaire externe afin de procéder aux administrations intraveineuses d'émulsions et aux différents prélèvements sanguins. l'intervention est réalisée dans des conditions d'asepsie chirurgicale classique ; la salle n'étant toutefois pas stérile.

L'anesthésie totale est pratiquée en deux temps. L'animal étant maintenu par les pattes postérieures, la tête en bas, on lui injecte dans la partie latéroventrale, en dessous et à 1 cm environ de l'ombilic 5 ml d'une solution à 6 % de Nembutal. Après 10 minutes l'animal commence à tituber et on lui admisnistre alors, toujours par voie intrapéritonéale, 11 à 12 ml de la même solution de Nembutal. L'anesthésie obtenue après 30 minutes environ, l'animal est placé sur le côté, le cou est rasé et dégraissé à l'alcool isopropylique puis désinfecté à l'alcool iodé : le porc est enfin recouvert d'un champ opératoire stérile.

On pratique une incision de 4 à 5 cm au quart inférieur du cou, entre le bord postérieur du maxillaire inférieur et le bord supérieur du scapulum. On dégage la veine jugulaire externe qui se situe sur le bord antérieur du muscle sternothyroïdien, un peu en dessous et latéralement par rapport au larynx (figure 5 page 37). On place une première ligature serrée côté céphalique et une ligature d'attente côté thoracique. Une petite incision est pratiquée en aval de la ligature céphalique par laquelle on introduit 15 cm d'un cathéter en élastomère siliconé (préalablement bisauté, stérilisé et rempli d'une solution de citrate dans Na/Cl isotonique) de 2,5 mm de diamètre intérieur et de 4 mm de diamètre extérieur. Ce type de cathéter peut être stérilisé dans un autoclave et ne provoque pas la formation de caillot. Une fois le cathéter mis en place, on serre la ligature d'attente. Une seconde ligature de sécurité est placée afin de maintenir très solidement le cathéter dans la veine.

A l'aide d'une seringue adaptée sur le cathéter, on vérifie que la paroi veineuse n'a pas été lésée en faisant monter le sang veineux que l'on refoule ensuite à l'aide d'une solution de chlorure de sodium citraté . Le cathéter est ensuite passé sous la peau à l'aide d'une

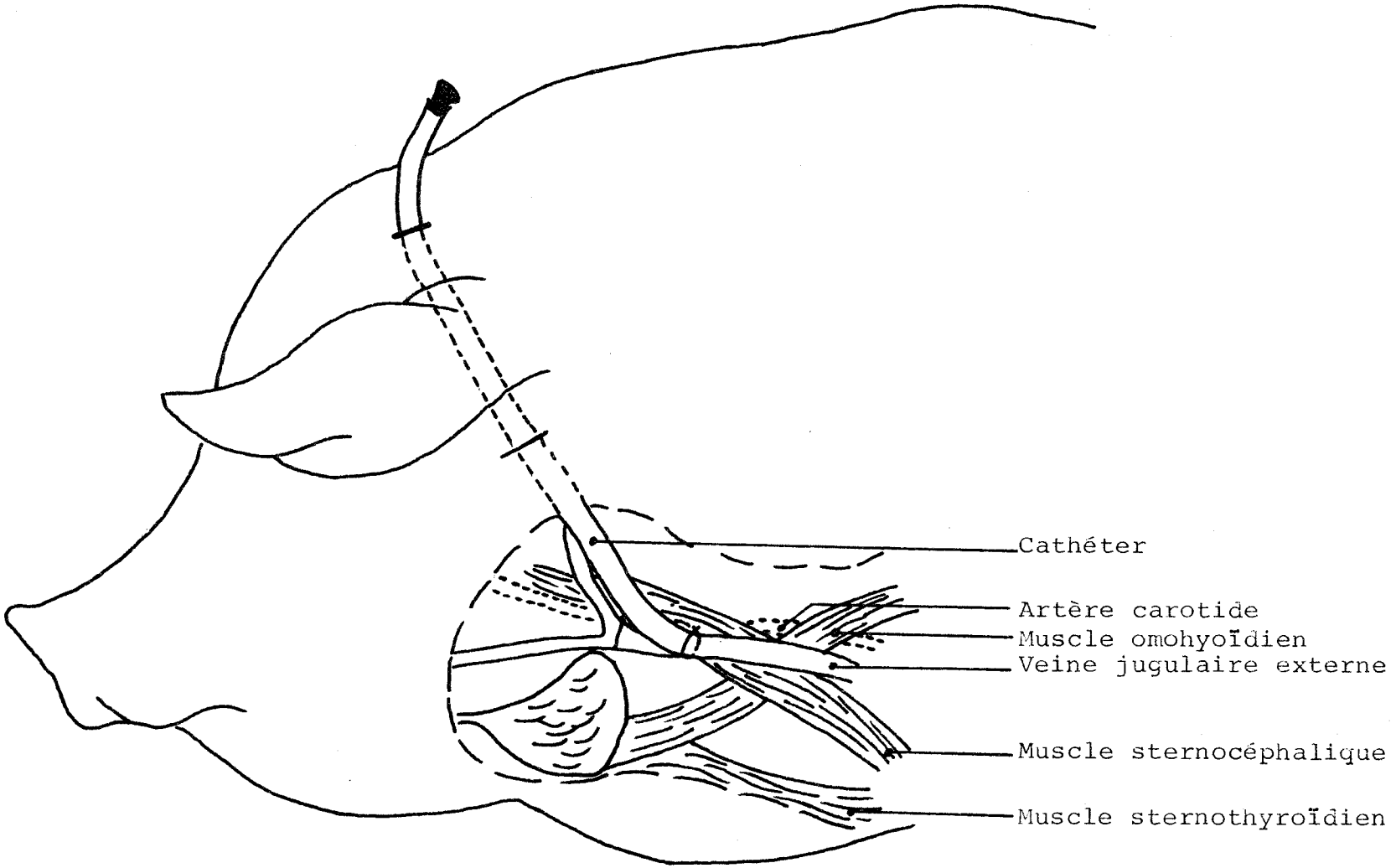

Cathéter
Artère carotide
Muscle omohyoïdien
Veine jugulaire externe
Muscle sternocéphalique
Muscle sternothyroïdien

Figure 5

BOS

pince jusqu'à une boutonnière pratiquée au bistouri au milieu de la peau du cou. On s'assure que le cathéter ne fait pas de plis et en le passant à nouveau sous la peau, on le ressort par une seconde boutonnière ouverte au niveau de l'oreille. L'opération se termine en refermant les ouvertures par des points de suture et en fixant le cathéter au plan peaucier au niveau de la seconde boutonnière. Avant de replacer l'animal dans sa cage, chaque plaie est soignement désinfectée avec une solution de Dakin. La couverture antibiotique est assurée par injection intramusculaire de Streptomycine ou d'un million d'unités de Pénicilline le jour de l'intervention et une seconde le lendemain.

5 à 6 heures après l'opération le porc se réveille, 48 heures après l'expérimentation pourra commencer.

2 - Nutrition parentérale complète :

Dans la première partie de notre propos, nous avons vu que trois types d'émulsions ont été utilisées dans notre expérimentation :

- Le Lipiphysan 10 %.
- L'Intralipid 20 %.
- Le Trivémil.

Ces trois préparations sont différentes quant à leur composition et au taux de chacun des constituants. Le trivémil est la seule émulsion à l'heure actuelle à contenir, en plus des lipides, des acides aminés. Cette particularité en fait une émulsion complète puisqu'elle apporte les trois nutriments : Lipides.Glucides.Protides.

Compte-tenu de ces différences, le volume à administrer

a été calculé, pour chaque émulsion, en fonction de la quantité de triglycérides apportés. A la suite des travaux de BERG G. et coll. ( 47 ) et pour tenir compte des taux recommandés pour l'Homme, un apport de 3 g de triglycérides par kg et par jour a été retenu pour notre travail. Ces 3 g/kg de triglycérides représentent environ 30 % de l'apport calorique total sous forme lipidique, ( taux qui est en parfait accord avec les valeurs recommandées chez l'Homme par les différents organismes internationaux de la santé).

Dans le cas du Lipiphysan et de l'Intralipid, l'apport azoté est obtenu par du " Trophysan glucidique concentré" dont le volume à employer est basé sur la quantité d'azote apportée. Cet apport correspond environ pour les 3 émulsions à 100 g de protéines par 24 heures. Là aussi ce taux proteique correspond tout à fait aux quantités recommandées chez l'homme.

Compte - tenu du Sorbitol apporté soit par le Trophysan glucidique concentré soit par le Trivémil, le complément à 2000 kcal est assuré par du sérum glucosé hypertonique à 30 %.

Le volume des différentes solutions est reporté dans le tableau 3 page 40 .

Les différentes émulsions ne renfermant que du Tocophérol, le complément vitaminique est assuré par 2 ml d'un Hydrosol polyvitaminé " ROCHE " dont la composition est la suivante :

- Axérophtol vit. A 5000 UI
- Ergocalciférol vit.D2 1000 UI
- Tocophérol vit.E 70 mg
- Thiamine vit.B1 2mg

TABLEAU 3

REPARTITION DES DIFFERENTS SOLUTES EN FONCTION DE L'EMULSION

| TRIVEMIL | | INTRALIPID | | LIPIPHYSAN | |
|---|---|---|---|---|---|
| TRIVEMIL 1700 ml | 1720 kcal | INTRALIPID 20% 325 ml | 650 kcal | LIPIPHYSAN 10% 650 ml | 800 kcal |
| Triglycérides 76,5 g | | Triglycérides 65 g | | Triglycérides 65 g | |
| | | | | Sorbitol 32,5 g | |
| | | TROPHYSAN GLUCOSE CONC. 1450 ml | 1050 kcal | TROPHYSAN GLUCOSE CONC. 1240 ml | 900 kcal |
| Sorbitol 170 g | | Sorbitol 145 g | | Sorbitol 124 g | |
| Protéines 90 g | | Protéines 117 g | | Protéines 100 g | |
| SERUM GLUCOSE 30 % 250 ml | 300 kcal | SERUM GLUCOSE 30 % 250 ml | 300 kcal | SERUM GLUCOSE 30 % 250 ml | 300 kcal |
| | 2020 kcal | | 2000 kcal | | 2000 kcal |

BUS LILLE

- Riboflavine vit. B2 1,5 mg
- Ac panthoténique vit. B5 4 mg
- Pyridoxamine vit. B6 2 mg
- Nicotinamide vit. PP 10 mg
- Ac Ascorbique vit. C 50 mg

Enfin cette alimentation parentérale est complétée par l'apport de minéraux et notamment de sodium et de potassium. Les Vitamines, le sodium et le potassium sont ajoutés au sérum glucosé hypertonique.

Glucides, protides et lipides sont administrés simultanément par l'intermédiaire de raccords en Y comme le montre la figure 6. p. 42.

Les pores sont placés sur un support métallique garni de toile pendant toute la durée de la perfusion. La vitesse d'écoulement est réglée de telle façon que les lipides soient administrés en 8 heures.

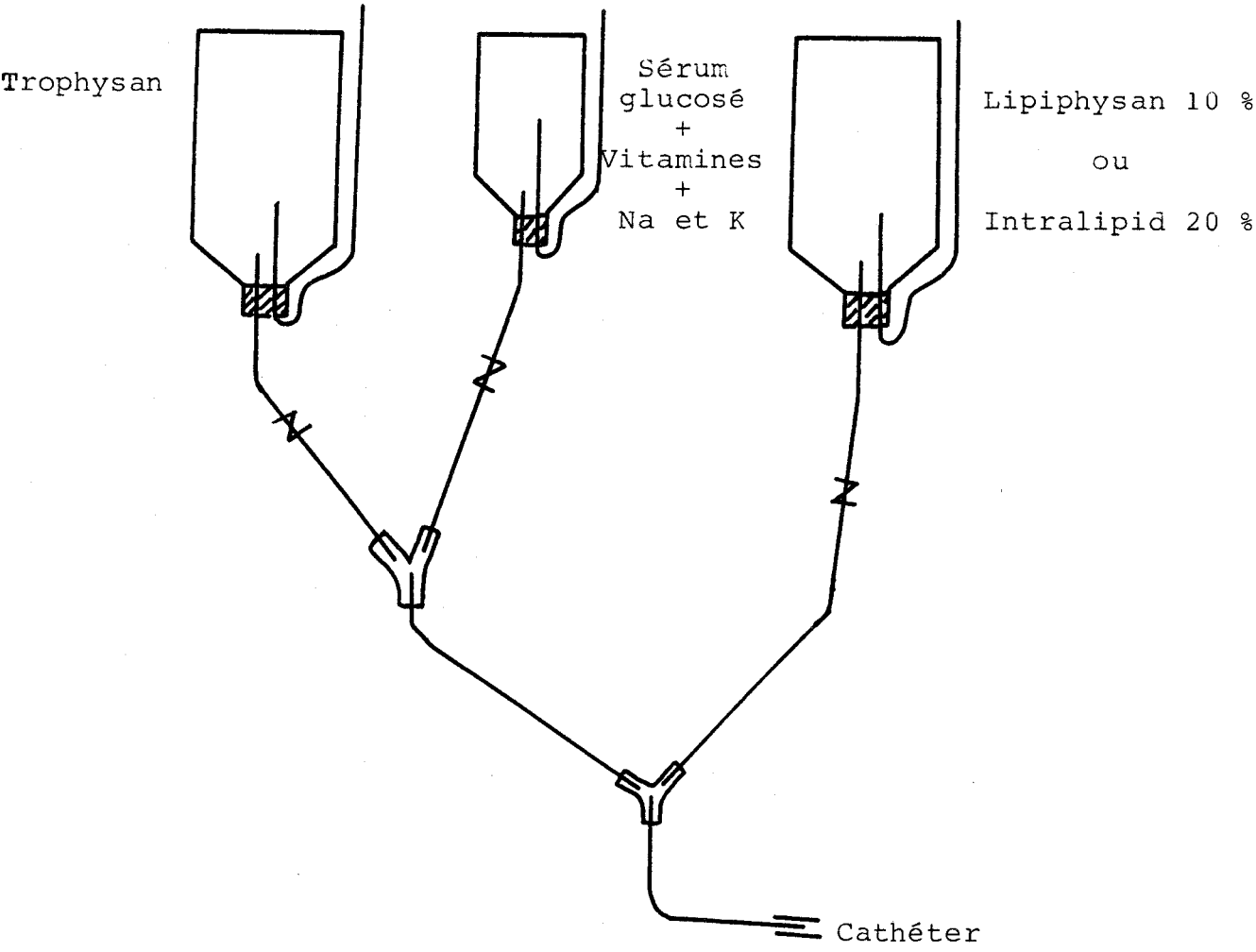
### 3 - Dosages effectués en cours d'expérimentation :

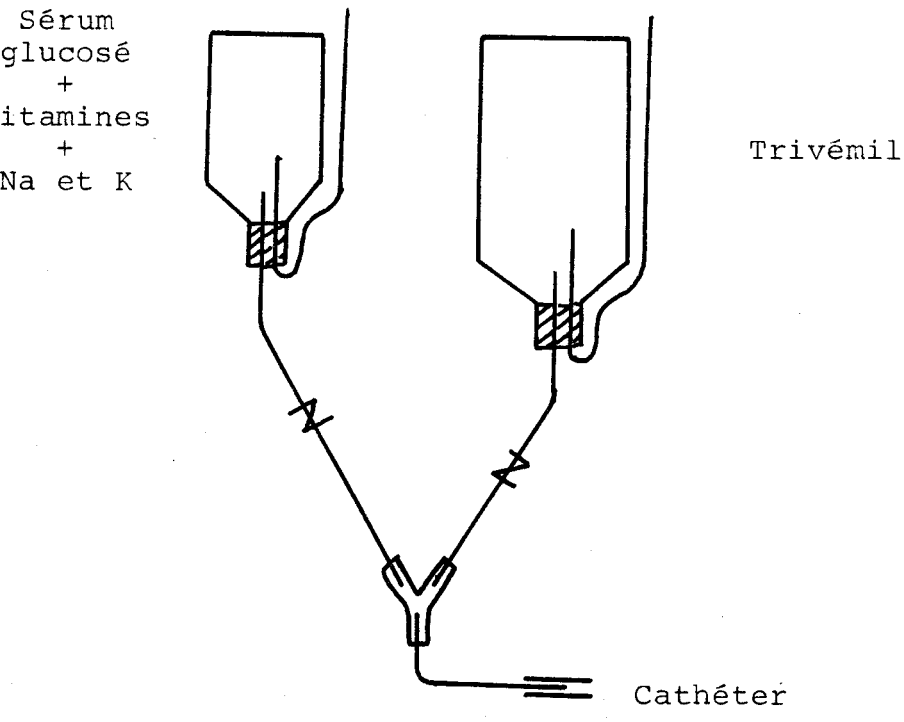
Initialement nous avions envisagé 3 durées d'expérience pour chacune des émulsions, avec la répartition suivante pour les animaux :

- 3 porcs Intralipid
- 3 porcs Lipiphysan
- 3 porcs Trivémil
- 2 porcs Témoins

Chaque émulsion étant administrée pendant 7 jours au premier animal, 14 jours au second et 28 jours au troisième. Or en cours d'expérimentation nous nous sommes aperçus que ce protocole ne pouvait être

Figure 6




BUS LILLE

Schéma des branchements en fonction de l'émulsion utilisée

maintenu tel quel. En effet, le premier porc soumis au Lipiphysan est mort à la fin du 7ème jour de traitement, l'étude de cette émulsion a donc été limitée à une semaine et sur deux animaux.

Le premier porc recevant du Trivémil a été sacrifié après 14 jours de perfusion , son état ictérique étant incompatible avec l'administration prolongée de lipides. Afin de vérifier cette observation, un second porc est soumis au Trivémil pendant la même durée. Enfin selon le protocole initial, un troisième porc reçoit pendant 7 jours cette émulsion.

Seul l'Intralipid est utilisé dans les conditions fixées au départ.

Une question reste toutefois en suspens : Quelle peut-être l'influence de l'immobilité complète de l'animal pendant 8 heures par jour ?

Afin de lever cette incertitude, les deux témoins sont traités différemment. L'un est sacrifié après la semaine d'adaptation à 2000 kcal en alimentation " per os ". Le second subit l'intervention avec pose du cathéter et est soumis quotidiennement pendant 8 heures à des perfusions de sérum glucosé isotonique représentant 25 % de la ration calorique. Le complément à 2000 kcal étant donné le soir dans la cage sous forme de granulés préparés industriellement.

La nouvelle répartition des animaux en fonction de l'émulsion et dans le temps est donc la suivante :

- 1 porc Intralipid 28 jours : I1
- 1 porc Intralipid 14 jours : I2
- 1 porc Intralipid 7 jours : I3

- 2 porcs Trivémil 14 jours : T1 et T2
- 1 porc Trivémil 7 jours : T3

- 2 porcs Lipiphysan 7 jours : L1 et L2

- 1 porc Témoin perfusé : A1
- 1 porc Témoin sans perfusion : A2

Le premier jour, puis tous les trois jours des prélèvements sanguins sont effectués avant le début de la perfusion. Sur ces prélèvements de nombreux dosages sont effectués : taux de sodium et de potassium, bilirubinémie, taux de transaminases, de phosphatases alcalines, urémie, glycémie; étude hématologique et enfin dosage des constituants lipidiques (triglycérides et cholestérol).

L'expérience a montré que les ionogrammes, les taux d'urée et la glycémie ne sont pas modifiés quelque soit l'émulsion et la durée de la perfusion. Nous ne reporterons donc dans le tableau 4 page45 que les éléments qui subissent des variations, exception faite des constituants lipidiques que nous analyserons ultérieurement compte-tenu de la nature

TABLEAU 4

VARIATIONS DES CONSTITUANTS SERIQUES

| | TRIVEMIL | | | INTRALIPID 20 % | | | | LIPIPHYSAN 10 % | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1er Jour | 7e Jour | 14e Jour | 1er Jour | 7e Jour | 14e Jour | 28e Jour | 1er Jour | 7e Jour |
| Bilirubine Totale mg/l | $T_1$ 2<br>$T_2$ 2<br>$T_3$ 2 | 2<br>3<br>3 | 128<br>41 | $I_1$ 1<br>$I_2$ 2<br>$I_3$ 3 | 2<br>1<br>3 | 2<br>1 | 2 | $L_1$ 3<br>$L_2$ 1 | 63<br>4 |
| Bilirubine Directe mg/l | $T_1$<br>$T_2$ | | 79<br>12 | | | | | $L_1$<br>$L_2$ | 15 |
| S G O T m.UI/ml | $T_1$ 21<br>$T_2$ 13<br>$T_3$ 28 | 40<br>35<br>510 | 570<br>106 | $I_1$ 11<br>$I_2$ 12<br>$I_3$ 20 | 15<br>7<br>21 | 6<br>25 | 12 | $L_1$ 29<br>$L_2$ 25 | 510<br>55 |
| S G P T m.UI/ml | $T_1$ 19<br>$T_2$ 9<br>$T_3$ 32 | 9<br>4<br>150 | 30<br>16 | $I_1$ 8<br>$I_2$ 16<br>$I_3$ 19 | 11<br>9<br>15 | 4<br>10 | 7 | $L_1$ 9<br>$L_2$ 22 | 56<br>13 |
| Globules Rouges | $T_1$<br>$T_2$ 6400000<br>$T_3$ 6300000 | 6900000<br>5800000 | 2300000<br>3950000 | $I_1$ 5900000<br>$I_2$ 5500000<br>$I_3$ 7300000 | 5100000<br>5300000<br>6700000 | 4200000<br>4000000 | 4600000 | $L_1$ 6500000<br>$L_2$ | 6300000<br>5350000 |
| Globules Blancs | $T_1$<br>$T_2$ 9100<br>$T_3$ 15600 | 14700<br>8500 | 23400<br>14600 | $I_1$ 11500<br>$I_2$ 7000<br>$I_3$ 11900 | 15600<br>11300<br>13300 | 9000<br>6300 | 7630 | $L_1$ 13000<br>$L_2$ | 11900<br>8700 |
| Hémoglobine | $T_1$<br>$T_2$ 11,5<br>$T_3$ 12,5 | 11,7<br>10 | 5,2<br>10,9 | $I_1$ 11,7<br>$I_2$ 13,6<br>$I_3$ 13,8 | 10<br>12,1<br>10,6 | 8,4<br>4,1 | 8,4 | $L_1$ 14,6<br>$L_2$ | 12,5<br>10 |

BUS LUC

même de nos travaux.

Par souci de clarté, nous ne présenterons les résultats des bilans sériques qu'aux temps 0-7-14 et 28 jours suivant le cas, éliminant ainsi tous les dosages intermédiaires. Nos travaux étant essentiellement orientés vers l'étude lipidique, les résultats des dosages sériques seront exposés mais non commentés ni interprétés.

a - Taux de bilirubine :

- Avec l'Intralipid; le taux de bilirubine est parfaitement constant même au bout de 28 jours.

- Le Trivémil induit par contre une brusque augmentation de la bilirubine vers le 12 ème jour. Bien que les animaux se comportent un peu différemment, il n'en reste pas moins que les variations existent dans les deux cas et qu'elles aillent dans le même sens.

- Quant au Lipiphysan les observations sont divergentes : état stationnaire pour L2 alors que l'on note une brusque élévation pour L1 à 7 jours. Mais cette variation est certainement en relation avec la mort survenue chez cet animal après une semaine de traitement.

L'influence des émulsions lipidiques sur la bilirubinémie est très controversée, LEVENSON S.M. ( 48 ) cite de nombreux cas d'hyperbilirubinémie chez des sujets ayant reçu une émulsion à base d'huile de coton et de phosphatides de soja, alors que LARSEN V. et BROCNER J. ( 49 ) ne notent aucune variation chez des patients recevant en période post-opératoire pendant 5 jours des émulsions à base d'huile de coton ou d'huile de soja. Le facteur temps semble n'avoir aucune influence sur la bilirubinémie puisque des chiens soumis à des perfusions pendant 54 jours ( COHN I.J.

et coll. ( 50 ) et HARTWIG Q.L. et coll. ( 51 ) ne modifient pas leur taux de bilirubine sérique.

b - Les transaminases :

-Comme pour la bilirubine, l'Intralipid n'induit aucune modification des taux de S.G.O.T et S.G.P.T quelque soit le type de perfusion.

- Par contre on observe une élévation des S.G.O.T dès les premiers jours, suivie vers le sixième et le douzième par une ascension des S.G.P.T avec le Trivémil.

- La brusque augmentation des transaminases pour l'un des porcs soumis au Lipiphysan est certainement là aussi liée à la mort de cet animal.

L'administration d'une émulsion à base d'huile de soja chez 5 chiens pendant 28 jours consécutifs ( THOMPSON S.W. et coll. ) ( 52 ) a provoqué une élévation des S.G.P.T chez deux d'entre eux. Des biopsies hépatiques effectuées sur ces animaux, pendant et après la perfusion, n'ont pas montré de nécroses à ce niveau. L'augmentation de la S.G.P.T ne reflèterait donc pas une atteinte hépatique. Ces résultats ont été confirmés par de nombreux auteurs ( SINGLETON W.S et coll. ( 53 ), ECKART J. et coll. ( 54 ), LEE H.A et coll. ( 55 ).

De même pour les S.G.O.T les travaux de KERN F.Jr et coll. ( 56 ) montrent que l'administration d'émulsions lipidiques artificielles à base d'huile de coton n'entrainent pas systématiquement de variation du taux des transaminases.

c - Numération globulaire :

On note une chute des globules rouges et du taux d'hémoglobine au bout de 14 jours chez les porcs recevant soit de l'Intralipid, soit du Trivémil, avec cependant une diminution plus importante avec le Trivémil. L'hyperleucocytose est surtout très nette avec le Trivémil. La forte augmentation de la bilirubinémie et la diminution du taux d'hémoglobine laisse présumer une anémie de type hémolytique pour cette émulsion.

Les résultats concernant l'Intralipid confirment ceux de WRETLIND A. ( 57 ) chez le chien.

Quant au Lipiphysan, il ne semble pas affecter la numération globulaire au bout d'une semaine. Cette observation est également valable pour les deux autres émulsions au bout du même laps de temps.

# CHAPITRE II

## METHODES D'ANALYSES

Après la dernière perfusion, les animaux sont laissés 18 heures à jeûn avant d'être sacrifiés. Nous prélevons une partie du foie, du coeur, du rein, du poumon, de la rate et du tissu adipeux en vue de l'analyse lipidique tissulaire. Ces fragments sont aussitôt, après prélèvements, plongés dans du sérum physiologique maintenu à + 4 ° C.
L' autopsie terminée, les fragments d'organes sont séchés, pesés et placés dans un mélange chloroforme-méthanol ( 2 / 1 - V / V ).

Nous nous bornerons dans ce chapitre à présenter les différentes méthodes d'analyses utilisées au cours de notre étude ; Les détails techniques de chacune d'elles seront rassemblés à la fin de notre propos dans un appendice technique.

### 1 - Extraction des lipides :

Les lipides totaux sont extraits par la méthode FOLCH J. ( 58 ). Les organes sont broyés mécaniquement dans le mélange chloroforme-méthanol à l'ultraturax. Le méthanol dénature les proteines et le chloroforme favorise la mise en solution des lipides totaux. Après addition d'eau et mélange, on obtient un déphasage avec passage dans la phase hydroalcoolique supérieure des substances hydrosolubles, la phase inférieure chloroformique renferme les lipides totaux à l'état pur. Une fraction aliquote de cette phase chloroformique est évaporée en vue de la détermination

pondérale des lipides totaux de l'extrait. Le reste de l'extrait est également concentré par évaporation et aussitôt redissout dans un volume connu d'une solution chloroformique de B.H.T*; la solution lipidique est placée sous azote à - 20 ° C dans l'attente des différents dosages.

## 2 - Dosage des triglycérides et du cholestérol :

Que ce soit à partir de sérum ou de lipides tissulaires, on extrait les triglycérides avec de l'isopropanol qui assure à lui seul la déproteinisation ( dans le cas du sérum ) et la mise en solution des triglycérides. Le dosage repose sur la réaction suivante :

$$\text{Triglycérides} \xrightarrow[\text{KoH alcoolique}]{\text{(saponification)}} \text{Glycérol} \xrightarrow[\text{(périodate de Na)}]{\text{(oxydation)}} \text{Formaldéhyde}$$

$$\text{Formaldéhyde} \xrightarrow[\text{+ Acétylacétone}]{\text{Acétate d'ammonium}} \text{3,5 diacétyl - 1-4 dihydrolutidine (composé fluorescent)}$$

Le cholestérol total est extrait par le même procédé que les triglycérides et dosé selon la réaction de LIEBERMANN
Ces deux types de dosages sont effectués par une méthode semi-automatique sur autoanalyseur Technicon II ( 59 ).

## 3 - Séparation des lipides en classes par chromatographie sur couche mince de Gel de Silice :

---

* B. H. T. : Butyl-hydroxy-Toluène

a - Les lipides neutres :

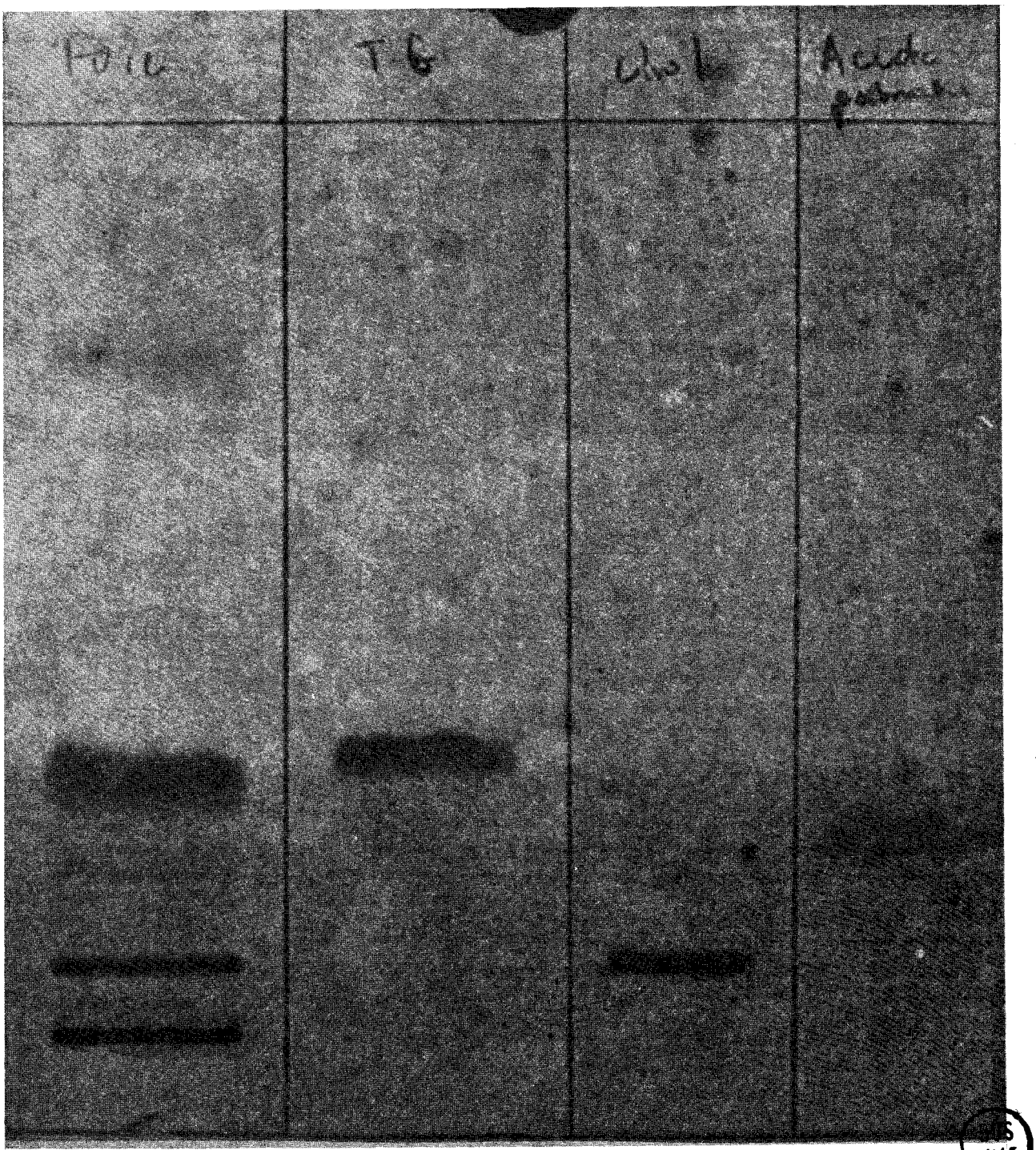
Le solvant de migration retenu pour la séparation des lipides neutres, sur plaque de gel de silice G de 0,3 mm d'épaisseur, est un mélange d'Ether de pétrole /Ether éthylique / Ac Acétique / (90/10/1 - V/V/V.).

Une migration de 13 cm suffit pour séparer les principales fractions (figure 7 page 52). BOWYER D.E. et coll. (60) MALINS D.C. et coll. (61) ont montré que cette technique n'altérait pas les acides gras. Les vapeurs d'iode ou une solution alcoolique de rhodamine seront utilisées pour la révélation des taches, (la révélation par l'iode ne convient pas pour l'étude ultérieure de la composition en acide gras par chromatographie en phase gazeuse).

b - Les Phospholipides :

Si la séparation par chromatographie d'adsorption des différentes classes de lipides neutres pose peu de problèmes, la séparation des lipides phosphorés est par contre beaucoup plus délicate, la grande diversité des systèmes d'élution en rend bien compte. Les différentes méthodes décrites peuvent être classées en deux groupes :

α - Séparation monodimentionnelle sur plaque de gel de silice G dont le système de migration le plus classique est le mélange Chloroforme / Métanol / eau. (65/25/4 - V/V/V). Cette méthode très acceptable dans le cas du sérum n'est pourtant pas tout à fait satisfaisante au niveau tissulaire, car certaines classes de phospholipides ont des vitesses de migration tellement voisines que leur séparation est impossible; ainsi par exemple, la phosphatidyl - éthanolamine




A : Ester de cholestérol
B : Triglycérides
C : Acides gras libres
D : Diglycérides
E : Cholestérol libre
F : Monoglycérides
G : Phospholipides

Figure 7

Séparation chromatographique des lipides neutres

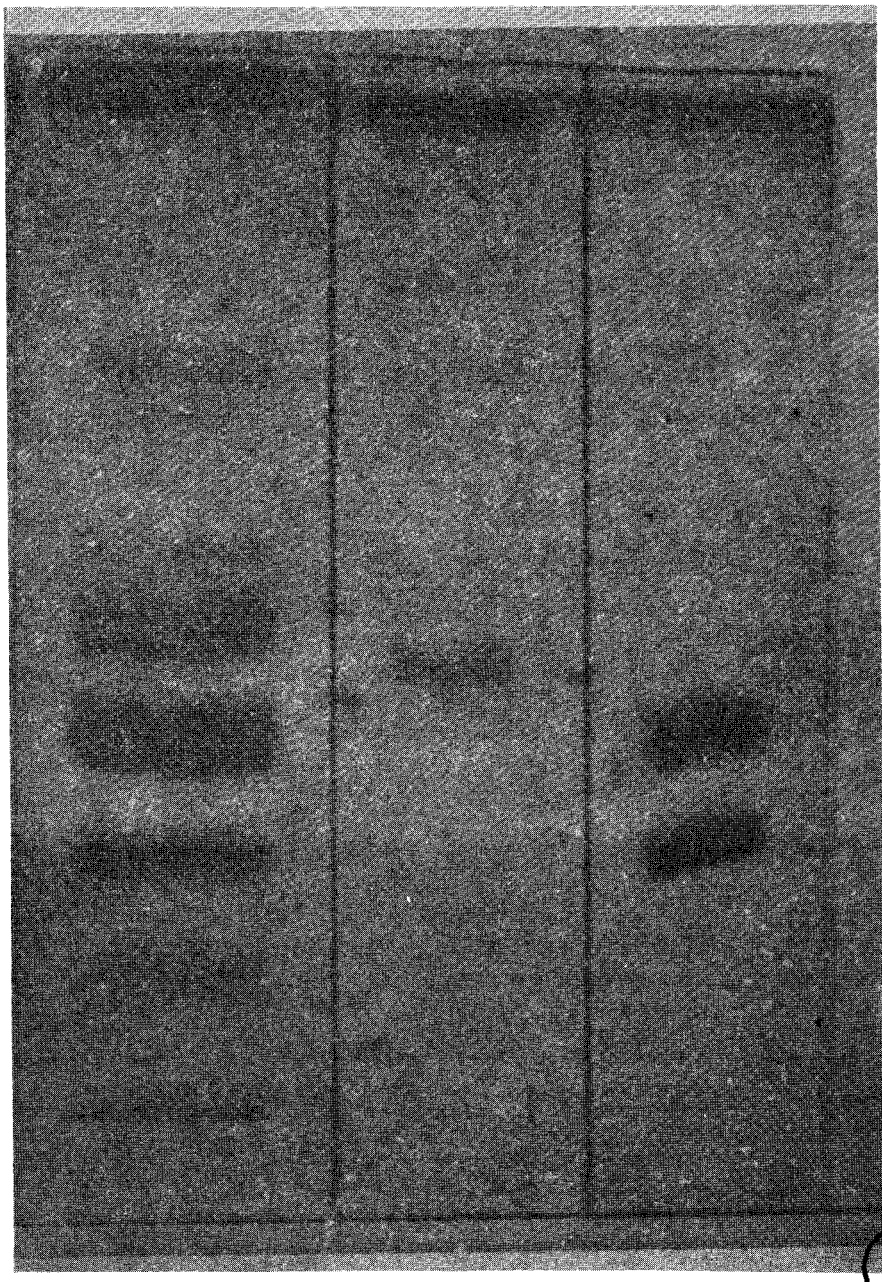
est contaminée par la phosphatidyl- sérine, la phosphatidyl-choline est contaminée par le phosphatidyl-inositol. Par contre cette méthode présente l'avantage de bien individualiser le diphosphatidyl-glycérol qui migre presque au niveau du front de solvant.

Au système classique qui a été mentionné précédemment nous avons préféré le mélange : Chloroforme / Méthanol / Ammoniaque7N ( 115 / 45 / 7,5 - V/V/V ) préconisé par ROUSER G. ( 62 ) qui a le mérite de bien individualiser la phosphatidyl-éthanolamine, la phosphatidyl-choline et la sphyngomyéline comme le montre la figure ( 8 ) p 54. par contre, pour ne citer que ces deux classes, phosphatidyl-sérine et phosphatidyl-inositol migrent au même niveau. La séparation dans une seule dimension n'offre donc que des possibilités limitées compte tenu des très nombreuses classes de lipides complexes dont les principales sont représentées dans la figure ( 9 ) p 55.

β- L'assossiation de deux systèmes sur une même plaque permet une meilleure résolution. Cette chromatographie dans deux dimensions avec deux systèmes de solvants différents a connu un grand essor après les travaux de ROUSER G. ( 63 ) qui a décrit un grand nombre de combinaisons de solvants pour l'étude des lipides tissulaires. Il a en outre montré que les meilleures résolutions étaient obtenues avec l'utilisation du couple : système acide dans une dimension- système basique ou neutre dans la seconde.

Parmi tous les systèmes proposés, quatre ont surtout retenu l'attention de cet auteur :

- Chloroforme / Méthanol / eau ( 65 /25/4 - V/V/V ).



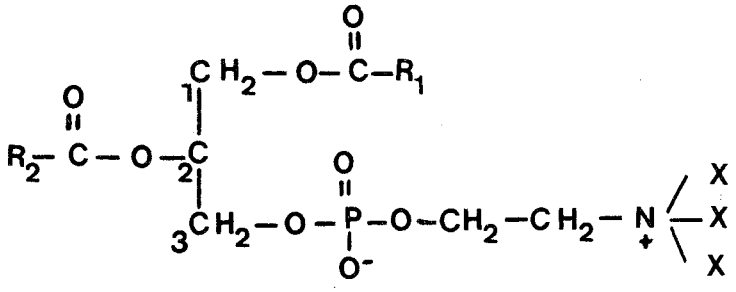
BUS ULLE

A : Lipides neutres
B : Cardiolipide
C : Phosphatidyl-éthanolamine
D : Phosphatidyl-choline
E : Sphingomyéline
F : Phosphatidyl-sérine + Phosphatidyl-inositol
G : Point de dépôt

Figure 8

Séparation monodimentionnelle des phospholipides

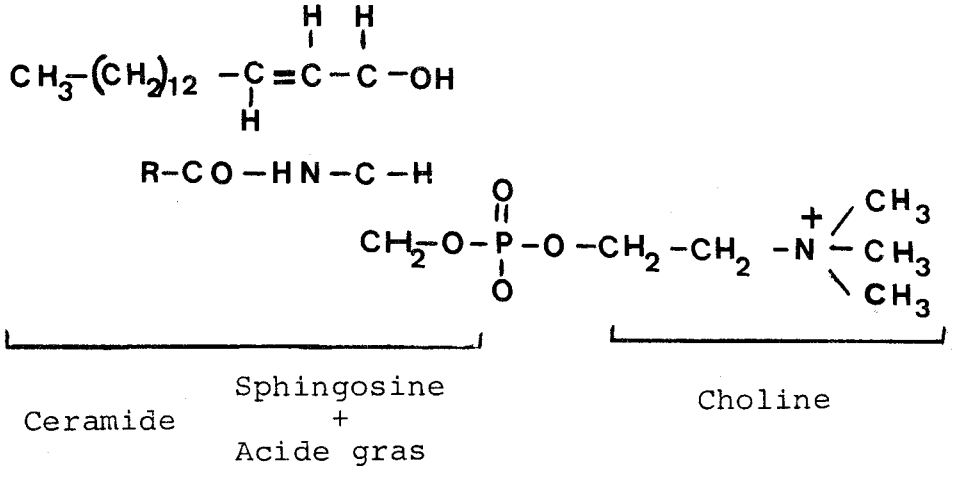
Figure 9



Glycérophospholipide

X = $CH_3$ Phosphatidyl-choline

X = H Phosphatidyl-ethanolamine




SPHINGOMYELINE

PRINCIPAUX PHOSPHOLIPIDES

- n butanol / acide acétique / eau ( 60 / 20 / 20 - V/V/V ).

- Chloroforme / Méthanol / Solution aqueuse de NH4 OH à 28 % ( 65 / 35 / 5 - V/V/V ).

- Chloroforme / Méthanol / Acétone / Acide acétique/ eau / ( 10 / 2 / 4 / 2 / 1 - V/V/V/V/V/ ).

En utilisant toutes les permutations possibles de ces systèmes pris deux à deux, ROUSER G. a pû isoler une trentaine de classes de lipides complexes.

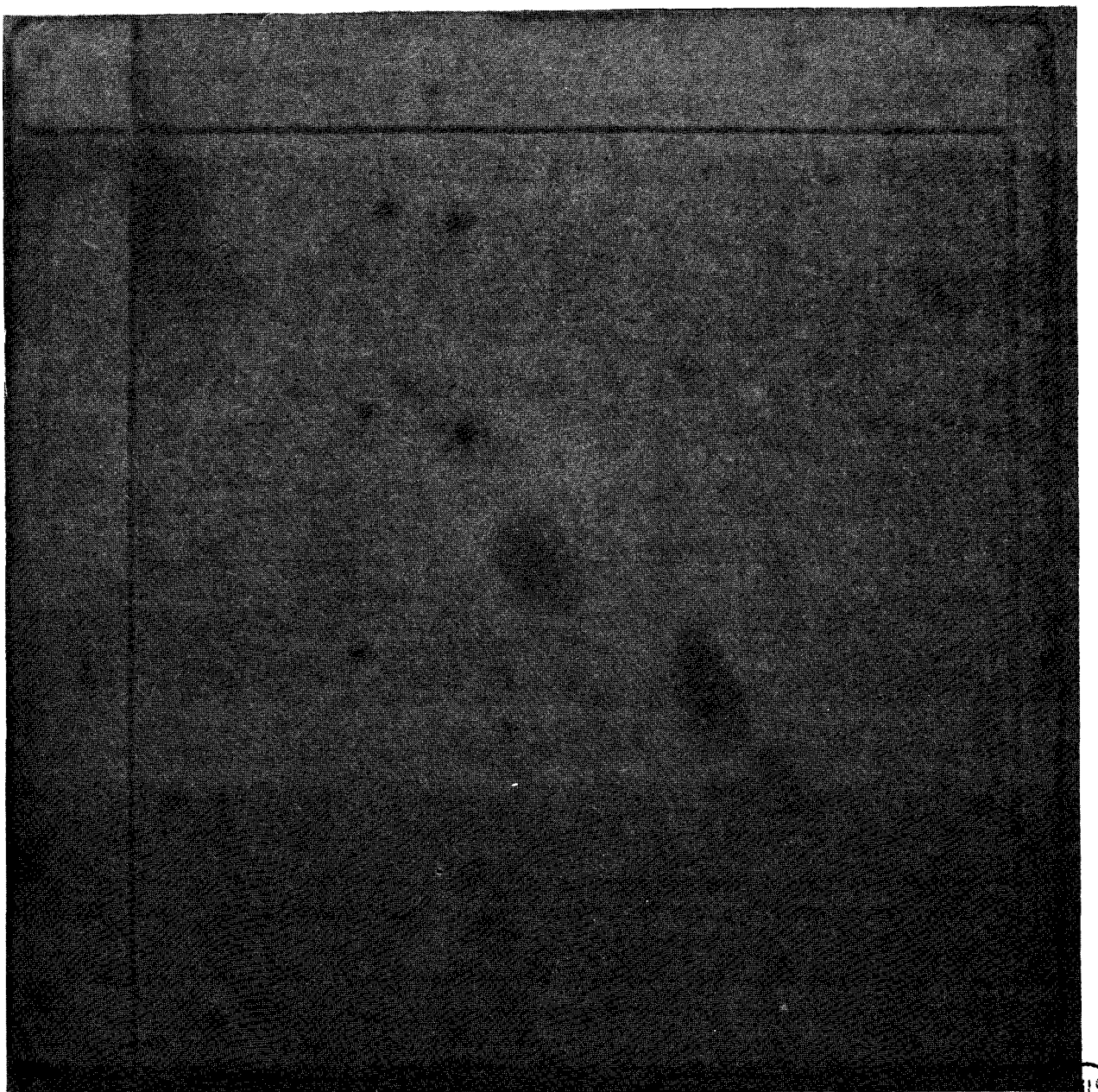
Dans le cas de la chromatographie bidimentionnelle, l'utilisation du Gel H ( exempt de liants ) semble préféré au Gel G par de nombreux auteurs, mais pour des raisons techniques : ( friabilité du Gel H, moindre adhérence à la plaque, difficulté de sécher le dépôt sous courant d'azote sans "trouer"le gel ) notre préférence a été en faveur du Gel G. Après de très nombreux essais, notre choix du couple de mélange de solvants s'est arrêté sur les systèmes suivants :

= Chloroforme / Méthanol / Solution de NH4 OH 7N ( 115 / 45 / 5 - V/V/V )

pour la première dimension.

= Chloroforme / Méthanol / Acétone / Acide Acétique / eau /. (10 / 2/4/2/1 - V/V/V/V/V/ ) - pour la seconde dimension.

La figure ( 10 )p 57 rend compte des séparations



SUS
LILLE

1 - Lipides neutres
2 - Acide phosphatidique
3 - Cardiolipid
4 - Phosphatidyl-éthanolamine
5 - Phosphatidyl-choline
6 - Phosphatidyl-sérine
7 - Phosphatidyl-inositol
8 - Sphingomyéline
9 - Lysolécithine

Figure 10

Séparation bidimentionnelle des phospholipides

obtenues au niveau des différentes classes de lipides phosphorés que nous avons identifiées à l'aide de substances de référence purifiées et par des révélations spécifiques.

La pulvérisation des plaques par la ninhydrine en solution dans le butanol saturé d'eau suivie d'un chauffage à 120 ° C pendant 10 mn à l'étuve permet de mettre en évidence les substances à groupement $NH_2$- La réaction positive caractérisée par des taches roses ou rouges révèle ainsi la présence des phosphatidyl-éthanolamine et phosphatidyl-sérine.

Les phosphatidyl-choline et sphyngomyéline sont colorées en jaune orangé par le réactif de Dragendorff WAGNER,H. et coll.(64). Ce réactif caractérise la choline. Cette seconde révélation peut s'éffectuer à froid après la ninhydrine.

Notre expérience personnelle nous a certes permis d'apprécier les avantages de ce type de séparation, mais également ses inconvénients.

- La technique est très longue ( 2 à 3 fois plus longue qu'une séparation en monodimension ).

- La reproductibilité n'est pas parfaite, et dans certains cas, on peut encore observer des interférences entre les taches. Le séchage et la réactivation de la plaque entre les deux étapes de chromatographie ont en effet une importance primordiale sur la reproductibilité de la méthode. Ces facteurs ont été en partie maitrisés en plaçant la plaque dans une enceinte balayée par un courant d'azote pendant une dizaine de minutes après la première migration. L'utilisation de cuves permettant

un conditionnement préalable des plaques à un taux d'humidité relative controlée permettrait d'assurer une parfaite reproductibilité de la méthode. En effet, dans le cas des lipides complexes, il s'agit non plus seulement d'une chromatographie d'adsorption, mais à la fois d'une chromatographie d'adsorption et d'une chromatographie de partage d'où l'importance du taux de phase aqueuse sur la plaque. Le choix de l'une ou l'autre de ces deux méthodes ( mono ou bidimension ) est fonction de la nature des travaux envisagés.

Ne nous étant intéressé qu'aux aspects qualitatifs et quantitatifs des variations de deux classes de lipides phosphorés ( phosphatidyl-choline et phosphatidyl-éthanolamine ), l'emploi de la chromatographie monodimentionnelle a parfaitement satisfait à nos exigences.

Ces deux classes ont été retenues car elles représentent à elles seules 70 à 80 % des phospholipides totaux. De plus des composés ont des vitesses de migration suffisamment différentes entre elles et vis à vis des autres composants pour avoir une bonne certitude quant à leur pureté.

4 - Dosage des PL :

La méthode classique de dosage des phospholipides nécessite une minéralisation préalable du phosphore organique puis un dosage du phosphore minéral formé en développant une coloration bleue due à la réduction du molybdate d'ammonium par le vanadate d'ammonium. Connaissant la quantité de phosphore minéral, il est aisé d'en déduire la quantité de

phospholipides en appliquant le facteur 25 couramment utilisé pour faire la convertion. Ceci n'est en fait approximativement valable que pour les phospholipides sériques riches en lécithines. Pour plus de précision, il convient d'utiliser les facteurs spécifiques à chacune des classes.

A cette technique, nous avons préféré la méthode décrite par RAHEJA R. et coll. (65) basée sur le dosage direct du phosphore organique. Par différence avec la précédente, cette technique permet de doser de très faibles quantités de phospholipides ( 25 µg sont dosés avec une grande certitude ). Les figures 11-12-13 pages 61-62-63 montrent la parfaite linéarité de la courbe obtenue après dosage de quantités croissantes de phospholipides.

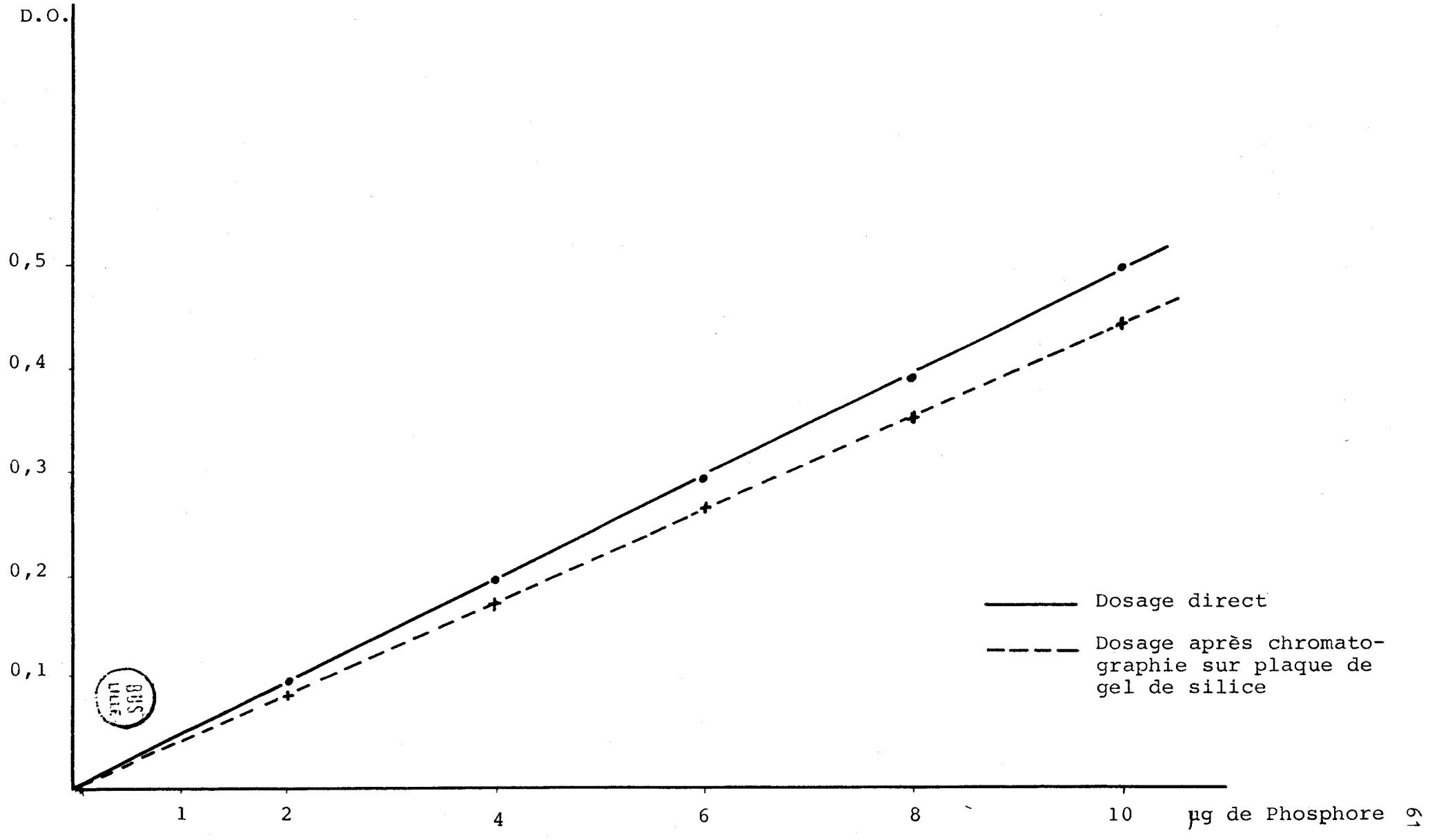
Ce protocole nous a permis de doser les phospholipides totaux dans chacun des organes (les résultats sont exprimés en µg de phosphore par g de tissu en utilisant la courbe d'étalonnage de la lécithine), ainsi que les taux de Phosphatidyl-choline et Phosphatidyl-éthanolamine. L'expérience nous a montré que ces deux composés se comportaient de façon identique; donc là encore la courbe d'étalonnage de la phosphatidyl-choline a été utilisée comme base de calcul.

Remarque :

D'après RAHEJA R., le réactif de coloration peut se conserver 3 mois à + 4° C, or nous nous sommes aperçus, en faisant des tests systématiques toutes les semaines, qu'il était rigoureusement stable pendant 2 semaines, puis son activité diminue progressivement et la reproductibilité de la méthode est altérée. Par contre, en flacon hermétiquement

Figure 11

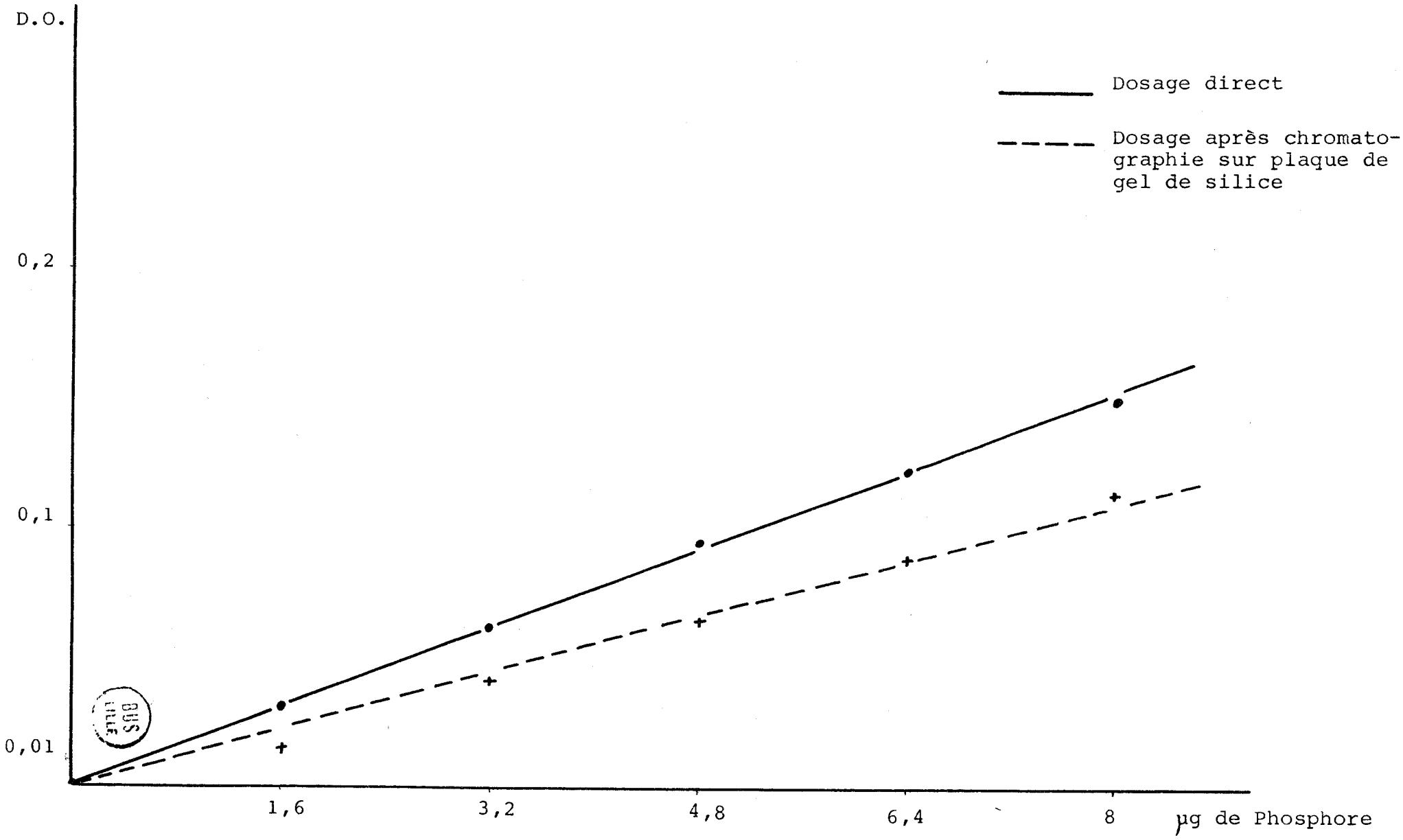
Dosage de la lécithine




BDS LILLE

Figure 12

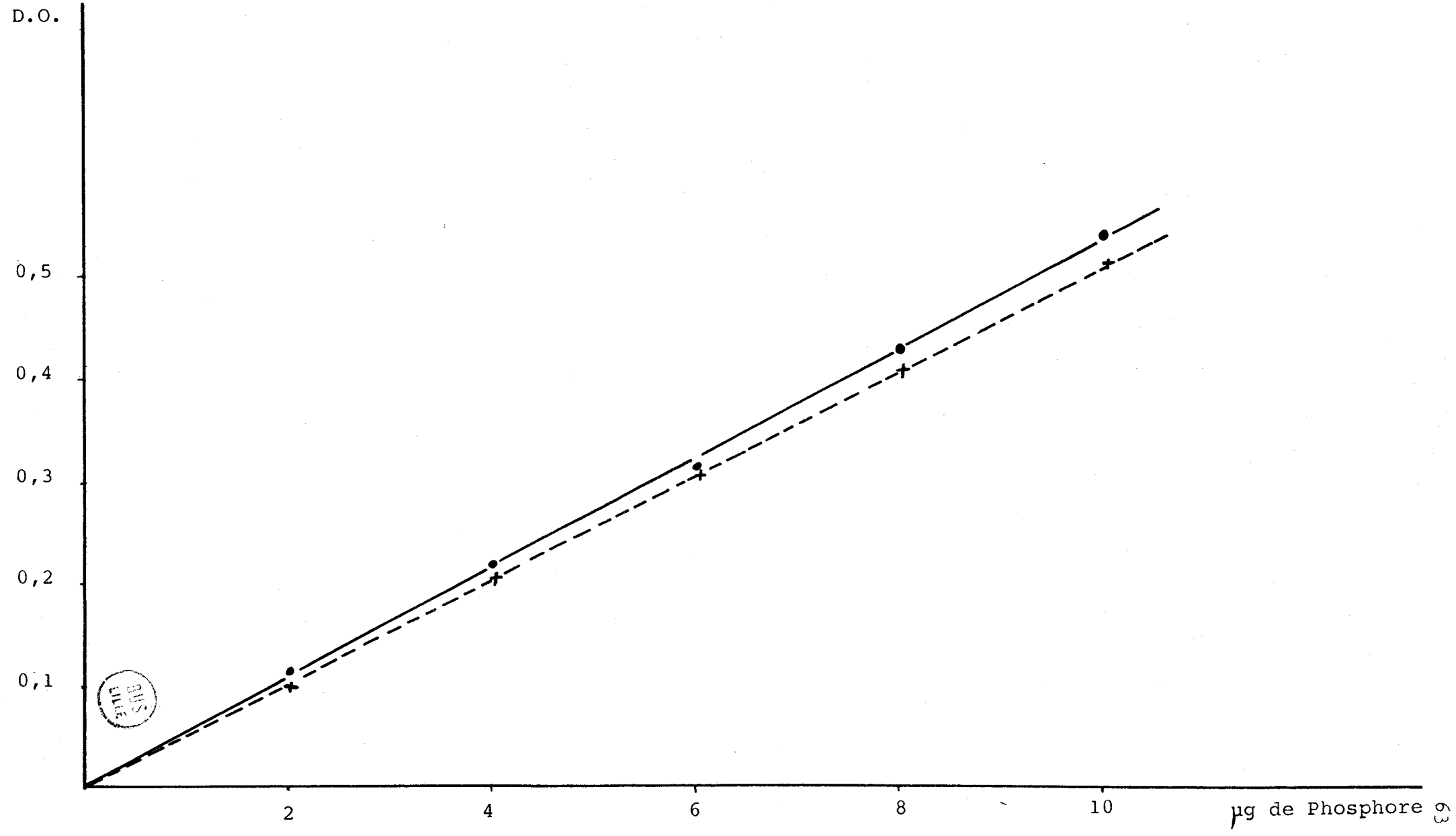
Dosage du cardiolipide




BUS LILLE

Figure 13

Dosage de la sphingomyéline




BIBLIOTHEQUE

clos maintenu à + 4 ° C, sans jamais l'ouvrir, le réactif est effectivement stable pendant 3 mois. Du fait d'une concentration élévée en acide sulfurique, au cours des utilisations successives, le réactif fixe de la vapeur d'eau atmosphérique. La quantité d'eau absorbée est telle qu' au bout de 2 semaines on observe une inactivation partielle du réactif. Pour palier à ce phénomène, il suffit, dès la préparation du réactif terminée, de le répartir dans de petits flacons fermés hermétiquement et placés à + 4 ° C. L'utilisation de chacun d'eux n'excèdera pas quinze jours.

## 5 - Analyse des acides gras constitutifs des différentes classes lipidiques :

L'identification et la répartition des acides gras des différentes classes de lipides se font sous forme d'esters méthyliques par chromatographie gaz-liquide. La fixation d'un groupement méthyle sur la fonction acide des acides gras par une liaison ester permet d'abaisser la température de vaporisation de ces composés et de minimiser les effets d'adsorption sur le support imprégné de phase stationnaire.

### a - Préparation des esters méthyliques :

Deux méthodes peuvent être utilisées :

- L'une nécessite deux étapes : saponification, puis méthylation.

- La seconde permet d'obtenir directement les esters méthyliques à partir des lipides, c'est la transestérification.

## α - Saponification-Méthylation :

Après séparation des différentes classes lipidiques sur plaque de gel de silice, chaque fraction est grattée puis éluée avec le mélange chloroforme-méthanol ( 1 / 1 - V / V ) suivi d'un déphasage avec de l'eau. La phase chloroformique est évaporée et les lipides sont saponifiés à chaud ( 60 à 70 ° C ) pendant deux heures par la potasse alcoolique 2 N. Après refroidissement et addition d'eau distillée, les acides gras sont libérés des savons par HCL 6N et extraits à l'éther éthylique. La phase éthèrée, après lavage jusqu'à neutralité, est évaporée à sec laissant un résidu d'acides gras.

Les acides gras sont estérifiés par chauffage à reflux pendant deux heures en présence de méthanol à 5 % d'$H_2SO_4$ ( P / V ). Après refroidissement, les acides gras estérifiés sont extraits par le mélange heptane-eau ( 1 / 1 - V / V ).

## β - Transestérification :

Sans saponification préalable, les lipides sont chauffés directement en présence de méthanol et d'acide sulfurique pendant deux heures à 70 ° C.

Les esters méthyliques sont ensuite extraits comme précédemment par l'heptane après addition d'eau. Certains auteurs préfèrent un mode de transestérification plus rapide; associant le méthanol avec l'acide chlorhydrique gazeux, le trichlorure de Bore ou le tétrafluorure de Bore ; dans ces derniers cas, un chauffage de quelques minutes suffit.

Pour l'obtention des esters méthyliques, notre choix s'est fixé sur la seconde méthode pour trois raisons :

- La transméthylation peut s'effectuer directement sur le gel de silice contenant la fraction lipidique à étudier. On limite ainsi les pertes dues à l'extraction des lipides fixés sur le gel. L'expérience nous a montré que dans le meilleur des cas, on ne pouvait obtenir une récupération supérieure à 90 % de la totalité des phospholipides fixés sur le gel de silice.

- La transméthylation est beaucoup plus rapide que la première méthode. Ce facteur temps est d'une importance capitale pour les fractions lipidiques renfermant des quantités importantes d'acides gras polyinsaturés, c'est le cas notamment de l'acide-arachidonique ( acide gras à 20 atomes de carbone et 4 doubles liaisons : C 20 : 4 $\omega$ 6 ), contenu en forte proportion dans les phosphatidyl-éthanolamines.

- La saponification peut en outre conduire à des changements de position des doubles liaisons ( isomérisation alcaline ). Par contre cette méthode a l'avantage de ne pas libérer les aldéhydes des plasmalogènes. Ces composés se différencient des autres phosphatides ( lécithines et céphalines ) par la présence d'une liaison éther entre la fonction alcool, en position 1 du glycérol et un aldéhyde. Ces plasmalogènes sont abondants dans tous les tissus et ne sont pas dissociables des autres composés lipidiques par simple chromatographie sur gel de silice.

Dans le cadre de la transméthylation, nous avons testé les différentes méthodes mentionnées précédemment sur des mélanges de triglycérides de synthèse. Il nous est apparu que le meilleur rendement est obtenu avec le méthanol associé à l'acide sulfurique.

Les différentes méthodes que nous venons de décrire sont valables pour toutes les classes de lipides non phosphorés et la plupart des phospholipides. Pour certaines classes de lipides complexes, le protocole de méthylation doit subir quelques modifications : Le temps de chauffage est fonction du type de lipides ( exemple : pour la sphingomyéline il faut environ 16 heures pour rompre la liaison amide entre l'acide gras et la sphingosine.

b - Purification des esters méthyliques :

La transméthylation n'est jamais complète, un faible pourcentage d'acides gras ne sont pas méthylés puisqu'il s'agit d'un équilibre. Il est donc indispensable d'éliminer ces composants avant l'étude en chromatographie Gaz-liquide. Il faut également tenir compte de la présence éventuelle de contaminants provenant notamment des solvants utilisés lors des différentes étapes de séparation. Pour ces deux raisons il nous semble indispensable de purifier les esters méthyliques par chromatographie sur couche mince.

Après extraction des esters méthyliques à l'heptane, le solvant est évaporé et les esters remis en solution chloroformique sont déposés sur des plaques de gel de silice G activées à 110 ° C pendant 10 mn.

La séparation chromatographique des esters est assurée par le benzène. Après migration, les fractions sont révélées par pulvérisation d'une solution éthanolique de rhodamine. La tache d'esters méthyliques, dont la position a été repérée grâce à des étalons, est grattée; le gel de silice est déposé dans une petite colonne à chromatographie dont l'extrémité

inférieure est garnie de laine de verre.

Les esters sont alors élués par du chloroforme dont la polarité est suffisante dans le cas d'esters d'acides gras.

c - Chromatographie gaz-liquide :

L'étude de la composition en acides gras des différentes fractions lipidiques tissulaires retenues a été réalisée sur deux types d'appareils :

- Un appareil VARIAN 1400 à simple colonne équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne de type standard est en acier inox ( 3 mètres de longueur et 3 mm de diamètre ) remplie de diéthylène-glycol-succinate ( D.E.G.S ) à 10 % en poids sur un support inerte chromosorb W de granulométrie 60 / 80 mesh A.W. L'analyse s'effectue à 180 ° C. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont respectivement de 220 ° C et 230 ° C environ. Le débit du gaz vecteur ( azote ) est de 30 ml/mn à la sortie de colonne.

- Un appareil GIRDEL 3000 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire en acier inox ( 50 mètres de longueur et 0,5mm de diamètre ). La phase stationnaire remplissant la colonne est du Carbo-wax 20 M. Injecteur et détecteur sont chauffés à 250°C alors que la colonne est stabilisée à 220 ° C. L'azote est admis à la pression de 0,3 bar à l'entrée de la colonne. L'emploi d'une colonne capillaire permet l'analyse de très faibles quantités d'esters méthyliques et le pouvoir de résolution et beaucoup plus élevé q'avec une colonne standard.

Compte tenu des conditions expérimentales décrites précédemment, le temps d'analyse est réduit puisque des acides gras très longs tel l'acide lignocérique (C24 : 0 ) et l'acide nervonique ( C24 : 1 ). sont élués en moins de 30 mn, alors qu'il faut attendre 120 mn pour les obtenir avec la colonne standard remplie avec du D.E.G.S.

A la lumière de ces observations l'utilisation de la colonne capillaire a été réservée à l'analyse des classes de lipides phosphorés puisque c'est au niveau de ces composés que se trouve la majeure partie des acides gras longs. L'analyse des triglycérides est par contre effectuée sur la colonne standard puisque l'acide gras le plus long que l'on repère au niveau de ces composés est l'acide arachidonique ( C20 : 4 ).

L'évaluation du pourcentage de chacun des acides gras peut être effectué par l'une des trois méthodes suivantes :

- Par triangulation de chaque pic en utilisant les tangentes au point d'inflexion et en calculant la surface du pic$\left(\frac{\text{hauteur.base}}{2}\right)$

- En mesurant la largeur du pic à mi-hauteur et en multipliant par la hauteur.

- Par le produit : temps de rétention absolu que multiplie hauteur du pic.

On exprime les proportions relatives des différents acides gras en calculant le pourcentage des surfaces de chaque pic par rapport à la surface totale des pics retenus. Les résultats sont exprimés en % d'esters méthyliques.

Aucune des méthodes de mesure n'est parfaite, en effet

sur un pic très aplati, il est difficile de tracer la tangente au point d'inflexion ; de même mesurer la largeur à mi-hauteur d'un pic très aigu peut entrainer des erreurs importantes.

### d - Identification des acides gras :

L'identification des acides gras des lipides tissulaires est encore, à l'heure actuelle, un problème difficile à résoudre. Aucune des méthodes proposées, prises isolément, ne permet d'identifier avec une certitude absolue tous les acides gras. Ce n'est que l'utilisation simultanée des principales méthodes décrites ci-dessous qui permet de fournir un faisceau d'indices suffisant pour pouvoir identifier la plupart des acides gras de nos échantillons.

#### α - Comparaisons des temps de rétention :

Cette méthode est la plus classique et la plus rapide.

On peut en effet comparer les temps de rétention de pics inconnus avec ceux obtenus à partir d'un mélange d'esters méthyliques d'acides gras étalons du commerce. Pour un type de colonne, le temps de rétention absolu évolue dans le temps, alors que le temps de rétention relatif, par rapport à l'acide stéarique ( C 18 : 0 ) par exemple, est constant pour un type de phase stationnaire, à température et débit d'azote donnés.

La comparaison des temps de rétention relatifs

nous a permis de déterminer avec une assez bonne certitude la nature de certains acides gras tel l'acide arachidique (C 20 : 0) et l'acide arachidonique (C 20 : 4). Par contre, la différenciation des acides lignocérique (C 24 : 0), nervonique (C 24 : 1 ), docosapentaènoïque ( C 22 : 5) et dososahexaènoïque ( C 22 : 6) ne peut être réalisée qu'avec l'utilisation complèmentaire, entre autre , de la comparaison des temps de rétention obtenus sur des phases stationnaires de polarité différentes.

### β - Comparaison des temps de rétention obtenus sur des phases de polarité différente :

Sur phase polaire (D.E.G.S.), la présence d'une double liaison dans le molécule d'acide gras augmente l'adsorption sur la phase stationnaire d'où une élévation du temps de rétention par rapport à l'acide gras saturé de même longueur de chaîne. Cette augmentation est d'autant plus importante que le nombre de doubles liaisons est plus élevé et que la position de l'une d'elles est plus proche de l'extrémité méthyle de la chaîne. Ceci explique que le temps de rétention de l'acide arachidonique (C 20 : 4) soit plus long que celui de l'acide arachidique (C 20 : 0).

Sur un autre type de phase polaire, le Carbowax 20 M, tous les acides gras d'une même série (saturés et insaturés) sortent avant les acides gras de la série suivante, ainsi les acides docosapentaènoïques ( C 22 : 5 ω3 ou ω6) et dossahéxaènoïques ( C 22 : 6 ω3 ou ω6) précèdent l'acide lignocérique (C 24 : 0).

De même sur D.E.G.S l'acide linolénique (C 18 : 3)

et l'acide arachidique ( C 20 : 0 ) ont des temps de rétention quasi-identiques, alors qu'avec le Carbowax 20 M, ils sont parfaitement séparés.

L'utilisation simultanée des deux types de phase et de la comparaison des temps de tétention relatifs nous a permis d'identifier avec une grande certitude les acides à 24 atomes de carbone ( saturé et monoinsaturé) et les acides à 22 atomes de carbone ayant 5 à 6 doubles liaisons.

### γ- Relations entre les temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone :

Il existe pour les acides gras homologues d'une même série une relation linéaire entre les logarithmes décimaux des temps de rétention et le nombre d'atomes de carbone des molécules.

Sur une feuille de papier semi-logarithmique, nous portons en abcisse le nombre de carbone de la chaîne ( échelle métrique ) et en ordonnée le temps de rétention ( échelle logarithmique ). Ainsi pour chaque série homologue d'acides gras nous obtenons une droite, et les droites tracées sont parallèles.

On peut ainsi, à l'aide des temps de rétention de 2 acides gras connus sur un chromatogramme et appartenant à la même série homologue, tracer une droite. Il est possible ensuite de déterminer les temps de rétention théoriques des autres acides gras de la série et de les comparer à ceux des pics inconnus. Cette méthode nous a permis, seule

ou associée à d'autres, l'identification de certains acides gras tel que les acides arachidique ( C 20 : 0 ), béhénique ( C 22 : 0 ) et lignocérique ( C 24 : 0 ).

## θ - Hydrogénation :

La comparaison des chromatogrammes avant et après hydrogénation permet de préciser la longueur de chaîne des acides gras et notamment celle des acides gras insaturés.

Les esters méthyliques d'acides gras sont dissous dans le méthanol ou le chloroforme. On ajoute à ce milieu 10 mg d'oxyde de platine et on fait barboter doucement un courant d'hydrogène dans le solvant pendant 4 heures au minimum. A la fin de l'opération on filtre, on évapore à sec et l'on reprend ce résidu par du sulfure de carbone.

### - Méthode utilisant les longueurs équivalentes de chaîne carbonée ( les E.C.L ) :

Comme pour la méthode précédente, on trace la droite joignant les points obtenus en portant en abcisse le nombre d'atomes de carbone des acides gras saturés et en ordonnée les logarithmes des temps de rétention. Puis en utilisant les temps de rétention des acides oleique ( C 18 : 1 ω 9 ), linoleique ( C 18 : 2 ω 6 ) et linolénique ( C 18 : 3 ω 3 ) on détermine sur le graphique la longueur équivalente de chaîne carbonée pour les 3 types de doubles liaisons ω 9 - ω 6 et ω 3.

Acide oleique : 18 : 1 ω 9 - 1 double liaison en ω 9

Acide linoleique : 18 : 2 ω 6 - 1 double liaison en ω 6 et une en ω 9

Acide linolénique : 18 : 3 ω 3 - 1 double liaison en ω 3, une en ω 6 et une en ω 9.

ACKMAN. R.G.(66) et KOVATS. E. (67) supposent que lorsqu'un acide gras contient plusieurs doubles liaisons, la valeur E.C.L de l'ensemble de celle-ci est égale à la somme des valeurs obtenues pour ces doubles liaisons prises individuellement. Ils admettent également que si un acide gras possède plus de 3 doubles liaisons, les autres situées entre la liaison en ω 9 et l'extrémité carbonyle sont affectées de la valeur E.C.L de la double liaison ω 9.

Pour le calcul, on porte le temps de rétention de l'acide oleique en ordonnée et on obtient en abcisse sa longueur équivalente de chaîne. Par différence avec celle de l'acide saturé correspondant ( acide stéarique ) on en déduit la valeur E.C.L de la double liaison en ω 9. Connaissant cette valeur et en opérant de la même façon à l'aide de l'acide linoleique, on déduit la valeur E.C.L de la double liaison en ω 6, puis suivant le même principe on détermine la valeur E.C.L de la double liaison en ω 3 à l'aide de l'acide linolénique.

Si l'on veut déterminer la nature d'un pic inconnu, on détermine son temps de rétention et au moyen de la droite précédente, on obtient sa longueur équivalente de chaîne carbonée. Par différence avec l'acide gras saturé précédent sur le chromatogramme, on déduit l'incrément dû à la somme de ses doubles liaisons. On cherche ensuite à découper

l'incrément à l'aide des valeurs E.C.L des doubles liaisons $\omega$ 3 - $\omega$6 et $\omega$ 9 déterminées précédemment. On peut ainsi formuler 2 à 3 hypothèses sur le nombre et la position des doubles liaisons. Compte tenu du type de colonne et des résultats obtenus par d'autres méthodes d'identification, on peut ainsi par élimination choisir l'hypothèse la plus probable.

Dans la présente étude, nous ne nous sommes pas intéressés à tous les acides gras constitutifs des lipides analysés. Cette dernière méthode d'identification n'a pas été utilisée dans nos travaux, elle ne figure donc qu'à titre indicatif.

# T R O I S I E M E  P A R T I E

## RESULTATS EXPERIMENTAUX

## I - Variations des constituants lipidiques sériques :

Les prélèvements sanguins sont toujours effectués le matin avant le début de la perfusion, c'est à dire 15 à 16 heures après la fin de la précédente administration.

### 1 - Le Cholestérol :

L'étude de KERN.F.( 68 ) sur la variation des lipides plasmatiques, après perfusion de foie isolé de porc avec addition d'une émulsion à base d'huile de coton et de phosphatides de soja dans le perfusat, montre que le taux de cholestérol total ne varie pas de façon significative.

Par contre HAKANSSON J. ( 69 ) obtient des résultats différents chez le chien. Les animaux sont soumis pendant plusieurs semaines à des perfusions intraveineuses quotidiennes soit d'une émulsion à 10 % d'huile de coton et de phosphatides de soja, soit d'une émulsion à 20 % d'huile de soja et de phosphatides d'oeuf.

- Des chiens recevant l'huile de coton, 1 meurt après 3 perfusions, et 3 autres survivent respectivement à 14 - 21 et 25 perfusions. Pour ces 3 derniers, le taux de Cholestérol sérique est jusqu'à 5 fois plus élevé que le taux normal.

- Tous les animaux recevant l'émulsion à base d'huile de soja sont sacrifiés après 4 semaines de traitement.Le dosage du cholestérol sérique ne révèle qu'une très légère augmentation pour ce groupe de chiens.

La nature de l'huile utilisée dans l'émulsion n'est pas le seul facteur induisant une variation de la cholestérolémie, en effet FRIEDMAN M. et BYERS S.O. ( 70, 71 ) ont montré qu'une perfusion intraveineuse de phosphatides de soja pendant 12 heures chez le rat induit une hyperphospholipidémie suivie d'une hypercholestérolémie. Le degré d'hypercholestérolémie semble directement lié aux taux de phosphatides de l'émulsion. Ces résultats ont été aussi observés par COLLINS, H.S. et coll. ( 72 ) et MEYER C.E. et coll. ( 73 ).

Dans notre expérimentation 16 heures après la fin de la septième perfusion, on note une augmentation du taux de cholestérol chez les porcs ayant reçu du Lipiphysan alors que l'Intralipid et le Trivémil ne modifient pas la cholestérolémie ( tableau 5 page 79 ). Une exception, toutefois, est à noter pour le premier porc soumis pendant 14 jours au Trivémil. Ce résultat n'est sans doute pas sans rapport avec l'état ictérique de cet animal.

Nos résultats sont, à un degré moindre, comparables à ceux obtenus par HAKANSSON J. . L'association de l'huile de coton et de phosphatides de soja semble être la seule formule susceptible de perturber le taux de cholestérol sérique.

2 - Les Triglycérides :

Le taux de triglycérides sériques dépend essentiellement de la vitesse d'épuration des particules lipidiques de l'émulsion. Le moment du prélèvement par rapport à l'arrêt de la perfusion est donc primordial.

TABLEAU 5

VARIATIONS DES CONSTITUANTS LIPIDIQUES SERIQUES

| | INTRALIPID 20 % | | | | TRIVEMIL | | | LIPIPHYSAN 10 % | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1er Jour | 7e Jour | 14e Jour | 28e Jour | 1er Jour | 7e Jour | 14e Jour | 1er Jour | 7e Jour |
| Cholestérol en g/l | $I_1$ 0,78 | 0,74 | 0,50 | 0,74 | $T_1$ 0,64 | 0,42 | 1,0 | $L_1$ 0,84 | 1,16 |
| | $I_2$ 0,80 | 0,78 | 0,92 | | $T_2$ 0,80 | 0,68 | 0,8 | $L_2$ 0,46 | 1,04 |
| | $I_3$ 0,72 | 0,70 | | | $T_3$ 0,54 | 0,66 | | | |
| Triglycérides en g/l | $I_1$ 0,26 | 1,06 | 0,20 | 0,28 | $T_1$ $<$0,20 | $<$0,20 | 0,63 | $L_1$ 0,36 | 1,12 |
| | $I_2$ 0,22 | 0,58 | 0,70 | | $T_2$ 0,20 | 0,30 | 0,58 | $L_2$ 0,24 | 0,5 |
| | $I_3$ 0,36 | 0,30 | | | $T_3$ 0,22 | 0,28 | | | |

$I_1$ : 4 semaines
$I_2$ : 2 semaines
$I_3$ : 1 semaine

$T_1$ : 2 semaines
$T_2$ : 2 semaines
$T_3$ : 1 semaine

$L_1$ : 1 semaine
$L_2$ : 1 semaine

BUS LILLE

Après administration d'une émulsion à base d'huile de coton chez des sujets dénutris ( BOZIAN. R.C. et Coll. ) ( 74 ) le taux de lipides neutres du sang ne revient à la normale qu'après 4 - 6 ou 8 heures suivant les individus.

La durée de l'épuration est fonction du taux de lipides de l'émulsion. EDGREN B. ( 75 ) montre que le taux maximum qui peut être epuré par le chien en 24 heures varie entre 2 et 3 g/kg.

L'analyse du tableau ( 5 page 79 ) montre que quelque soit le type d'émulsion utilisée et le temps d'administration, la triglycéridémie augmente légèrement dans tous les cas. La valeur élevée du taux de triglycérides sériques pour le premier porc recevant du Lipiphysan ( L1 ) doit être éliminée de l'analyse, en effet cet animal étant mort à la fin de la septième perfusion, le prélèvement n'a pas été effectué dans les mêmes conditions, c'est à dire 16 heures après la fin de l'administration.

## II - Teneur en lipides totaux des différents organes :

Lors des nombreux travaux relatifs à la nutrition parentérale avec des émulsions lipidiques artificielles, ce sont surtout les variations des constituants sériques qui ont été les plus étudiées. Au niveau tissulaire, seul l'aspect qualitatif a retenu l'attention des auteurs. Les études anatomopathologiques montrant que la répartition des dépôts lipidiques diffère suivant les organes, il nous apparaît souhaitable pour la présentation des résultats de dissocier les différents tissus. Les valeurs obtenues sont regroupées dans le tableau 6 page 82 et les figures 14 - 15 - 16 - 17 - 18 pages ( 83 à 87 ).

### 1 - Le tissu hépatique :

La lipidose est l'altération la plus fréquemment décrite dans les études histologiques des foies d'animaux ayant été soumis à des perfusions d'émulsions lipidiques artificielles. Cette altération a été observée aussi bien chez le rat, chez le chien, chez le mini-porc que chez l'Homme à des intensités différentes suivant l'émulsion utilisée. L'accumulation des lipides est retrouvée à la fois dans les hépatocytes et dans les cellules de Kupffer.

Après administration d'émulsions à base d'huile de coton ( 10 et 15 % ) et de phosphatides de soja ou d'émulsions à base d'huile de soja ( 20 % ) et de phosphatides d'oeuf à des rats, ELSTER K. et coll. ( 76 ) observe que la diminution relative du taux d'émulsifiant

TABLEAU 6

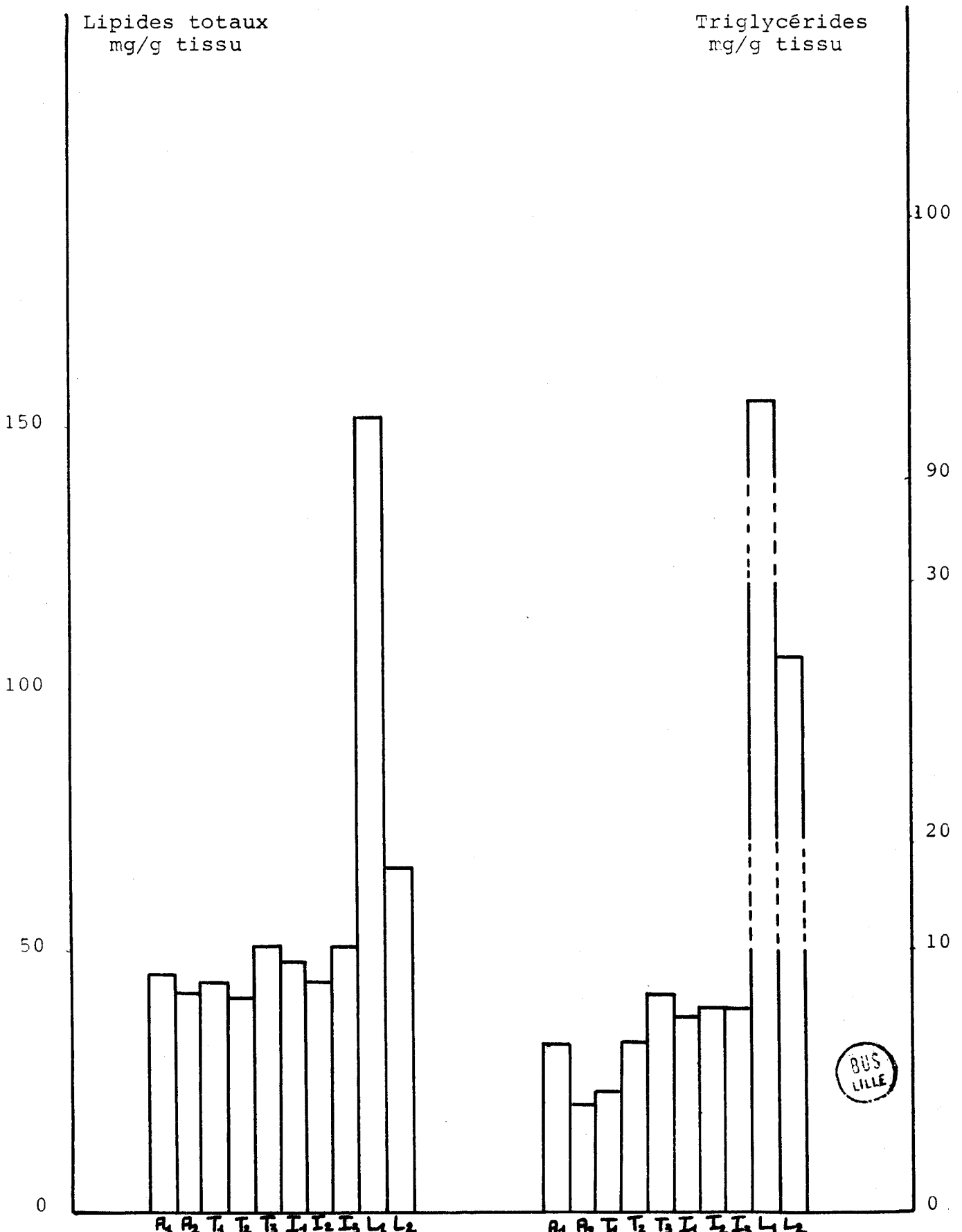
TAUX DE LIPIDES TOTAUX DANS LES DIFFERENTS ORGANES EN MG/G DE TISSU

| TISSUS | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FOIE | 46 | 42 | 44 | 41 | 51 | 48 | 44 | 51 | 152 | 66 |
| COEUR | 25 | 24 | 27 | 18 | 25 | 25 | 25 | 24 | 62 | 26 |
| REIN | 35 | 31 | 28 | 43 | 39 | 41 | 30 | 42 | 72 | 41 |
| POUMON | 26 | 32 | 24 | 26 | 31 | 36 | 44 | 36 | 259 | 184 |
| RATE | 26 | 25 | | 41 | 39 | 55 | 39 | 39 | 245 | 135 |

BUS LILLE

Figure 14

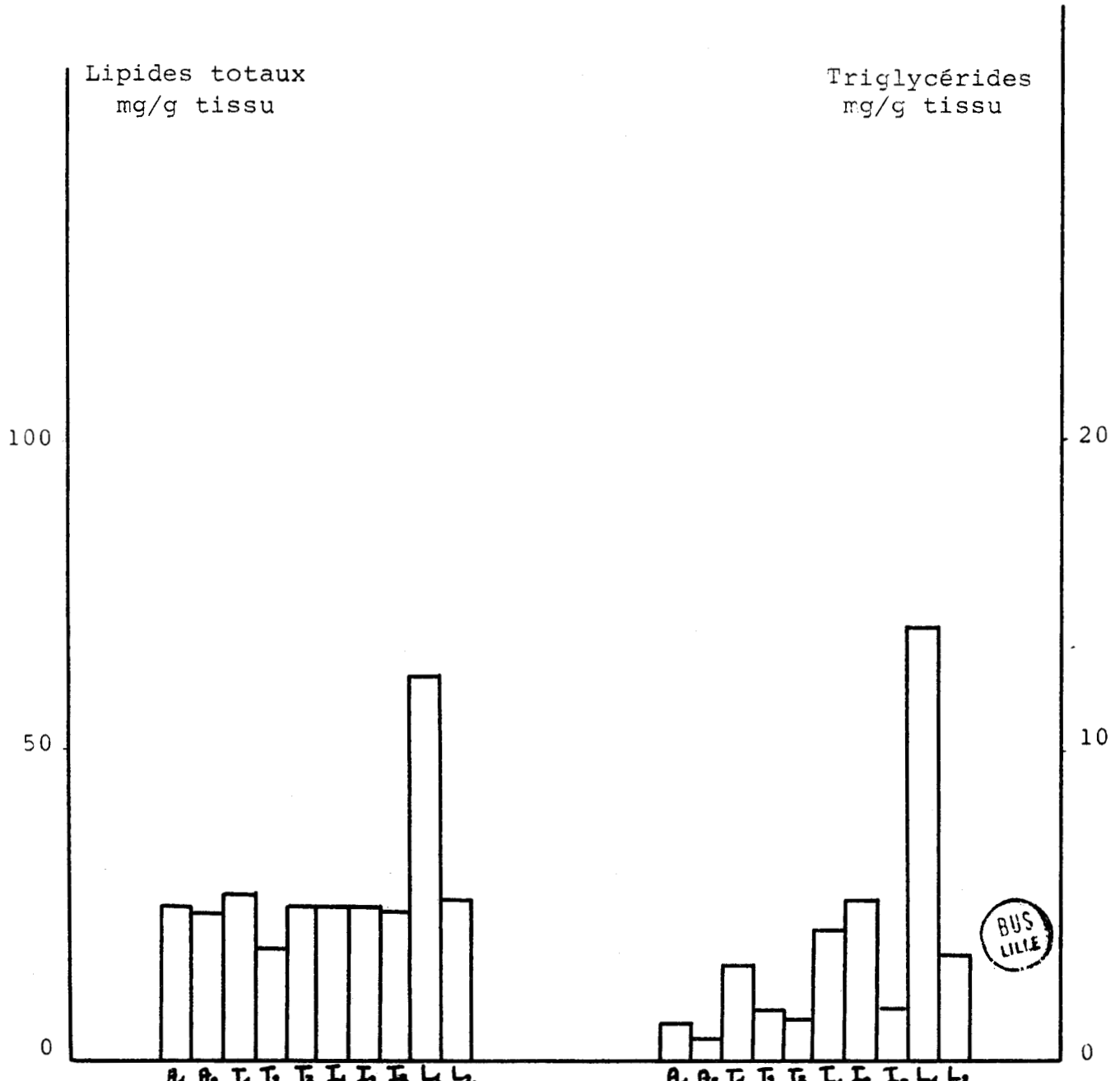
FOIE




BUS LILLE

Figure 15

COEUR




BUS LILLE

Figure 16

REIN

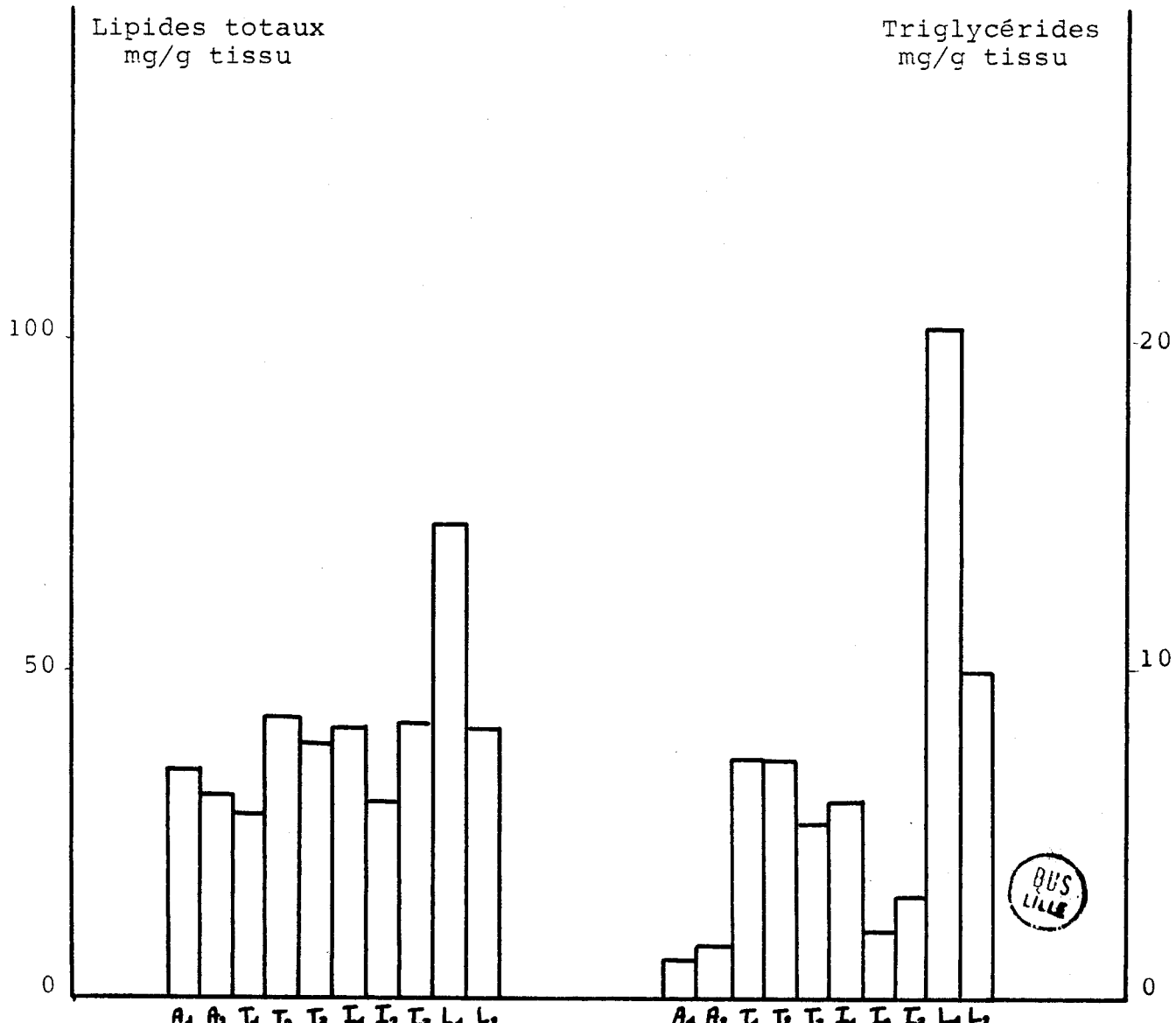


Figure 17

POUMON

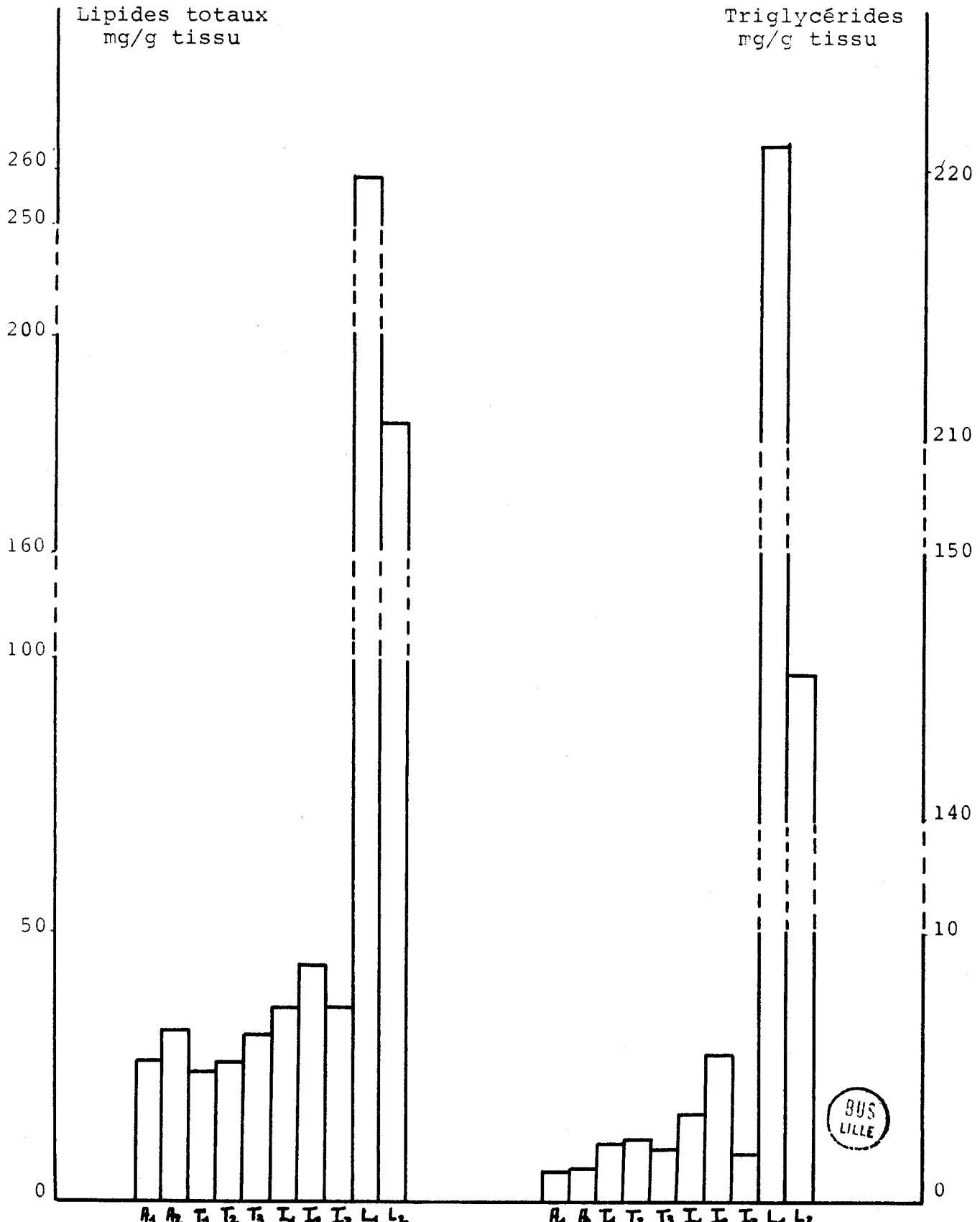
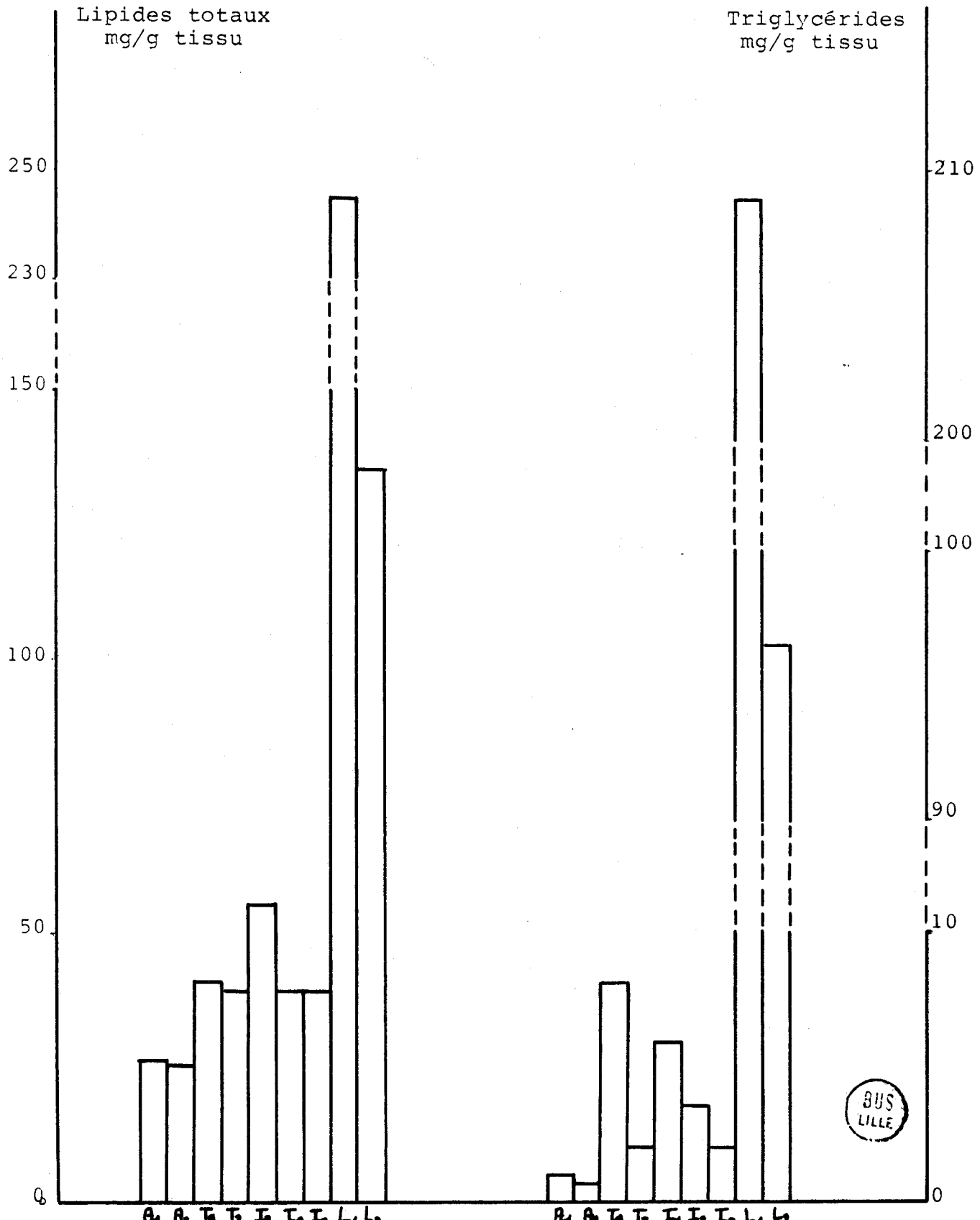


Figure 18

RATE



aussi bien que l'augmentation de la concentration en lipides de l'émulsion accentuent l'importance du dépôt de lipides au niveau hépatique.Il remarque également que l'infiltration de lipides dans les cellules de Kupffer dépend de la nature de l'huile incorporée dans l'émulsion. Le phénomène le plus intense est observé avec les préparations à base d'huile de coton.

L'analyse quantitative de l'infiltration de lipides dans le foie à laquelle nous nous sommes intéressé nous montre que la nature de l'huile utilisée dans les préparations est déterminante pour l'intensité du dépôt lipidique. Les émulsions à base d'huile de soja et de phosphatides de soja ou de phosphatides d'oeuf n'induisent que de très faibles modifications du taux de lipides totaux dans le foie, alors que le Lipiphysan ( huile de coton et phosphatides de soja ) favorise le dépôt de lipides totaux dans cet organe. L'accumulation la plus importante est obtenue chez le mini-porc ( L1 ) mort après 7 perfusions.

La choline jouant un rôle très important dans le métabolisme lipidique hépatique, KING N.W. et coll. ( 77 ) ont recherché si l'administration prolongée d'émulsions lipidiques artificielles n'induisait pas une défi~~s~~cience en choline expliquant ainsi l'apparition d'une stéatose hépatique.

Dans cette étude, 3 groupes de 12 rats chacun sont soumis soit à un régime défi~~s~~cient en choline soit à un régime riche en choline, soit à un régime commercial équilibré, pendant 3 semaines avant la perfusion. Pendant la phase de perfusion, la moitié des animaux reçoivent par voie intraveineuse une émulsion à base d'huile de soja à raison de 3 g de lipides par Kg et par jour. Les résultats ne permettent pas

de conclure que les perfusions d'émulsions lipidiques induisent un déficit en choline, mais par contre, que ces émulsions accentuent les effets d'une déficience en choline. Afin de limiter le dépôt de lipides hépatiques, il paraît souhaitable de supplémenter les émulsions lipidiques en choline ou en méthionine.

2 - Le muscle cardiaque :

A l'autopsie des patients ayant reçu pendant 1 mois une émulsion lipidique ( dont la composition n'est pas précisée ) par voie intraveineuse, ELSTER K. ( 78 ) ne remarque aucune infiltration graisseuse au niveau des fibres myocardiques.

Par contre, l'administration d'une émulsion à base d'huile de coton chez le chien au taux de 6 à 7 g de lipides par kg et par jour entraine la mort des animaux et l'autopsie révèle une dilatation du coeur ainsi que la présence de dépôts lipidiques dans la lumière des vaisseaux coronariens.

Nous retrouvons cette dualité chez le mini-porc. Le taux de lipides totaux dans le coeur est constant quelque soit le type d'émulsion et le temps d'administration pour tous les animaux ayant survécu aux perfusions, alors que dans le cas du porc mort après 7 administrations, on note une brusque augmentation du taux de lipides dans le coeur.

Dans le cas de cet organe, le dépôt de lipides ne semble donc pas uniquement lié à la nature de l'émulsion.

3 - Le rein :

Les infiltrations et les dégénérescences graisseuses au niveau du rein chez des chiens soumis à des perfusions d'émulsions lipidiques à base d'huile de coton avec ou sans émulsifiant ont été observées dans de nombreux travaux : GOHN. I.Jr et coll. ( 79 ), EDGREN. B. ( 80 ), ELSTER K. et coll. ( 81 ).

L'analyse de nos résultats expérimentaux ne nous permet pas de reconnaître une influence particulière, de l'une ou l'autre des trois émulsions utilisées, sur le taux de lipides totaux au niveau du rein. En effet tous les résultats sont sensiblement identiques excepté là aussi ceux obtenus pour le porc L1.

4 - Au niveau pulmonaire :

Des globules graisseux au niveau du tissu pulmonaire ont été observés, lors de nombreux travaux effectués chez la souris, le rat, le lapin, le cobaye, le chat et le chien, après administration d'émulsions lipidiques préparées à base d'huile de nature différente .

Ces dépôts lipidiques apparaissent transitoirement avec un maximum dans les premières heures suivant la perfusion et diminuant d'intensité dans une période de 12 à 24 heures, ceci, dans le cas d'une seule administration. Après une série de perfusions quotidiennes, ces globules graisseux persistent au niveau du poumon pendant 2 à 21 jours après l'arrêt des perfusions ( ASADA S.) ( 82 ).

La détermination du taux de lipides totaux du poumon de mini-porcs ayant subit des perfusions répétées d'émulsions lipidiques fait apparaître des divergences très importantes suivant le type d'émulsion. Le Trivémil n'induit aucune modification des lipides totaux pulmonaires, alors que l'Intralipid semble susciter une légère accumulation de lipides ; quant au Lipiphysan, il provoque une accumulation lipidique telle, que le taux de lipides totaux est de 6 à 9 fois supérieur à la valeur initiale.

5 - La rate :

Que ce soit chez le chien, chez le rat, chez le mini-porc ou chez l'Homme, l'administration d'émulsions lipidiques artificielles par voie intraveineuse, induit systématiquement une infiltration graisseuse au niveau de la rate. L'intensité des dépôts étant comme précédemment fonction de la nature de l'huile entrant dans la composition de l'émulsion ; là encore c'est l'huile de coton qui semble responsable de la plus importante accumulation de lipides au niveau de la rate : ELSTER K. et coll.(83), BERG, G. et coll.(84).

A l'autopsie on remarque une hypertrophie systématique de la rate avec les trois émulsions utilisées. Le taux de lipides totaux est également plus élevé chez tous les animaux sous perfusion d'émulsions lipidiques artificielles. Les résultats obtenus après administration de Trivémil et d'Intralipid sont comparables, alors que le Lipiphysan induit une accumulation très importante de lipides totaux ( taux 6 à 10 fois supérieur aux taux normaux ).

## 6 - Conclusion :

A l'analyse des résultats concernant l'intensité de l'infiltration graisseuse dans les organes après perfusion d'émulsions lipidiques, il apparaît que la rate soit le tissu où l'on observe les plus importantes perturbations, l'accumulation de lipides est observée avec les trois émulsions. Inversement, le coeur est l'organe le moins perturbé, même après administration d'une émulsion à base d'huile de coton. Le comportement du tissu rénal est également très peu modifié.

L'ensemble de ces résultats nous permet de classer les trois émulsions expérimentées en deux groupes :

- Emulsions lipidiques artificielles à base d'huile de soja ( Intralipid et Trivémil ).
- Emulsions lipidiques artificielles préparées à base d'huile de coton ( Lipiphysan ).Cette dernière induisant de profondes perturbations du métabolisme lipidique au niveau du foie, du poumon et de la rate.

Par suite de ces observations, il a semblé intéressant de ne pas considérer simplement l'ensemble des lipides, mais le taux de chacune des classes.

## III - Répartition des triglycérides et du cholestérol dans les tissus :

### 1 - Les triglycérides :

L'étude du taux de lipides totaux ne renseigne que très imparfaitement sur l'intensité des dépôts de lipides dans les organes, seules les variations importantes sont décelées ; alors que le dosage des triglycérides permet de discerner de plus faibles fluctuations à condition, bien entendu, que les variations affectent principalement les lipides non phosphorés.

Les résultats reportés dans le tableau ( 7 page 94 ) et les figures 14 - 15 - 16 - 17 - 18 page ( 83 à 87 ) permettent de constater que ce sont les lipides neutres et principalement les triglycérides qui sont responsables de l'élévation du taux de lipides dans les organes. En effet, nous retrouvons une brusque élévation de triglycérides dans le foie, le poumon et la rate des animaux soumis au Lipiphysan, le rein et surtout le coeur n'accusant que de faibles variations en regard des autres organes pour cette émulsion. Cette première remarque ne fait que confirmer les observations du chapitre précédent, par contre, un fait nouveau apparaît : nous observons que quelque soit le type d'émulsion, et quelque soit l'organe considéré, le taux de triglycérides est systématiquement plus élevé que chez les porcs témoins. L'intensité de la variation étant liée à la nature de l'huile entrant dans la composition de l'émulsion. Un seul résultat fait exception à cette remarque ( le taux de triglycérides dans le foie du porc T1 ). La signification de ce résultat isolé est très discutable.

TABLEAU 7

TAUX DE TRIGLYCERIDES DANS LES DIFFERENTS ORGANES EN MG/G DE TISSU

| TISSUS | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FOIE | 6,4 | 4 | 4,6 | 6,5 | 8,3 | 7,4 | 7,8 | 7,7 | 93 | 27 |
| COEUR | 1,2 | 0,7 | 3,1 | 1,6 | 1,3 | 4,2 | 5,2 | 1,7 | 14 | 3,3 |
| REIN | 1,2 | 1,6 | 7,3 | 7,2 | 5,3 | 6 | 2 | 3,1 | 20 | 10 |
| POUMON | 1,2 | 1,3 | 2,2 | 2,4 | 2 | 3,3 | 5,5 | 1,8 | 221 | 145 |
| RATE | 1 | 0,7 | | 8,1 | 2 | 5,9 | 3,6 | 1,9 | 209 | 97 |

BUS LILLE

## 2 - Le cholestérol :

Exception faite du porc L1, les remarques que nous pouvons faire à propos de la variation du taux de cholestérol tissulaire doivent rester très nuancées. Malgré la faible amplitude des augmentations, nous pouvons toutefois remarquer que le taux de cholestérol tend à s'élever au niveau de la rate chez tous les animaux, la nature de l'émulsion restant indépendante du phénomène ( tableau 8 page 96 ). Il apparaît d'autre part que l'accumulation de cholestérol au niveau de cet organe soit liée au nombre de perfusions puisque de 7,5 mg/g de tissu, après 7 administrations consécutives d'Intralipip, le taux s'élève respectivement à 8,3 mg/g et 11,5 mg/g au bout de 14 et 28 perfusions. Bien que les résultats soient en faveur de cette hypothèse, il est difficile d'étendre les conclusions au Trivémil puisque les animaux n'ont été soumis à cette émulsion que pendant 7 ou 14 jours consécutifs.

Au niveau du coeur et du rein, le taux de cholestérol reste parfaitement inchangé dans tous les cas.

On remarque enfin que le tissu hépatique et le tissu pulmonaire semblent s'enrichir très légèrement en cholestérol après perfusion d'Intralipid quelque soit le temps d'administration.

Les résultats concernant le porc mort après 7 perfusions de Lipiphysan ( L1 ) sont par contre sans équivoque, on note une accumulation du cholestérol dans tous les tissus et principalement dans la rate, le poumon et le foie.

TABLEAU 8

TAUX DE CHOLESTEROL DANS LES DIFFERENTS TISSUS EN MG/G DE TISSU

| TISSUS | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FOIE | 3,2 | 2,4 | 2,0 | 4,2 | 3,3 | 5,4 | 6,1 | 3,9 | 10,1 | 2,8 |
| COEUR | 1,2 | 0,95 | 2,0 | 1,5 | 1,1 | 1,3 | 1,4 | 1,1 | 2,9 | 1,2 |
| REIN | 4,5 | 3,1 | 3,2 | 4,7 | 3,2 | 4,4 | 3,7 | 4,3 | 6,3 | 3 |
| POUMON | 3,7 | 4,5 | 3,4 | 3,8 | 4,1 | 5,8 | 8 | 5,5 | 15 | 4,7 |
| RATE | 3,9 | 4,6 | | 6,5 | 6,3 | 11,5 | 8,3 | 7,5 | 21,7 | 5,3 |

BUS LILLE

## IV - Teneur en phospholipides et répartition des constituants majeurs : phosphatidyl-choline et phosphatidyl-éthanolamine :

Les résultats du dosage du phosphore total dans les organes prélevés, révèlent une remarquable fixité du taux des phospholipides, quelque soit la nature de l'émulsion utilisée. ( tableau 9 page 98 ).

L'analyse du tableau 10 page ( 99 ) ne nous permet pas non plus de discerner de changements notables dans la répartition des deux classes majeures de lipides phosphorés.

TABLEAU 9

TAUX DE PHOSPHOLIPIDES EN MG DE PHOSPHORE PAR G DE TISSU

| | $A_1$ | $A_2$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FOIE | 1,68 | 1,19 | 1,32 | 1,14 | 1,15 | 1,50 | 1,05 | 0,90 | 1,90 | 0,90 |
| COEUR | 0,83 | 0,58 | 0,73 | 0,73 | 0,51 | 0,85 | 0,50 | 0,50 | 1,02 | 0,50 |
| REIN | 1,19 | 0,85 | 1,22 | 1,03 | 1,05 | 0,50 | 0,90 | 0,80 | 1,49 | 0,80 |
| POUMON | 0,79 | 0,84 | 0,95 | 0,96 | 0,80 | 0,89 | 0,74 | 0,60 | 0,80 | 0,63 |
| RATE | 0,84 | 0,63 | 0,91 | 0,80 | 0,64 | | 0,70 | 0,61 | 0,88 | 0,41 |

BUS LILLE

TABLEAU 10

VARIATIONS DES TAUX DE PHOSPHATIDYLCHOLINE ET DE PHOSPHATIDYLETHANOLAMINE DANS LES TISSUS

(en mg de phosphore par g de tissu)

| | | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FOIE | Lécithine mgP/g tissu | 96* | 61 | 78 | 71 | 56 | 74 | 49 | 64 | 112 | 55 |
| | Céphaline mgP/g tissu | 50 | 26 | 33 | 28 | 26 | 40 | 25 | 25 | 55 | 33 |
| | Léc/Cép | 1,90 | 2,35 | 2,4 | 2,5 | 2,15 | 1,80 | 2,00 | 2,59 | 2,00 | 1,69 |
| COEUR | Lécithine | 38 | 25 | 38 | 25 | 25 | 32 | 29 | 23 | 48 | 25 |
| | Céphaline | 25 | 16 | 20 | 16 | 17 | 25 | 23 | 14 | 20 | 16 |
| | Léc/Cép | 1,50 | 1,56 | 1,8 | 1,6 | 1,49 | 1,30 | 1,30 | 1,63 | 2,40 | 1,61 |
| REIN | Lécithine | 62 | 35 | 16 | 46 | 39 | 45 | 34 | 41 | 57 | 45 |
| | Céphaline | 41 | 19 | 8 | 28 | 19 | 31 | 23 | 20 | 14 | 27 |
| | Léc/Cép | 1,50 | 1,84 | 2,00 | 1,6 | 2,04 | 1,50 | 1,50 | 2,08 | 4,1 | 1,71 |
| POUMON | Lécithine | 41 | 38 | 32 | 28 | 33 | 38 | 35 | 43 | 31 | 23 |
| | Céphaline | 14 | 14 | 12 | 10 | 9 | 19 | 11 | 12 | 12 | 9 |
| | Léc/Cép | 2,9 | 2,71 | 2,7 | 2,8 | 3,51 | 2,0 | 3,20 | 3,6 | 2,6 | 2,67 |
| RATE | Lécithine | 24 | 25 | | 27 | 26 | 38 | 25 | 25 | 29 | 17 |
| | Céphaline | 14 | 13 | | 10 | 9 | 22 | 22 | 12 | 13 | 8 |
| | Léc/Cép | 1,70 | 1,92 | | 2,7 | 2,92 | 1,70 | 1,10 | 2,04 | 2,20 | 2,07 |

* Tous les résultats sont à diviser par 100

BUS LILLE

## V - Répartition des acides gras dans les huiles et les phospholipides des émulsions :

### 1 - Dans les huiles de coton et de soja :

| | Huile de coton | Huile de soja |
|---|---|---|
| Acide palmatique | 22 % | 10 % |
| Acide oleique | 31 % | 29 % |
| Acide linoleique | 45 % | 51 % |
| Acide linolénique | 0 % | 7 % |
| Autres acides gras | 2 % | 3 % |

La forte teneur en acide linoleique ( C 18 : 2 ω 6 ) est la principale caractéristique de ces deux huiles. La couverture en l'un des acides gras essentiels sera donc assurée avec les deux émulsions.

L'huile de soja est la seule à contenir de l'acide linolénique ( C 18 : 3 ω 3 ). Le taux d'acide oleique ( C 18 : 1 ω 9 ) est sensiblement le même dans les deux cas, par contre la teneur de l'huile de coton en acide palmitique est supérieure à celle de l'huile de soja. En conséquence, on remarque que l'huile de soja contient moins d'acides gras saturés que l'huile de coton. Les 2 à 3 % d'acides gras restants sont surtout constitués par les acides myristique ( C 14 : 0 ), palmitoleique ( C 16 : 1 ), arachidique ( C 20 : 0 ) et béhénique ( C 22 : 0 ).

Mis à part ces quelques divergences, on remarque que la nature et la répartition des acides gras présentent sensiblement le même profil dans les deux huiles.

2 - Dans les phospholipides :

| | Phospholipides Intralipid | Phospholipides Lipiphysan | Phospholipides Trivémil |
|---|---|---|---|
| Acide palmitique | 36,4 % | 16,3 % | 14,8 % |
| Acide palmitoleique | 2,7 % | 0,7 % | 0,7 % |
| Acide stéarique | 10,4 % | 3,4 % | 3,5 % |
| Acide oleique | 30,6 % | 11,3 % | 8,3 % |
| Acide linoleique | 15,2 % | 60,0 % | 61,5 % |
| Acide linolénique | 0,1 % | 5,0 % | 6, 0 % |
| Acide arachidonique | 2,5 % | 2,5 % | 4,2 % |
| Autres acides gras | 2,0 % | 0,6 % | 0,9 % |

La répartition des acides gras est très différente suivant la nature de l'émulsifiant utilisé dans la préparation des émulsions. Les phosphatides de soja contenus dans le Lipiphysan et le Trivémil sont caractérisés :

- par une haute teneur en acide linoleique ( 60 % ).
- par la présence d'acide linolénique ( 5 à 6 % ).
- par une faible teneur en acides gras saturés tel l'acide palmitique ( 15 à 16 % ) et l'acide stéarique ( 3,5 %).

Inversement les phosphatides de soja sont beaucoup plus riches en acide palmitique ( 36 % ) et en acide stéarique ( 10 % ). On note également une teneur élevée en acides monoinsaturés ( 30 % d'acide oleique ) et une faible teneur en acide linoleique ( 15 % ).

## VI - Composition en acides gras des triglycérides tissulaires :

L'analyse des acides gras présents dans les triglycérides est effectuée sur colonne standard remplie de D.E.G.S au taux de 10 % dont nous avons présenté les caractéristiques dans la seconde partie de notre propos.

Par référence à des esters méthyliques étalons et par comparaison des temps de rétention relatifs, nous nous sommes limités à l'identification des acides gras majeurs présents dans cette classe de lipides neutres. Les résultats en pourcentage présentés dans les tableaux ( 11-12-13-14-15-16 pages 105 à 110 ) sont donc légèrement surestimés par rapport aux taux réels puisque nous n'avons pas retenu dans le calcul, les acides gras mineurs et notamment les acides gras courts.

Avec le lipiphysan, il apparaît une diminution systématique des acides myristique ( C14 : 0), palmitique ( C16 : 0 ), palmitoleique ( C16 : 1ω9 ), stéarique ( C18 : 0 ), oleique ( C18 : 1ω 9 ) et arachidonique ( C20 : 4 ω 6 ) dans tous les tissus (excepté toutefois le tissu adipeux). D'après le mode de calcul utilisé (en % des acides gras considérés), l'abaissement du taux ne correspond peut-être pas à une diminution réelle en valeur absolue de ces acides gras, mais très certainement à une diminution relative, compte tenu de la forte augmentation du pourcentage d'acide linoleique. Ce qui expliquerait d'ailleurs la stabilité du taux de ces mêmes acides gras après administration de Trivémil et d'Intralipid, puisqu'avec ces émulsions l'élévation du taux d'acide linoleique est beaucoup plus modérée. L'acide arachidonique semblerait en partie

faire exception à cette règle puisqu'avec le Trivémil et l'Intralipid son taux chute aussi, plus discrètement certes qu'avec le lipiphysan.

Par souci de clarté, nous avons voulu schématiser les variations du taux d'acide linoleique dans les différents tissus étudiés en fonction des trois émulsions expérimentées. L'observation de la figure 19 page( 111 ) nous permet immédiatement de remarquer que seul le lipiphysan induit une forte augmentation d'acide linoleique au sein des triglycérides.

TABLEAU 11

COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES TRIGLYCERIDES DU FOIE

| % | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C14:0 | 3,0 | 1,6 | 1,1 | 0,9 | 0,8 | 1,2 | 1,0 | 1,7 | 0,2 | 0,2 |
| C16:0 | 30,0 | 24,0 | 28,1 | 25,2 | 21,2 | 25,4 | 18,3 | 24,2 | 13,0 | 14,9 |
| C16:1 | 4,9 | 2,9 | 4,1 | 3,5 | 3,4 | 4,4 | 4,4 | 3,6 | 0,7 | 0,4 |
| C18:0 | 11,3 | 10,6 | 16,8 | 17,3 | 7,8 | 10,6 | 8,3 | 9,4 | 4,6 | 6,4 |
| C18:1 | 36,5 | 39,3 | 27,2 | 30,0 | 36,7 | 29,3 | 32,3 | 38,7 | 26,2 | 29,0 |
| C18:2 | 10,6 | 16,7 | 20,2 | 21,0 | 27,6 | 25,9 | 31,3 | 20,1 | 52,0 | 45,6 |
| C18:3 + C20:0 | 0,6 | 0,8 | 1,5 | 1,1 | 1,3 | 1,7 | 2,5 | 1,0 | 2,8 | 3,2 |
| C20:4 | 3,1 | 4 | 1,1 | 1,0 | 1,2 | 1,5 | 1,9 | 1,3 | 0,5 | 0,3 |

$T_1$ : Trivemil 14 jours
$T_2$ : Trivemil 14 jours
$T_3$ : Trivemil 7 jours

$I_1$ : Intralipid 28 jours
$I_2$ : Intralipid 14 jours
$I_3$ : Intralipid 7 jours

$L_1$ : Lipiphysan 7 jours
$L_2$ : Lipiphysan 7 jours

$A_1$, $A_2$ : Témoins

BUS LILLE

TABLEAU 12

COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES TRIGLYCERIDES DU COEUR

| % | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C14:0 | 2,6 | 1,6 | 1,2 | 0,9 | 1,0 | 1,5 | 1,2 | 3,6 | 0,7 | 0,2 |
| C16:0 | 30,7 | 23,8 | 19,0 | 25,8 | 23,5 | 28,6 | 22,0 | 32,5 | 15,1 | 14,8 |
| C16:1 | 4,0 | 2,6 | 3,1 | 3,2 | 2,5 | 7,1 | 2,5 | 1,9 | 1,6 | 0,6 |
| C18:0 | 12,3 | 17,2 | 19,5 | 15,6 | 16,4 | 12,5 | 13,4 | 13,2 | 9,8 | 8,3 |
| C18:1 | 36 | 35,9 | 32,5 | 35,4 | 36,2 | 30,1 | 33,5 | 34,6 | 27,5 | 32,2 |
| C18:2 | 10,6 | 15,7 | 12 | 17,1 | 17,9 | 17,9 | 24,5 | 12,8 | 40 | 41,3 |
| C18:3 + C20:0 | 0,8 | 1 | 1,4 | 1,1 | 1,3 | 1,8 | 2,3 | 1,0 | 5,1 | 2,3 |
| C20:4 | 3,0 | 2,2 | 1,3 | 0,9 | 1,1 | 0,5 | 0,6 | 0,4 | 0,2 | 0,3 |

BUS LILLE

TABLEAU 13

COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES TRIGLYCERIDES DU REIN

| % | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C14:0 | 3,0 | 1,3 | 1,5 | 1,5 | 0,9 | 2,1 | 2,0 | 3,5 | 0,3 | 0,3 |
| C16:0 | 35,3 | 34,8 | 27,3 | 30,6 | 40,3 | 34,7 | 29,7 | 33,4 | 18,0 | 13,9 |
| C16:1 | 3,6 | 3,0 | 3,4 | 3,5 | 2,5 | 11,3 | 7,1 | 4,0 | 1,8 | 0,5 |
| C18:0 | 14,0 | 12,4 | 14,4 | 12,0 | 8,5 | 7,7 | 10,7 | 11,3 | 6,8 | 5,7 |
| C18:1 | 20,9 | 28,7 | 31,2 | 31,0 | 27,6 | 26,8 | 25,6 | 29,7 | 27,9 | 28 |
| C18:2 | 19,0 | 14,9 | 19,3 | 17,9 | 17,6 | 15,2 | 22,8 | 16,4 | 40,9 | 47,4 |
| C18:3 + C20:0 | 1,2 | 1,1 | 1,4 | 1,5 | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,0 | 3,8 | 3,8 |
| C20:4 | 3,0 | 3,2 | 1,7 | 2,0 | 1,3 | 0,9 | 1,0 | 0,8 | 0,5 | 0,4 |

BUS LILLE

TABLEAU 14

COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES TRIGLYCERIDES DU POUMON

| % | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C14:0 | 2,0 | 1,4 | 1,6 | 1,4 | 1,1 | 2,6 | 0,3 | 4,1 | 0,1 | 0,1 |
| C16:0 | 31,2 | 27,6 | 26,1 | 26,0 | 25,8 | 28,7 | 20,6 | 26,6 | 13,1 | 9,9 |
| C16:1 | 2,4 | 3,1 | 3,5 | 3,2 | 2,8 | 1,6 | 2,4 | 3,5 | 1,5 | 0,9 |
| C18:0 | 16,5 | 14,3 | 15,3 | 15,8 | 16,4 | 14 | 15,3 | 12,6 | 4,4 | 4,0 |
| C18:1 | 36,7 | 41,5 | 32,8 | 34,9 | 38,7 | 32,6 | 38,2 | 37,5 | 29,5 | 24,1 |
| C18:2 | 9,2 | 10,1 | 19,3 | 17,5 | 13,7 | 17,0 | 19,3 | 13,8 | 47,4 | 53,4 |
| C18:3 + C20:0 | 0,7 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 2,6 | 3,1 | 1,0 | 3,8 | 7,3 |
| C20:4 | 1,3 | 1,4 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 0,9 | 0,8 | 0,9 | 0,3 | 0,4 |

BUS LILLE

TABLEAU 15

COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES TRIGLYCERIDES DE LA RATE

| % | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C14:0 | 2,3 | 1,5 | | 0,3 | 1,1 | 2,4 | 2,8 | 6,3 | 0,1 | 0,1 |
| C16:0 | 24,9 | 26,4 | | 14,1 | 25,1 | 29,6 | 28,4 | 27,5 | 10,7 | 11,4 |
| C16:1 | 2,6 | 2,8 | | 1,0 | 2,6 | 3,1 | 2,7 | 5,7 | 1,2 | 0,5 |
| C18:0 | 14,4 | 13,4 | | 15,7 | 15,8 | 8,4 | 13,2 | 11,9 | 3,5 | 5,2 |
| C18:1 | 30,6 | 33,2 | | 29,8 | 32,7 | 29,1 | 30,6 | 33,3 | 22,6 | 28,2 |
| C18:2 | 18,2 | 15,4 | | 33,8 | 17,3 | 22,3 | 17,4 | 12,5 | 54,5 | 50,5 |
| C18:3 + C20:0 | 1,2 | 1,2 | | 1,4 | 1,3 | 1,7 | 1,6 | 1,5 | 7,3 | 3,9 |
| C20:4 | 5,8 | 6,1 | | 3,9 | 4,1 | 2,8 | 3,3 | 1,3 | 0,1 | 0,2 |

BUS LILLE

TABLEAU 16

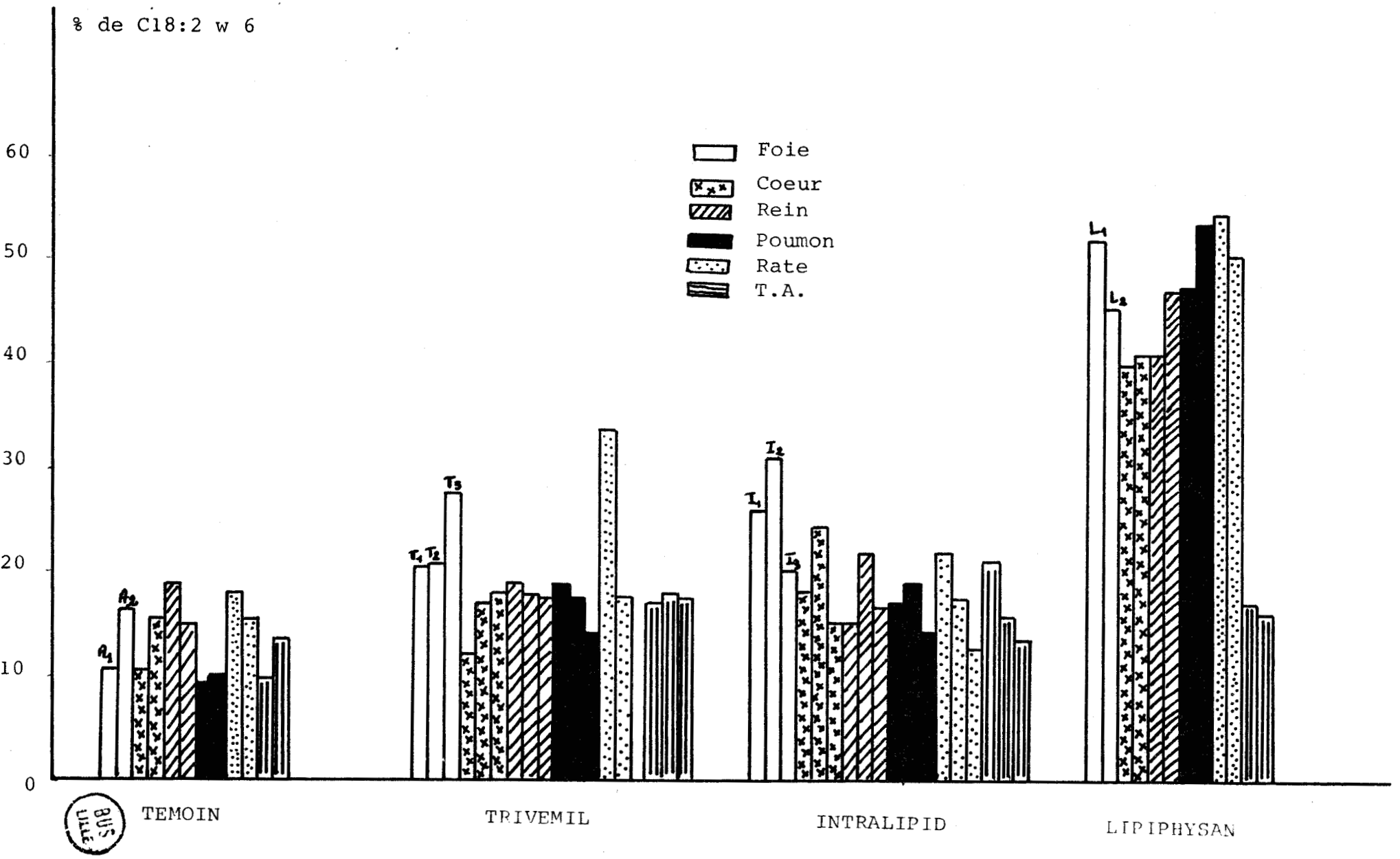
COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES TRIGLYCERIDES DU TISSU ADIPEUX

| % | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C14:0 | 2,0 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | 0,8 | 1,0 | 1,5 | 1,3 | 1,4 | 1,1 |
| C16:0 | 29,5 | 24,1 | 25,9 | 27,2 | 23,2 | 24,7 | 29,9 | 25,0 | 26,9 | 25,8 |
| C16:1 | 5,5 | 3,3 | 2,0 | 1,8 | 1,9 | 1,5 | 1,5 | 1,8 | 4,2 | 2,6 |
| C18:0 | 17,3 | 13,6 | 16,9 | 17,6 | 17,9 | 20,2 | 20,2 | 19,3 | 17,5 | 16,7 |
| C18:1 | 35,5 | 43,2 | 35,2 | 32,2 | 36,7 | 30,0 | 29,7 | 38,1 | 31,7 | 36,3 |
| C18:2 | 9,3 | 13,3 | 17,0 | 18,2 | 17,5 | 21,0 | 15,4 | 13,3 | 16,8 | 16,2 |
| C18:3 + C20:0 | 0,7 | 1,1 | 1,4 | 1,5 | 1,6 | 1,4 | 1,6 | 1,1 | 1,3 | 1,3 |
| C20:4 | 0,2 | 0,2 | 0,4 | 0,3 | 0,4 | 0,2 | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |

BUS LILLE

Figure 19

VARIATION DU TAUX D'ACIDE LINOLEIQUE DANS LES TRIGLYCERIDES TISSULAIRES




BUS LILLE

## VII - Composition en acides gras des Phosphatidyl-cholines(PC)et des Phosphatidyl-éthanolamines(PE) :

Les réserves émises précédemment quant à l'identification des acides gras restent encore, et surtout, valables pour les phospholipides puisque c'est notamment pour ces composés que nous avons limité volontairement notre analyse aux acides gras les plus représentatifs des deux classes de lipides phosphorés étudiés.

L'analyse des acides gras des phospholipides a été réalisée sur l'appareil GIRDEL muni d'une colonne capillaire de 50 m remplie avec une phase polaire : le Carbowax 20M.

Des résultats rapportés dans les tableaux 17-18-19-20-21 pages( 114 à 118 ) et dans les figures 20-21 pages( II9 et I20 ), il apparaît que seul le taux relatif d'acide linoleique varie de façon notable dans les deux classes de lipides phosphorés et dans tous les tissus quelque soit l'émulsion utilisée. Une seule exception : le muscle cardiaque au niveau duquel la répartition des acides gras est inchangée.

Nous observons également une diminution du taux d'acide palmitique au niveau du foie, du poumon et de la rate au sein des phosphatidyl-cholines, alors que l'analyse des phosphatidyl-éthanolamines montre une diminution du taux d'acide arachidonique dans le foie et la rate.

Comme dans le cas des triglycérides, il est tentant de dire que ces variations ne traduisent pas une diminution en valeur absolue

de la quantité de ces acides gras. Ce qui explique que ce soit sur le taux d'acide palmitique pour les P.C et sur le taux d'acide arachidonique pour les P.E que portent les variations puisque la teneur en ces acides gras est respectivement très élevée dans l'une ou l'autre des deux classes de phospholipides considérés.

Cette remarque générale demande à être nuancée notamment dans le cas des P.E. Si l'on admet que la chute du taux d'acide arachidonique et d'acide docosahexènoïque est uniquement la conséquence de l'élévation du taux d'acide linoleique et du mode de calcul, on ne comprend pas alors pourquoi lestaux des autres acides gras et principalement celui de l'acide stéarique ne sont pas modifiés. Dans le cas du foie et de la rate, la diminution du taux de C 20 : 4 et de C 22 : 6 serait donc certainement due pour une part à l'élévation du taux d'acide linoleique mais pour une autre part à une modification métabolique. Deux hypothèses peuvent être envisagées :

- soit la formation de peroxydes à partir des acides gras très polyinsaturés, malgré la présence d'antioxydant (vitamine E).
- soit une inhibition du système d'élongation et de désaturation de l'acide linoleique qui est le précursseur métabolique de l'acide arachidonique.

Des constatations analogues concernant les modifications du taux d'acide arachidonique avaient été faites chez l'Homme soumis à des perfusions d'émulsions lipidiques artificielles (SCHERPEREL P. et coll. ( 85 ) ).

TABLEAU 17

COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES P.C. ET P.E. DU FOIE

| | Phosphatidyl choline | | | | | | | | | | Phosphatidyl éthanolamine | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
| C16:0 | 23,5 | 20,1 | 15,5 | 12,3 | 14,0 | 22,2 | 17,3 | 14,8 | 18,7 | 20,8 | 13,7 | 10,2 | 9,2 | 8,3 | 8,3 | 14,9 | 11,0 | 12,4 | 11,0 | 11,2 |
| C16:1 | 0,9 | 1,2 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 1,1 | 0,9 | 0,8 | 0,8 | 1,1 | 0,9 | 1,2 | 0,6 | 0,5 | 0,7 | 0,8 | 0,9 | 1,7 | 0,6 | 0,7 |
| C18:0 | 28,3 | 25,2 | 25,5 | 29,6 | 26,8 | 29,9 | 28,8 | 25,1 | 21,1 | 22,1 | 30,2 | 25,3 | 34,8 | 32,6 | 34,9 | 38,9 | 39,3 | 37,3 | 32,2 | 31,8 |
| C18:1 | 20,1 | 19,2 | 12,9 | 12,1 | 12,9 | 13,5 | 14,3 | 13,4 | 12,4 | 10,0 | 12,3 | 14,5 | 12,8 | 12,5 | 13,5 | 13,7 | 14,6 | 12,2 | 11,5 | 10,9 |
| C18:2 | 16,8 | 19,9 | 36,3 | 33,0 | 32,7 | 24,3 | 27,6 | 29,6 | 37,9 | 38,4 | 10,3 | 10,7 | 20,1 | 20,7 | 18,9 | 12,2 | 16,6 | 14,5 | 24,4 | 26,7 |
| C18:3 | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,9 | 0,4 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 1,0 | 0,3 | 0,3 | 0,6 | 0,5 | 0,8 | 0,6 | 0,5 | 0,4 | 1,0 | 1,1 |
| C20:4 | 5,1 | 8,4 | 4,7 | 6,7 | 6,3 | 3,7 | 4,0 | 8,6 | 5,0 | 3,3 | 19,7 | 23,8 | 15,1 | 17,3 | 15,1 | 11,6 | 9,8 | 14,3 | 12,1 | 10,4 |
| C22:5 | 2,1 | 2,5 | 1,7 | 2,2 | 2,5 | 1,8 | 1,9 | 1,8 | 1,1 | 1,3 | 3,4 | 3,9 | 2,2 | 2,5 | 2,6 | 1,9 | 2,1 | 1,7 | 2,7 | 2,5 |
| C22:6 | 2,8 | 3,1 | 2,6 | 2,9 | 3,1 | 3,1 | 4,6 | 5,2 | 2,2 | 2,0 | 9,2 | 10,1 | 4,9 | 5,1 | 5,2 | 5,4 | 5,3 | 5,5 | 4,8 | 4,7 |

$T_1$ : Trivemil 14 jours
$T_2$ : Trivemil 14 jours
$T_3$ : Trivemil 7 jours

$I_1$ : Intralipid 28 jours
$I_2$ : Intralipid 14 jours
$I_3$ : Intralipid 7 jours

$L_1$ : Lipiphysan 7 jours
$L_2$ : Lipiphysan 7 jours

$A_1$, $A_2$ : Témoins

TABLEAU 18

COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES P.C. ET P.E. DU COEUR

| | Phosphatidyl choline | | | | | | | | | | Phosphatidyl éthanolamine | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
| C16:0 | 21,1 | 26,1 | 22,9 | 18,9 | 20 | 18,3 | 16,7 | 19,1 | 21,2 | 19,6 | 6 | 5,4 | 8,1 | 7,8 | 4,6 | 6,9 | 7 | 3,5 | 5 | 3,9 |
| C16:1 | 1 | 1 | 1,1 | 1,1 | 1 | 1,1 | 1,1 | 1,3 | 1,1 | 1,7 | 0,4 | 0,5 | 0,3 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,3 |
| C18:0 | 10,3 | 8,9 | 11,3 | 11,8 | 15,2 | 12,9 | 12,7 | 11,9 | 12,7 | 10,5 | 29,3 | 28,3 | 22,1 | 21,6 | 31 | 29,3 | 28,4 | 21,4 | 22,9 | 21,9 |
| C18:1 | 18,4 | 21,2 | 21 | 19,1 | 19,9 | 20,1 | 19,5 | 18,3 | 15,7 | 17,5 | 4,3 | 5,2 | 6,1 | 5,3 | 6,8 | 9,8 | 7,8 | 6,4 | 8,6 | 6,3 |
| C18:2 | 39,3 | 33,7 | 33,9 | 36,3 | 33,6 | 37,5 | 38,8 | 39 | 38,9 | 38,9 | 20 | 20,5 | 22,1 | 20,3 | 21 | 25,9 | 23,8 | 25,5 | 24,9 | 25,3 |
| C18:3 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | 1,3 | 1 | 1,5 | 1,4 | 1,6 | 1,4 | 1,1 | 0,5 | 0,5 | 0,8 | 0,6 | 0,7 | 0,6 | 0,9 | 0,8 | 0,6 | 0,9 |
| C20:4 | 6,9 | 6,4 | 7 | 9,9 | 7,6 | 6,9 | 8,1 | 7,1 | 7 | 8,5 | 34 | 33,7 | 34,4 | 36,2 | 30,7 | 19,7 | 24,6 | 34,6 | 30,2 | 33,7 |
| C22:5 | 1 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 1 | 1 | 0,9 | 0,9 | 1,1 | 1,4 | 3,1 | 3,2 | 2,9 | 3,3 | 2,1 | 3,1 | 3,2 | 3,3 | 3,4 | 4,1 |
| C22:6 | 0,7 | 0,7 | 0,8 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,8 | 0,7 | 0,8 | 0,8 | 2,6 | 2,8 | 3,3 | 4,4 | 2,7 | 4,1 | 3,8 | 4 | 4 | 3,6 |

BUS LILLE

TABLEAU 19

COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES P.C. ET P.E. DU REIN

| | Phosphatidyl choline | | | | | | | | | | Phosphatidyl éthanolamine | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
| C16:0 | 25,7 | 37,7 | 26,1 | 29,7 | 26,6 | 27,1 | 26,6 | 25,5 | 27,1 | 31,3 | 9,2 | 8,8 | 9,8 | 7,8 | 9,2 | 7,7 | 7,5 | 6,8 | 7,9 | 9,1 |
| C16:1 | 1,2 | 0,8 | 1,6 | 1,2 | 1,8 | 1,3 | 1,3 | 1,8 | 1,4 | 1,7 | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 0,7 | 0,6 | 0,6 | 0,6 | 0,7 | 0,7 | 0,7 |
| C18:0 | 16,1 | 13,5 | 13,9 | 12,4 | 15,7 | 14,6 | 13,3 | 11,8 | 11,2 | 12,3 | 18,1 | 17,6 | 13,4 | 15,5 | 17,4 | 17,6 | 16,8 | 15,4 | 17 | 18,5 |
| C18:1 | 17,9 | 14,5 | 17,1 | 17,7 | 16 | 21,9 | 21,1 | 19,9 | 18,6 | 18,6 | 15 | 16,4 | 18,5 | 19,1 | 18,6 | 19,7 | 20,1 | 19,6 | 18,4 | 21,7 |
| C18:2 | 25 | 22,2 | 33 | 32 | 32,1 | 28,3 | 31,5 | 31,5 | 34,2 | 30,2 | 11,2 | 12,1 | 21,9 | 20,2 | 17,6 | 22,4 | 22,8 | 18,3 | 18,9 | 20,8 |
| C18:3 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,6 | 0,5 | 1,3 | 1,1 | 0,8 | 0,8 | 0,9 | 0,4 | 0,4 | 0,5 | 0,7 | 0,6 | 0,7 | 0,8 | 0,7 | 1,1 | 0,7 |
| C20:4 | 11,9 | 9 | 6,5 | 5,1 | 6 | 3,7 | 3,4 | 6,8 | 5,2 | 3,7 | 35,8 | 36,6 | 27,9 | 29,1 | 28,8 | 23,9 | 24,1 | 30,8 | 27,7 | 22,2 |
| C22:5 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 0,8 | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 0,7 | 0,6 | 2,7 | 1,9 | 1,8 | 1,3 | 1,6 | 1,4 | 1,5 | 1,3 | 3 | 1,7 |
| C22:6 | 0,9 | 1 | 0,7 | 0,7 | 0,6 | 1,2 | 1,1 | 1,3 | 0,8 | 0,7 | 6,9 | 5,5 | 5,5 | 5,7 | 5,6 | 6 | 5,8 | 6,4 | 5,3 | 4,6 |

BUS LILLE

TABLEAU 20

COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES P.C. ET P.E. DU POUMON

| | Phosphatidyl choline | | | | | | | | | | Phosphatidyl éthanolamine | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
| C16:0 | 49,6 | 49,7 | 40,8 | 41,8 | 44,7 | 44,1 | 41,3 | 45,7 | 39,2 | 47,1 | 17,4 | 15,8 | 11 | 10,8 | 10,4 | 13,7 | 9,4 | 10 | 13,1 | 10,7 |
| C16:1 | 4,3 | 4,2 | 3,6 | 3,5 | 3,3 | 3,4 | 3,6 | 3,5 | 3,8 | 4,5 | 1,2 | 1,5 | 1 | 1 | 0,9 | 1 | 1,3 | 1,2 | 1,4 | 1,4 |
| C18:0 | 11 | 11,6 | 11,2 | 11,1 | 10,7 | 8,6 | 8,3 | 9,4 | 13 | 9,5 | 22,4 | 22,7 | 17,9 | 17,5 | 17,3 | 19,2 | 18,3 | 14,9 | 20,4 | 18,5 |
| C18:1 | 18,8 | 19,4 | 17,4 | 17,3 | 16,4 | 14,4 | 17,6 | 18,1 | 19,5 | 14,4 | 20,2 | 25,1 | 19,7 | 19,6 | 20,1 | 18,8 | 22,4 | 23,9 | 19,5 | 20,7 |
| C18:2 | 13,2 | 11,4 | 20,6 | 20 | 18,9 | 23,2 | 21,5 | 17,8 | 24 | 20,2 | 12,6 | 10,3 | 18,7 | 17,8 | 15,5 | 18,2 | 16,5 | 14,6 | 19,1 | 18,7 |
| C18:3 | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 0,6 | 0,5 | 0,8 | 0,6 | 0,5 | 1,1 | 0,9 | 0,3 | 0,4 | 0,7 | 0,6 | 0,6 | 0,9 | 0,8 | 0,6 | 0,7 | 0,6 |
| C20:4 | 1,6 | 2,8 | 4,7 | 4,5 | 4,4 | 3,4 | 3,8 | 4,2 | 2,5 | 2,8 | 20,1 | 19,8 | 23,7 | 25,0 | 27,3 | 20,4 | 23,4 | 26,5 | 17,8 | 22,2 |
| C22:5 | 0,7 | 0,3 | 0,6 | 0,6 | 0,7 | 1,3 | 1,6 | 0,4 | 0,5 | 0,4 | 3,4 | 2,6 | 4,5 | 4,8 | 5 | 5 | 4,9 | 5,2 | 4,9 | 4,6 |
| C22:6 | 0,3 | 0,2 | 0,5 | 0,5 | 0,4 | 0,9 | 1,6 | 0,4 | 0,5 | 0,2 | 2,4 | 1,7 | 3,1 | 3 | 3 | 2,8 | 2,9 | 3,1 | 3 | 2,5 |

BUS LILLE

TABLEAU 21

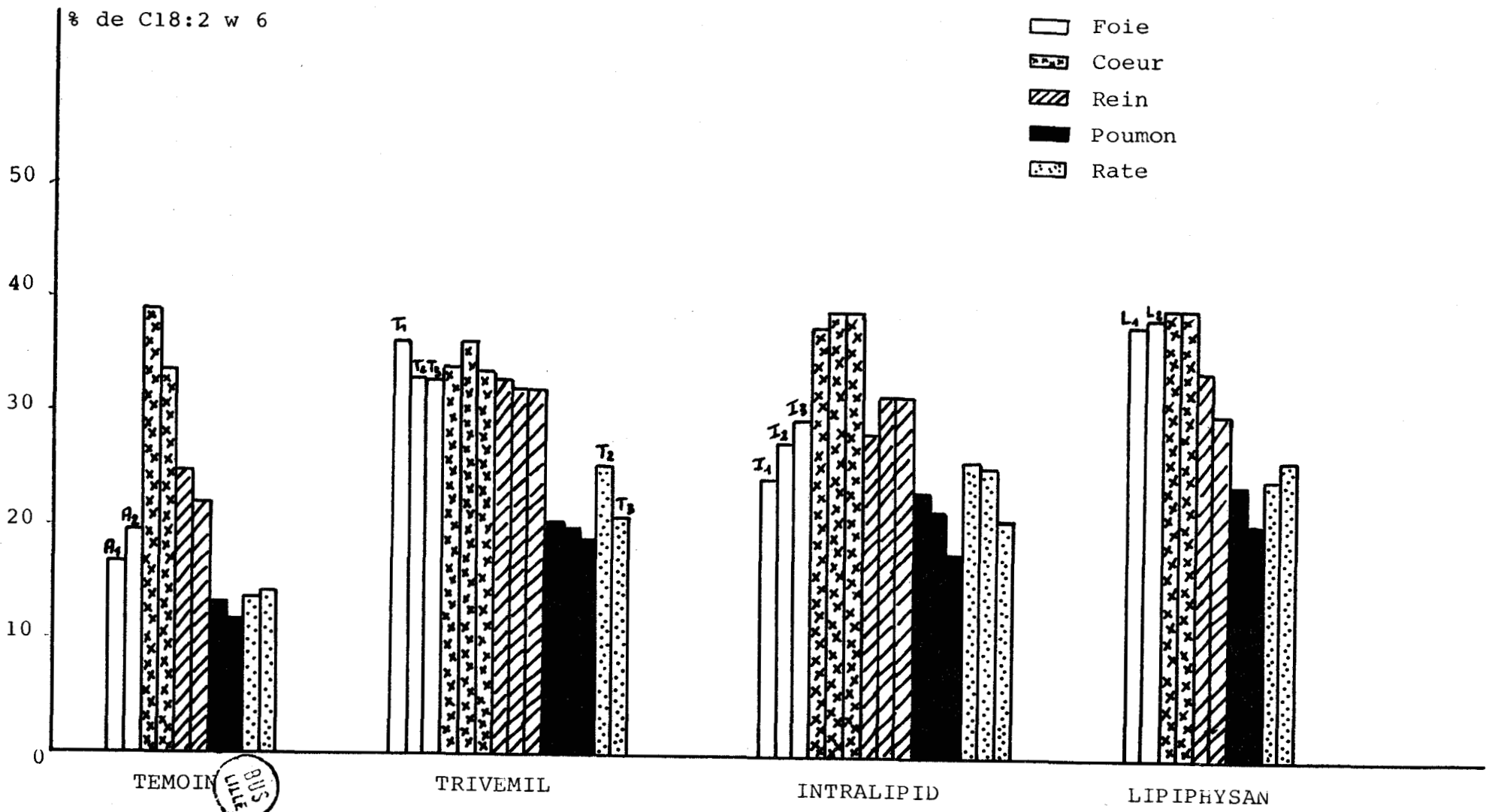
COMPOSITION CENTESIMALE EN ACIDES GRAS DES P.C. ET P.E. DE LA RATE

| | Phosphatidyl choline | | | | | | | | | | Phosphatidyl éthanolamine | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ | $A_1$ | $A_2$ | $T_1$ | $T_2$ | $T_3$ | $I_1$ | $I_2$ | $I_3$ | $L_1$ | $L_2$ |
| C16:0 | 40,4 | 40,4 | | 27,2 | 38,4 | 37,1 | 36,4 | 35,6 | 38,2 | 40,8 | 7,1 | 6,4 | | 11,3 | 8 | 10,5 | 10,9 | 6,7 | 11,1 | 10,4 |
| C16:1 | 2,2 | 2,1 | | 2,2 | 1,8 | 3,1 | 2,9 | 3,6 | 2,8 | 2,3 | 0,7 | 0,6 | | 0,9 | 1,1 | 0,9 | 0,8 | 0,9 | 1 | 1,1 |
| C18:0 | 14,0 | 12,9 | | 13,5 | 12,6 | 12,2 | 10,4 | 13,1 | 11,8 | 11,5 | 19,9 | 20,4 | | 20 | 20,3 | 18,2 | 17,4 | 17,9 | 19,2 | 21,3 |
| C18:1 | 14,1 | 14 | | 16,5 | 12,3 | 15,4 | 16,3 | 14 | 15,4 | 11,8 | 9,5 | 10,4 | | 14,1 | 12 | 14,1 | 17,8 | 11,9 | 14,6 | 15,3 |
| C18:2 | 13,8 | 14,2 | | 25,5 | 20,8 | 26,1 | 25,4 | 21,1 | 24,5 | 26,5 | 5,8 | 6,5 | | 19,7 | 12,7 | 18,5 | 18,1 | 11,2 | 18,5 | 19,6 |
| C18:3 | 0,6 | 0,4 | | 0,5 | 0,6 | 0,4 | 0,5 | 0,6 | 1 | 0,9 | 0,5 | 0,4 | | 0,8 | 0,6 | 0,9 | 0,9 | 0,5 | 0,7 | 0,9 |
| C20:4 | 11,8 | 13,6 | | 12 | 10,9 | 3,6 | 6,2 | 9,4 | 4,8 | 5 | 43,2 | 43,7 | | 21,9 | 33 | 24 | 23,1 | 35,4 | 25,1 | 23,3 |
| C22:5 | 2,2 | 1,6 | | 1,6 | 1,8 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | 1 | 0,9 | 7,5 | 6,7 | | 7,1 | 7,6 | 6,8 | 5,1 | 7,7 | 6 | 5,3 |
| C22:6 | 0,9 | 1 | | 1 | 0,8 | 0,9 | 0,8 | 1,4 | 0,5 | 0,3 | 5,8 | 4,9 | | 4,1 | 4,7 | 6,1 | 5,9 | 7,8 | 3,8 | 2,9 |

BUS LILLE

Figure 20

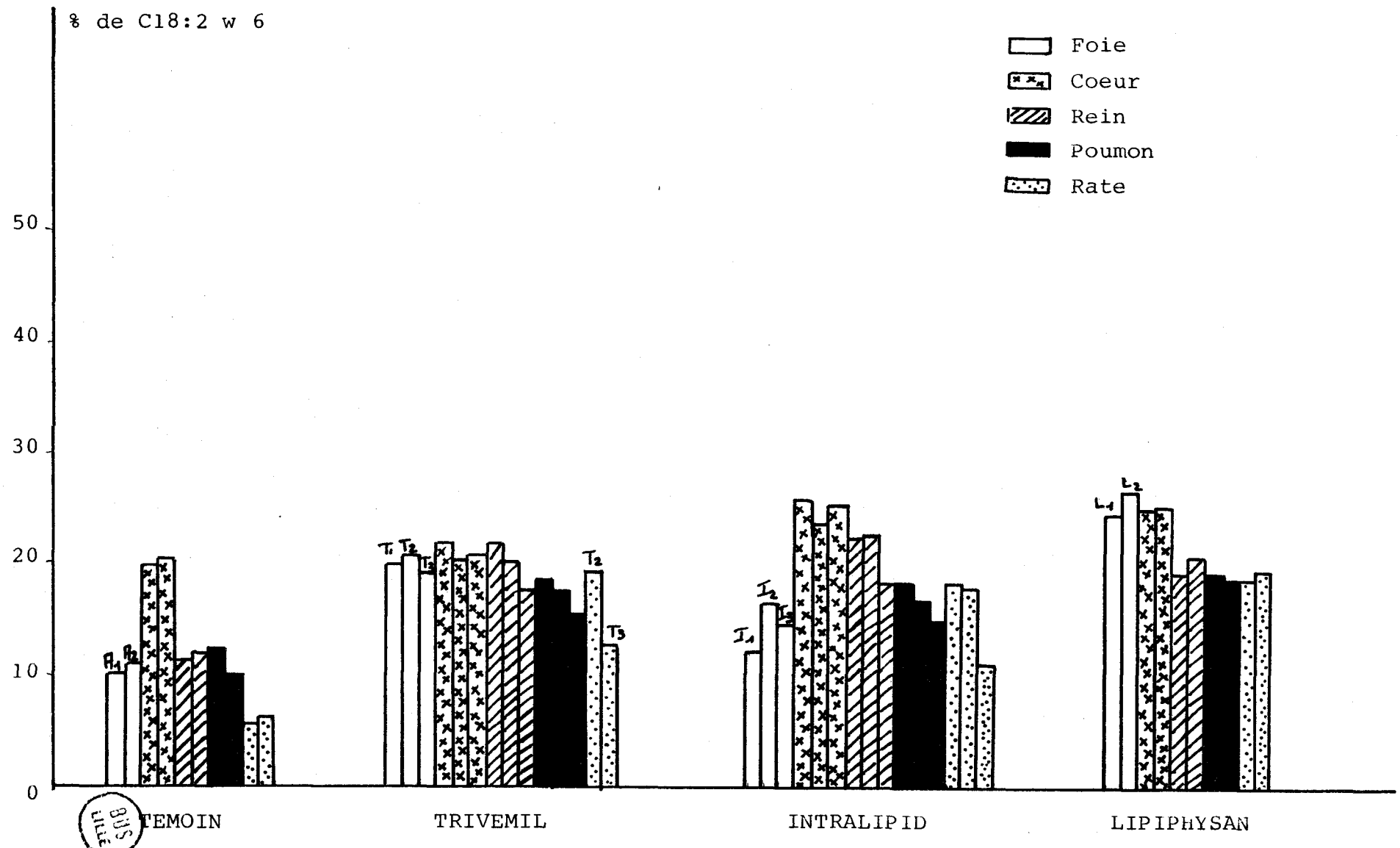
TAUX D'ACIDE LINOLEIQUE DANS LA PHOSPHATIDYL CHOLINE




BUS LILLE

Figure 21

TAUX D'ACIDE LINOLEIQUE DANS LE PHOSPHATIDYL ETHANOLAMINE




BUS LILLE

## VIII - Conclusions :

L'étude des différentes classes lipidiques tissulaires après administration de trois types d'émulsions lipidiques artificielles nous a permis de montrer que seuls les triglycérides s'accumulent dans les organes. L'intensité des dépôts dépend de la nature de l'huile entrant dans la composition de l'émulsion. Il apparaît que ce soit l'huile de coton qui induise les plus fortes accumulations, bien que comme nous l'avons vu, la composition en acides gras de cette huile diffère très peu de l'huile de soja. Il est donc permis de penser que ce n'est pas l'huile en temps que telle qui soit responsable des perturbations, mais que le comportement des particules lipidiques du Lipiphysan diffère de celui des lipides de l'Intralipid et du Trivémil.

Nous avons également pû remarquer que le foie, le poumon et surtout la rate sont les organes qui subissent les plus fortes altérations, alors que le coeur ne semble pas affecté par l'administration intraveineuse de ces émulsions.

L'acide linoleique étant l'acide gras majeur des deux huiles utilisées dans la préparation des émulsions, il peut être considéré comme marqueur dans l'étude du devenir métabolique de ces émulsions lipidiques. L'augmentation relative du taux de cet acide gras reflète parfaitement les accumulations de triglycérides mentionnées précédemment, on peut donc en conclure que les lipides qui se fixent au niveau des tissus proviennent des émulsions.

Malgré l'accumulation des triglycérides, une part est

nécessairement hydrolysée. Des acides gras et surtout l'acide linoleique sont libérés ; ils peuvent ensuite être incorporés dans de nouvelles synthèses et notamment dans celles des lipides phosphorés ce qui expliquerait l'augmentation du taux d'acide linoleique dans les phosphatidylcholines et les phosphatidyl-éthanolamines, bien que le taux de ces composés reste constant dans les tissus.

A la lumière de ces résultats trois hypothèses peuvent être soulevées :

- Le mode et l'intensité de la captation sont spécifiques du type d'émulsion.
- Le métabolisme lipidique du Lipiphysan diffère de celui des autres émulsions.
- Captation et utilisation sont toutes deux perturbées par l'administration de Lipiphysan.

Afin de tenter de dégager l'une ou l'autre de ces hypothèses, il nous a semblé intéressant de poursuivre nos travaux par l'étude des mécanismes d'épuration des émulsions lipidiques artificielles au niveau hépatique. A cette fin nous avons utilisé la technique de perfusion de foie de rat isolé.

# QUATRIEME PARTIE

## PERFUSIONS DE FOIE ISOLE

Cette étude a été réalisée avec la collaboration du Laboratoire de Physiologie de la Faculté de Médecine ( Université de LILLE II ) dirigé par le Professeur J. VANLERENBERGHE.

## I - Protocole expérimental :

La méthode utilisée est une adaptation du système de perfusion de foie isolé décrit par MILLER L. ( 86 ) dont le schéma du montage est reproduit dans la figure 1 page( 125 ).

Le perfusat employé est constitué par du sang de rat* défibriné auquel sont ajoutés des ions, de l'albumine et du glucose dans les proportions suivantes :

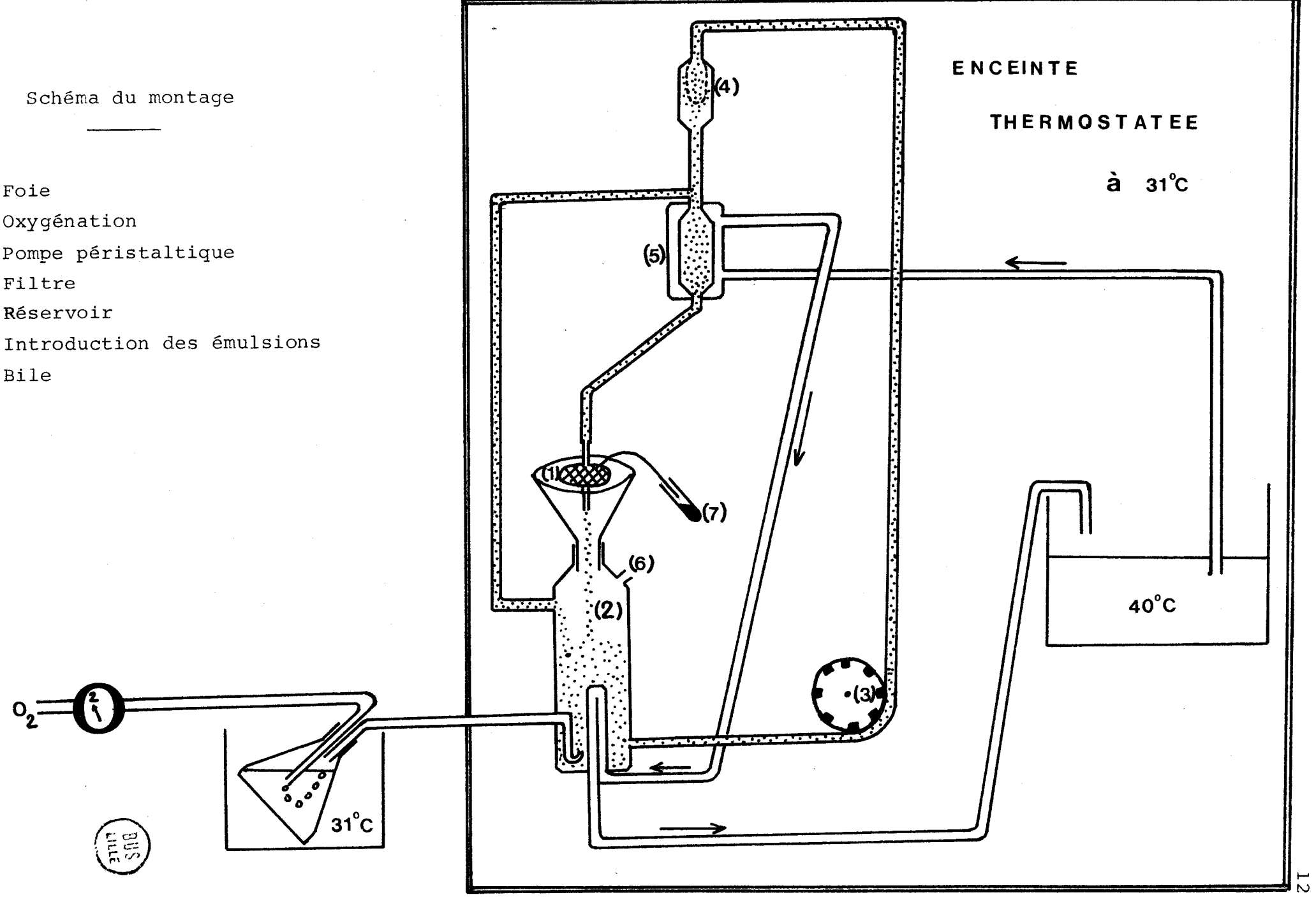
- 45 ml de sang défibriné
- 45 ml d'une solution contenant :
  - . 1,5 g d'albumine
  - . 150 mg de glucose
  - . 382 mg de NaCl
  - . 17,4 mg de KCl
  - . 5 mg de $CaCl_2$
  - . 26,2 mg de $NaH\ CO_3$
  - . 96,7 mg de $Na_2\ HPO_4$
  - . 9,5 mg de $KH_2\ PO_4$

Après canulation du canal cholédoque, de la veine porte et de la veine cave inférieure, le foie est prélevé et très rapidement placé sur son support au-dessus de l'oxygénateur dans l'enceinte thermostatée à

* 10 rats sont sacrifiés pour obtenir un volume de sang suffisant.

Schéma du montage

1 - Foie
2 - Oxygénation
3 - Pompe péristaltique
4 - Filtre
5 - Réservoir
6 - Introduction des émulsions
7 - Bile




BUS LILLE

31 ° C. Le perfusat est introduit par la veine porte et s'écoule par la veine cave inférieure. La vitesse d'écoulement de la bile par le petit cathéter placé dans le canal cholédoque permet de controler l'état physiologique de l'organe.

Après une période d'adaptation de une heure environ, l'écoulement de bile se stabilise. Un premier prélèvement de perfusat est alors effectué, celui-ci correspondant au temps 0 et servant de témoin. 1,5 ml de l'émulsion est ensuite introduit dans le perfusat au niveau de l'oxygénateur et des prélèvements sont effectués aux temps 5-10-15-30-45 et 60 minutes.

Afin d'apprécier l'intensité de la captation et le métabolisme de ces émulsions au niveau hépatique, nous avons effectué deux types de dosage sur le surnageant après centrifugation des prélèvements :

- Mesure de l'index de turbidité qui rend compte de la concentration du perfusat en particules lipidiques donc en fait de l'intensité de la captation de l'émulsion.

- Dosage des triglycérides et du glycérol libre d'une part et dosage des acides gras libres d'autre part. Ces deux analyses sont effectuées par des méthodes semi-automatiques. Ces mesures permettent d'apprécier à la fois la vitesse d'épuration des triglycérides exogènes, la synthèse des triglycérides sans dissocier les deux phénomènes et l'intensité de l'hydrolyse enzymatique des triglycérides. Nous avons vérifié que le sorbitol, à la dilution à laquelle il est présent dans le perfusat n'interférait pas dans le dosage du glycérol des triglycérides.

## II - Résultats :

Les variations de l'index de turbidité (tableau A page 128, figure 1 page 129 ) montrent que la vitesse d'épuration du Lipiphysan est supérieure à celle de l'Intralipid ou du Trivémil, en effet après 60 minutes de perfusion, cet index a diminué de 23 % avec le Lipiphysan alors qu'il est pratiquement constant avec les deux autres émulsions.

Cette captation continue et relativement rapide du Lipiphysan est un facteur permettant de comprendre l'accumulation des triglycérides au niveau hépatique, mais il ne suffit pas à lui seul à l'expliquer, le métabolisme lipidique de ces particules est aussi déterminant. Dans le but d'apprécier l'intensité et le mode d'action de ce facteur, nous avons dosé le taux de glycérol libre et estérifié ainsi que le taux d'acides gras libres.

Le tableau B page (130) et la figure 2 page (131 ) montrent que les émulsions se comportent différemment. Dans le cas de l'Intralipid la courbe peut être décomposée en deux parties : une première phase où la pente de la courbe est très forte, et une seconde phase au cours de laquelle la variation est très faible. Cette observation ne traduit en fait qu'une particularité de la composition de cette émulsion, c'est en effet la seule qui soit préparée avec du glycérol. La première partie de la courbe ne traduit donc en fait qu'une captation quasi-immédiate du glycérol libre de l'émulsion, seule la seconde partie de la courbe est intéressante dans la comparaison du comportement hépatique vis à vis

TABLEAU A

VARIATION DE LA TURBIDITE EN FONCTION DU TEMPS

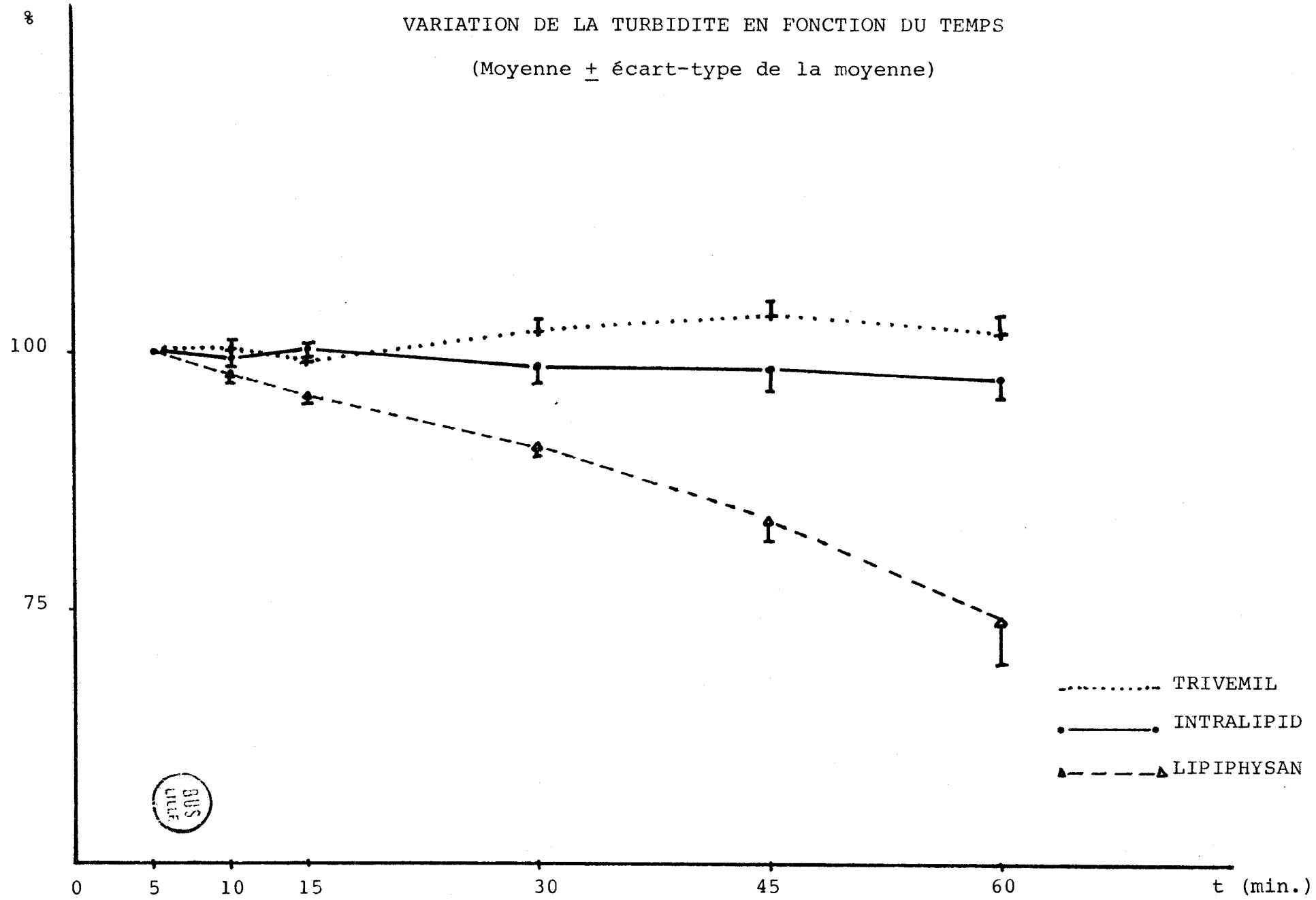
(Moyennes de 6 expérimentations)

| | TRIVEMIL | | INTRALIPID | | LIPIPHYSAN | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Temps en mn | Index de Turbidité (D.O. x 100) | | Index de Turbidité | | Index de Turbidité | |
| | Moyenne | Ecart Type | Moyenne | Ecart Type | Moyenne | Ecart Type |
| 5 | 30,5 | 1,0 | 38,7 | 3,2 | 63,9 | 10,6 |
| 10 | 30,5 | 0,8 | 38,5 | 4,0 | 62,5 | 10,8 |
| 15 | 30,2 | 1,0 | 38,7 | 2,9 | 61,1 | 10,1 |
| 30 | 31,0 | 1,1 | 38,2 | 3,7 | 57,8 | 8,7 |
| 45 | 31,5 | 1,2 | 38,0 | 4,0 | 53,2 | 8,5 |
| 60 | 31,0 | 1,7 | 37,5 | 3,2 | 46,8 | 8,2 |

Figure 1

VARIATION DE LA TURBIDITE EN FONCTION DU TEMPS

(Moyenne ± écart-type de la moyenne)




BUS LILLE

TABLEAU B

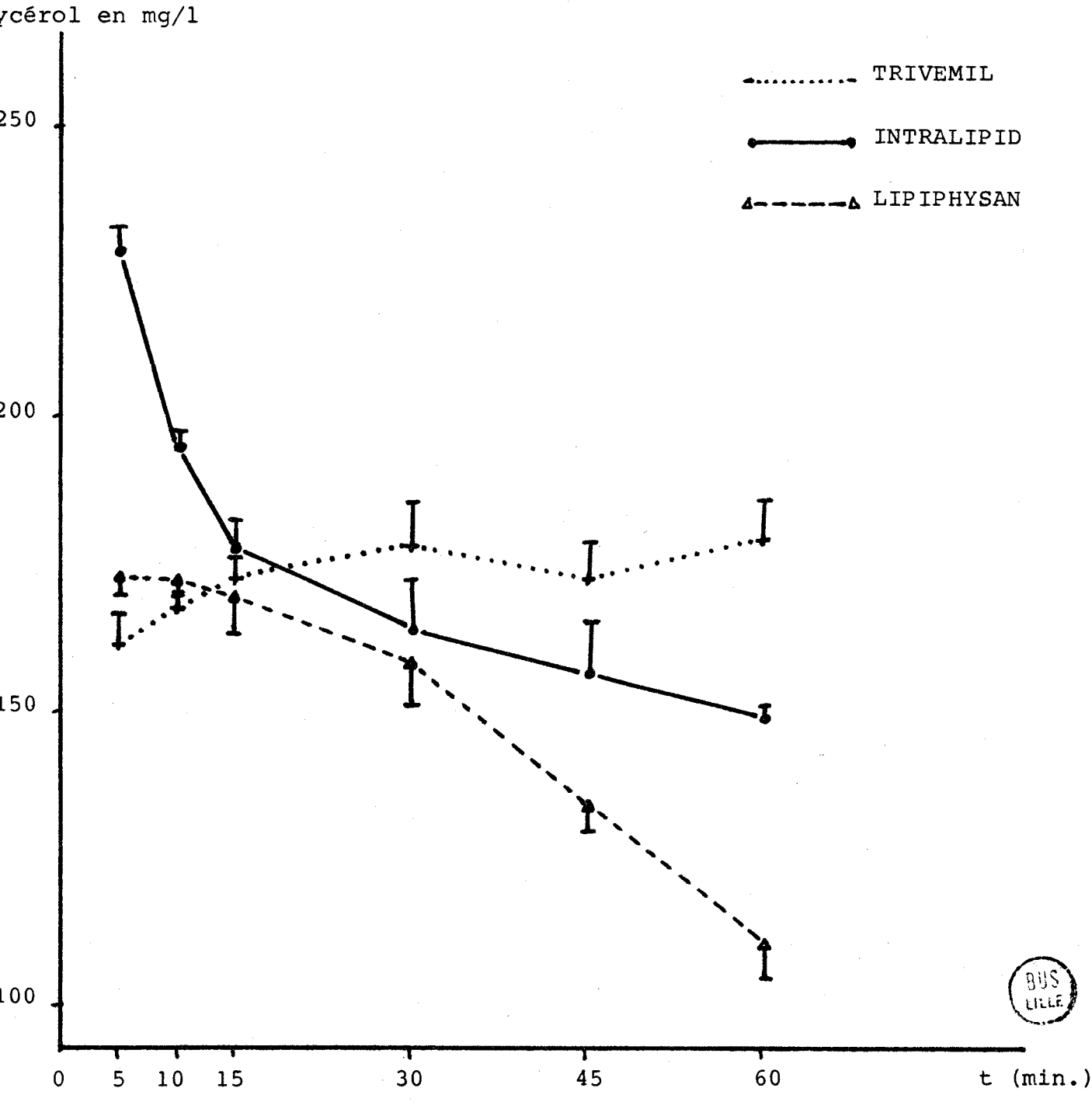
VARIATIONS DE LA CONCENTRATION DU PERFUSAT EN GLYCEROL
(GLYCEROL LIBRE + GLYCEROL DES TRIGLYCERIDES) EN FONCTION DU TEMPS

| | TRIVEMIL | | INTRALIPID | | LIPIPHYSAN | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Temps en mn | Glycérol en mg/l | | Glycérol en mg/l | | Glycérol en mg/l | |
| | Moyenne | Ecart Type | Moyenne | Ecart Type | Moyenne | Ecart Type |
| 5 | 161 | 14 | 228 | 9 | 173 | 6 |
| 10 | 167 | 9 | 195 | 4 | 172 | 2 |
| 15 | 173 | 9 | 178 | 8 | 169 | 10 |
| 30 | 178 | 18 | 164 | 17 | 158 | 12 |
| 45 | 173 | 14 | 157 | 16 | 133 | 6 |
| 60 | 179 | 18 | 149 | 4 | 110 | 10 |

Figure 2

VARIATION DU TAUX DE GLYCEROL TOTAL EN FONCTION DU TEMPS

(Moyenne ± écart-type de la moyenne)




BUS LILLE

des lipides de l'émulsion. On remarque alors que la seconde cinétique de très faible pente répond probablement à une dégradation enzymatique et une captation lente des triglycérides de l'émulsion, par contre la chute importante du taux de glycérol dans le cas du Lipiphysan traduit une disparition des triglycérides de l"émulsion. Quant au Trivémil, on ne note pas de variations sensibles du taux du glycérol des triglycérides dans le perfusat. Cette dernière observation fait apparaître une légère divergence entre deux émulsions ( Intralipid et Trivémil ) qui semblaient jusqu'alors avoir le même comportement.

Si l'on examine les variations du taux d'acides gras libres en fonction du temps ( tableau C page 133 , figure 3 page 134 ) en appliquant un index où le temps 5 minutes correspond à 100 %, on constate que cet index diminue fortement avec le Lipiphysan et plus fortement encore avec le Trivémil, alors qu'il est constant avec l'Intralipid. Pour expliquer la stabilité du taux d'acides gras libres avec l'Intralipid, il faut considérer que les triglycérides de cette émulsion subissent une hydrolyse enzymatique partielle et que les acides gras libérés assurent l'équilibre du taux de ces composés. Ce résultat et son interprétation sont en parfaite concordance avec le résultat précédent montrant la faible variation du taux de glycérol.

Dans le cas du Trivémil; il ne paraît pas y avoir de recyclage des acides gras, cette non utilisation des lipides du Trivémil est également confirmée par le taux de glycérol des triglycérides qui ne varie pas.

TABLEAU C

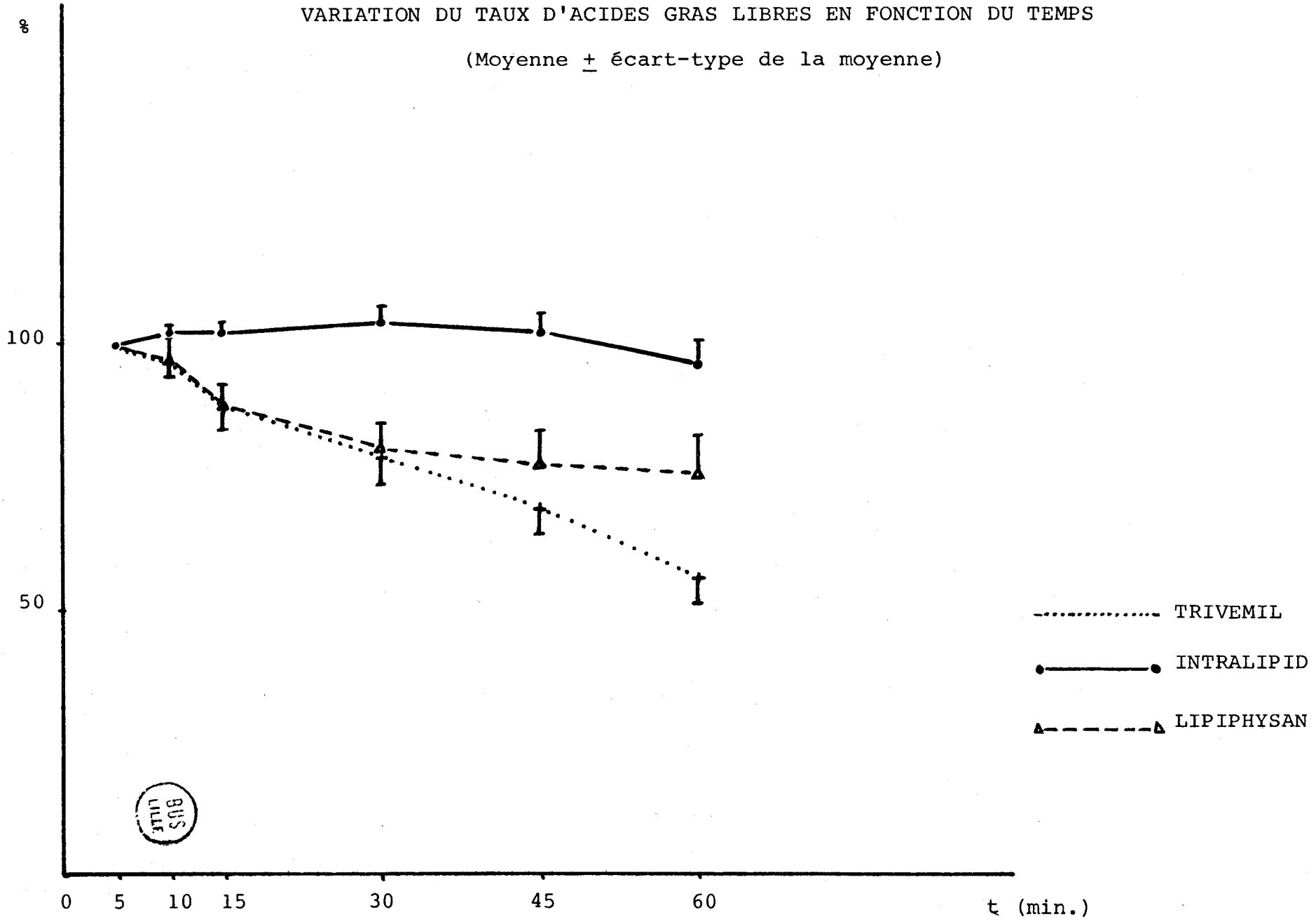
VARIATION DU TAUX DES ACIDES GRAS LIBRES EN FONCTION DU TEMPS
PAR RAPPORT AU TEMPS 5 mn (100 %)

| | TRIVEMIL | | INTRALIPID | | LIPIPHYSAN | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Temps en mn | AGNE | | AGNE | | AGNE | |
| | Moyenne | Ecart Type | Moyenne | Ecart Type | Moyenne | Ecart Type |
| 5 | 100 % | 0 | 100 % | 0 | 100 % | 0 |
| 10 | 96,7 | 6,1 | 102 | 4,2 | 97 | 6,3 |
| 15 | 88,2 | 5,9 | 102 | 4,9 | 88 | 9,6 |
| 30 | 78,6 | 14,8 | 104 | 7,9 | 80 | 11,5 |
| 45 | 60,8 | 14,1 | 102 | 8,6 | 77 | 15,7 |
| 60 | 55,7 | 10,3 | 96 | 10,5 | 75 | 18,6 |

Figure 3

VARIATION DU TAUX D'ACIDES GRAS LIBRES EN FONCTION DU TEMPS

(Moyenne ± écart-type de la moyenne)




BUS LILLE

## III - Conclusions :

Les résultats obtenus nous montrent qu'en fait le métabolisme hépatique des trois émulsions expérimentées, au taux où elles sont ajoutées au perfusat, est différent.

La disparition rapide des particules lipidiques du Lipiphysan dans le perfusat fait penser à une captation directe de ces particules par l'intermédiaire du système réticuloendothélial. Par contre, les triglycérides de l'Intralipid doivent, sous l'action de la triglycéride-lipase hépatique, subir une dégradation enzymatique partielle expliquant la faible diminution du taux de glycérol et l'équilibre du taux des acides gras libres. Quant au Trivémil, l'index de turbité et le taux de glycérol semblent indiquer que les triglycérides de cette émulsion ne soient ni captés directement, ni partiellement hydrolysés par le tissu hépatique au taux où cette émulsion est introduite dans le perfusat.

# CONCLUSIONS GENERALES

Le comportement différent des émulsions lipidiques expérimentées est vérifié à la fois par les études tissulaires et par les résultats obtenus dans les perfusions de foie de rat isolé.

Le système réticulo-endothélial particulièrement riche au niveau du foie, de la rate et du poumon semble être responsable de la rapide captation des particules lipidiques du Lipiphysan, induisant une très forte accumulation des triglycérides dans ces organes. Dans une expérimentation effectuée chez l'homme, (WAREMBOURG et coll. (87) la disparition du Lipiphysan est beaucoup plus rapide que dans l'étude consacrée aux perfusions de foie isolé ou seul le tissu hépatique est en cause. Ceci montre que le système réticulo-endothélial en général participe à l'épuration. Il est donc logique de retrouver des taux élevés de triglycéridesdans les organes où ce système réticulo-endothélial est dense. Les faibles variations du taux de triglycérides au niveau du rein et du coeur s'expliquent par la pauvreté en système réticulo-endothélial de ces organes.

Les faibles variations des lipides tissulaires après administration d'Intralipid sont liées au fait que les triglycérides de cette émulsion sont incorporés par un processus mettant en jeu une hydrolyse enzymatique. Cette hydrolyse est non seulement hépatique comme nous le suggère les expérimentations sur foie perfusé, mais aussi probablement extra-hépatique par le biais de la lipoproteine-lipase du tissu adipeux comme l'ont montré JAILLARD et coll. (88).

Quant au Trivémil, bien que nous n'ayons pas mis en évidence une incorporation hépatique de cette émulsion, il est permis de penser que les triglycérides de cette émulsion soient hydrolysés par la

lipoproteine-lipase des tissus extra-hépatiques expliquant le comportement voisin de l'Intralipid et du Trivémil vis à vis des lipides tissulaires.

Comment expliquer cette différence dans le mode de captation suivant la nature de l'huile incorporée dans l'émulsion ?

Les compositions très voisines en acides gras de l'huile de coton et de l'huile de soja peuvent difficilement expliquer ces divergences. Il semble donc que ce soit le comportement différent des particules lipidiques elles-mêmes qui induit ces variations.

HALLBERG, D. ( 89 ) a montré qu'injectées dans de telles conditions, les particules lipidiques d'Intralipid acquièrent une copule proteique et se comportent comme des chylomicrons dont on sait que l'épuration plasmatique s'opère surtout au niveau des sites extra-hépatiques sous l'action de la lipoproteine-lipase. D'après les résultats tissulaires et les perfusions de foie isolé, il semble que ce processus d'épuration puisse également s'adapter aux particules lipidiques de Trivémil.

Par contre, pour expliquer les résultats obtenus avec le Lipiphysan, il faut supposer que les particules lipidiques de cette émulsion n'acquièrent pas cette copule proteique dans le sang. De ce fait, ces particules ne seront pas reconnues comme des homologues des chylomicrons mais comme des éléments étrangers à l'organisme, ce qui expliquerait leur rapide phagocytose par le système réticuloendothélial.

Ce serait donc la structure de la particule lipidique qui jouerait un rôle prépondérant dans le mode d'épuration.

A l'heure actuelle, compte tenu des travaux presentés et des réactions secondaires observées, le Lipiphysan tend à être abandonné au profit de l'Intralipid et du Trivémil lors d'une alimentation parentérale complète.

Aussi bien tolérées qu'elles puissent l'être, les émulsions lipidiques artificielles, et la nutrition par voie intraveineuse en générale, ne doivent être qu'une thérapeutique d'extrême urgence ou de dernière instance. On devrait toujours, lorsque cela est possible, lui préférer une nutrition orale ou par sonde gastrique. Ces procédés peuvent apporter d'aussi bons résultats tout en respectant la physiologie normale de l'organisme.

# APPENDICE TECHNIQUE

# Extraction des lipides.

D'après FOLCH J. and Coll.

J. Biol. Chem. 226.497 (1957)

## A/ PRINCIPE :

Les organes sont broyés mécaniquement dans le mélange chloroforme-méthanol. Le méthanol dénature les proteines et le chloroforme favorise la mise en solution des lipides totaux. Après addition d'eau et mélange, on obtient un déphasage avec passage dans la phase hydroalcoolique supérieure des substances hydrosolubles, la phase inférieure chloroformique renferme les lipides totaux à l'état pur.

## B/ MATERIEL ET METHODE :

### 1 - Réactifs :

- Solvant d'extraction Chloroforme/Méthanol ( 2/1-V/V )
- Solution de NaCl à 7,5 g/l
- Liquide de lavage : Chloroforme 8 volumes
  Méthanol 4 volumes
  Eau 3 volumes

. Agiter en ampoule à décanter, laisser reposer et récupérer la phase supérieure.

. Mesurer la phase supérieure et additionner NaCl à raison de 2,9 g pour 1000 ml.

. Agiter jusqu'à dissolution complète.

2 - Extraction :

- 1 g de tissu est homogénéisé dans 20 ml de solvant d'extraction à l'aide d'un homogénéisateur Ultra-Turax. Laisser reposer 24 heures et filtrer sur filtre sans cendres en rinçant bien le haut du filtre avec le mélange d'extraction.

- Ajouter 4 ml de solution de NaCl à 7,5 g/l et agiter vigoureusement pendant une minute.

- Abandonner une nuit à température ambiante pour permettre le déphasage. Siphoner la phase hydroalcoolique et laver trois fois la phase chloroformique avec le liquide de lavage.

- Prélever une fraction aliquote de l'extrait et évaporer à sec en vue de l'étude pondérale des lipides totaux.

# Dosages simultanés du Cholestérol et des Triglycérides sur autoanalyseur Technicon.

D'après LEON L.P, RUSH R.L, TURREL J.
Advances in automated analysis Technicon.
Internation Congress (1970).

## A - PRINCIPE :

Après extraction des lipides par l'isopropanol, les phospholipides sont éliminés par adsorption sur une résine (zéolite). L'addition de bentonite permet d'absorber la bilirubine éventuelle.

- Les Triglycérides sont saponifiés par la potasse alcoolique. Le glycérol libéré est oxydé par oxydation périodique en formaldéhyde qui est ensuite condensé avec l'acétylacétone et les ions ammonium en 3,5 diacétyl 1,4 dihydrolutidine fluorescente. L'intensité de la fluorescence est appréciée à 485 nm après excitation à 405 nm.

- Le cholestérol est dosé par la réaction de LIEBERMAN-BURCHARD développée à température constante (60°C). La coloration verte obtenue est lue à 630 nm.

## B - REACTIFS :

### 1 - Réactif de coloration du cholestérol :

Ajouter lentement 300 ml d'acide acétique glacial à

600 ml d'anhydride acétique. Refroidir à + 4° C et ajouter 100 ml d'acide sulfurique prérefroidi en mélangeant.

Le réactif se conserve à + 4 °C dans une bouteille ambrée.

2 - Isopropanol :

Il doit être exempt d'aldéhydes.

3 - Potasse 0,8 M :

KOH 45 g

$H_2O$ distillée QSP 1000 ml.

4 - Réactif au periodate :

Dans une fiole jaugée de 1 l, 115 ml d'acide acétique glacial sont ajoutés à 500 ml d'eau. Après dissolution de 5,4 g de périodate de sodium, on complète à 1 l avec de l'eau distillée.

5 - Réactif à l'acétylacétone :

A 500 ml d'acétate d'ammonium 2M amené à pH6 avec de l'acide chlorydrique 2N, on ajoute 25 ml d'isopropanol à 99 % et 7,5 ml d'acétylacétone. Après avoir complété à 1 l avec l'acétate d'ammonium 2M de p H6, le réactif est conservé en bouteille ambrée.

Le réactif doit être préparé chaque jour.

6 - Mélange absorbant :

200 g de zéolite sont réduits en poudre et chauffés une nuit à 110° C. Après refroidissement on ajoute 20 g de réactif de Lloyd, 10 g de sulfate de cuivre et 20 g de chaux. Le mélange est assuré par agitation.

7 - Solutions étalons :

Des solutions étalons combinées servant aux dosages simultanés du cholestérol et des triglycérides sont préparées à partir d'une solution mère de cholestérol dans l'isopropanol ( 5 g/l ) et de 5 solutions de trioléine dans l'isopropanol contenant respectivement 50, 100, 150, 200 et 250 mg de trioleine pour 100 ml d'isopropanol, selon le schéma suivant :

| Solutions de Trioleine | Solution mère de Cholestérol | Isopropanol | Concentrations | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Chol (g/l) | T.G (g/l) |
| Solution 1:0,5 ml | 0 | QSP 10 ml | 0 | 0,5 |
| Solution 2:0,5 ml | 0 | QSP 10 ml | 0 | 1 |
| Solution 3:0,5 ml | 0,1 ml | QSP 10 ml | 1 | 1,5 |
| Solution 4:0,5 ml | 0,2 ml | QSP 10 ml | 2 | 2 |
| Solution 5:0,5 ml | 0,4 ml | QSP 10 ml | 4 | 3 |

EXTRACTION :

A l'extrait lipidique on ajoute 10 ml d'isopropanol. Après une agitation de 30 secondes au Vortex, 2 g de mélange absorbant sont ajoutés à l'extrait et le mélange est à nouveau agité 30 secondes. Après un contact de 30 minutes, les tubes sont centrifugés et le surnageant sert au dosage.

DOSAGE :

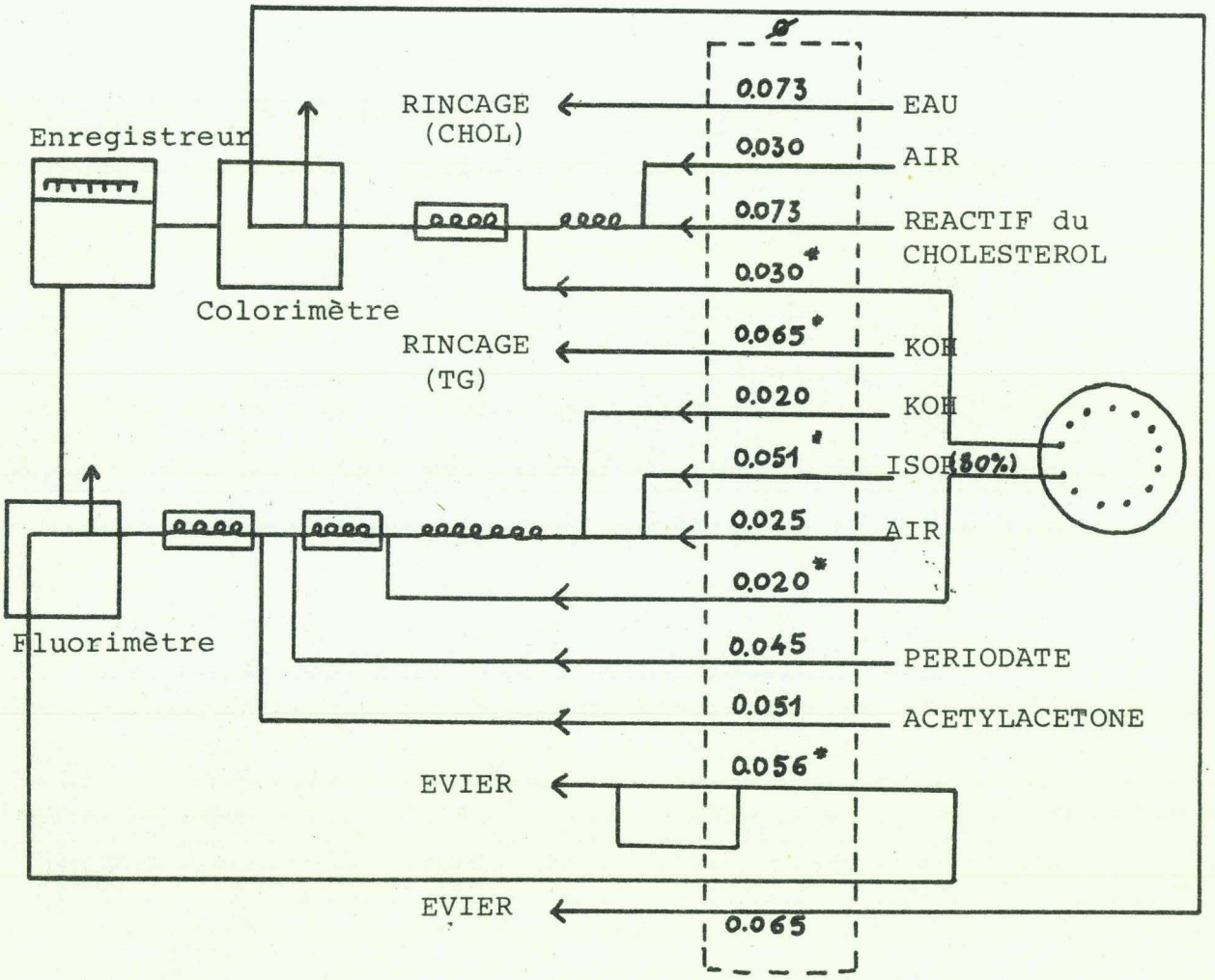
Le schéma du montage est donné à la page suivante.

- Pour le dosage des triglycérides, la ligne de base est établie sur l'eau puis sur les réactifs pour dépister une fluorescence parasite.

- Pour le dosage du cholestérol, la ligne de base est établie sur le réactif avec de l'isopropanol à la place de l'échantillon.

- Dans les deux cas, l'expansion d'échelle est faite sur l'étalon le plus concentré.

* ACIDFLEX




SCHEMA DU MONTAGE POUR LE DOSAGE

SIMULTANE DES TRIGLYCERIDES ET DU CHOLESTEROL

BUS LILLE

# Dosage des Phospholipides.

D'après RAHEYA et Coll.

J. Lipid Res. (1973) 695 14

## A/ PRINCIPE :

Les phospholipides sont dosés sans minéralisation.

## B/ REACTIFS :

1 - Méthanol :

2 - Chloroforme :

3 - Solution chromogène :

. Solution A :

Dissoudre 16 g de molybdate d'ammonium dans 120 ml d'eau.

. Solution B :

Prélever 80 ml de la solution A, ajouter 40 ml d'HCl concentré et 10 ml de mercure.

Agiter pendant 30 mn et filtrer.

. Solution C :

Mélanger 200 ML d'$H_2SO_4$ concentré au reste de la solution A et ajouter le mélange obtenu à la solution B.

. Solution chromogène proprement dit :

Prélever 25 ml de solution C, ajouter 45 ml de méthanol, 5 ml de chloroforme et 20 ml d'eau.

C/ METHODE :

Après fraction sur gel de silice et révélation par l'iode, les fractions phospholipidiques sont grattées et éluées par agitation avec 5 ml de chloroforme, 5 ml de méthanol. Après déphasage par addition de 4,5 ml d'eau, la phase inférieure chloroformique est récupérée et évaporée sous azote.

Le résidu sec est repris par 0,4 ml de chloroforme et 0,1 ml de solution chromogène. Le mélange est porté 85 secondes au bain-marie bouillant et après 10 mn de refroidissement à température ambiante, 5 ml de chloroforme sont ajoutés. Après agitation et repos de 30 mn, la lecture se fait à 710 nm contre un blanc témoin.

Des courbes d'étalonnage relatives aux différentes classes de phospholipides sont établies en utilisant des étalons traités dans les mêmes conditions. La teneur en phospholipides est lue sur la droite obtenue. L'étalonnage doit être effectué chaque fois que l'on prépare une nouvelle solution chromogène.

Il existe une relation linéaire entre la densité optique et la teneur en phosphore pour des valeurs comprises entre 1 et 10 µg de phosphore lipidique.

## Préparations des esters méthyliques d'acides gras

A/ PRINCIPE :

Les différentes classes lipidiques subissent une transestérification à chaud (70° C) en présence de méthanol et d'acide sulfurique.

B/ METHODE :

Après séparation par chromatographie sur couche mince des principales classes de lipides et révélation par une solution alcoolique de Rhodamine 6G, les fractions de Gel correspondantes sont grattées, dispersées dans 3 ml de méthanol et additionnées de 10 gouttes d'acide sulfurique concentré. On porte au thermobloc pendant 2 heures à 70° C.

Après refroidissement, les esters méthyliques d'acides gras sont transvasés dans une ampoule à décanter avec 3 ml d'heptane et 3 ml d'eau distillée. Après agitation et déphasage, la phase supérieure heptanoïque est filtrée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée. Les esters méthyliques sont repris par 50 µl de chloroforme et purifiés sur couche mince de gel de silice G en utilisant le benzène comme solvant de migration. La tache d'esters méthyliques est révélée à la Rhodamine 6G puis grattée et les esters sont élués par 6 ml de chloroforme. Le résidu obtenu par évaporation est repris par du sulfure de carbone en vue de l'injection pour l'analyse en chromatographie gaz-liquide.

# Dosage semi-automatique des acides gras libres plasmatiques

D'après SEZILLE G., FRUCHART J.C, JAILLARD J., DEWAILLY P. et SCHERPEREEL P.

Clin. Chim. Acta (1972) 38 277

## A/ PRINCIPE :

Les acides gras libres du plasma, préalablement extraits par la méthode de TROUT et donc en solution heptanoïque, sont progressivement mélangés, à l'abri du $CO_2$ atmosphérique, à un réactif à base de rouge de phénol, d'heptane et de véronal sodé qui sert de tampon. Les acides gras déplacent l'acide diéthylbarbiturique qui induit le virage au jaune de la solution alcaline de rouge de phénol, la diminution d'intensité de la coloration rouge est mesurée à 560 nm.

## B/ REACTIFS :

### 1 - Solvant d'extraction :

- Isopropanol 4 V
- Heptane pur 1V
- $H_2SO_4$ 1N 0,1V

### 2 - Solution mère de colorant :

- Véronal sodé 2,5 g

- rouge de phénol 1 g
- $H_2O$ distillée Q.S.P. 100 ml

Dissoudre le véronal sodé puis le rouge de phénol dans de l'eau distillée portée à 60 ° C et ajuster à 100 ml dès refroidissement, filtrer sur papier et conserver dans un flacon en verre coloré.

3 - Solution de travail ( à préparer 1 h avant l'emploi ) :

- Solution mère de colorant 0,75 ml
- Ethanol absolu 99 ml
- Heptane pur 200 ml

Verser le mélange dans le flacon en verre coloré qui servira au prélèvement du réactif. Chasser l'air du flacon par un courant d'azote, boucher et laisser reposer 1 h.

4 - Solution mère d'acide palmitique ( 5 m mol/l )

- Acide palmitique pur 128,2 mg
- Heptane pur Q.S.P. 100 ml

5 - Solution de travail d'acide palmitique ( 1600 µmol/l )

- Solution mère 32 ml
- Heptane pur Q.S.P. 100 ml

6 - Gamme étalon :

- Solution de travail : 40 30 20 10 5 ml
- Heptane : 0 10 20 30 35 ml
- Concentrations : 1/6 1/2 0/8 0/4 0/2mol/ml

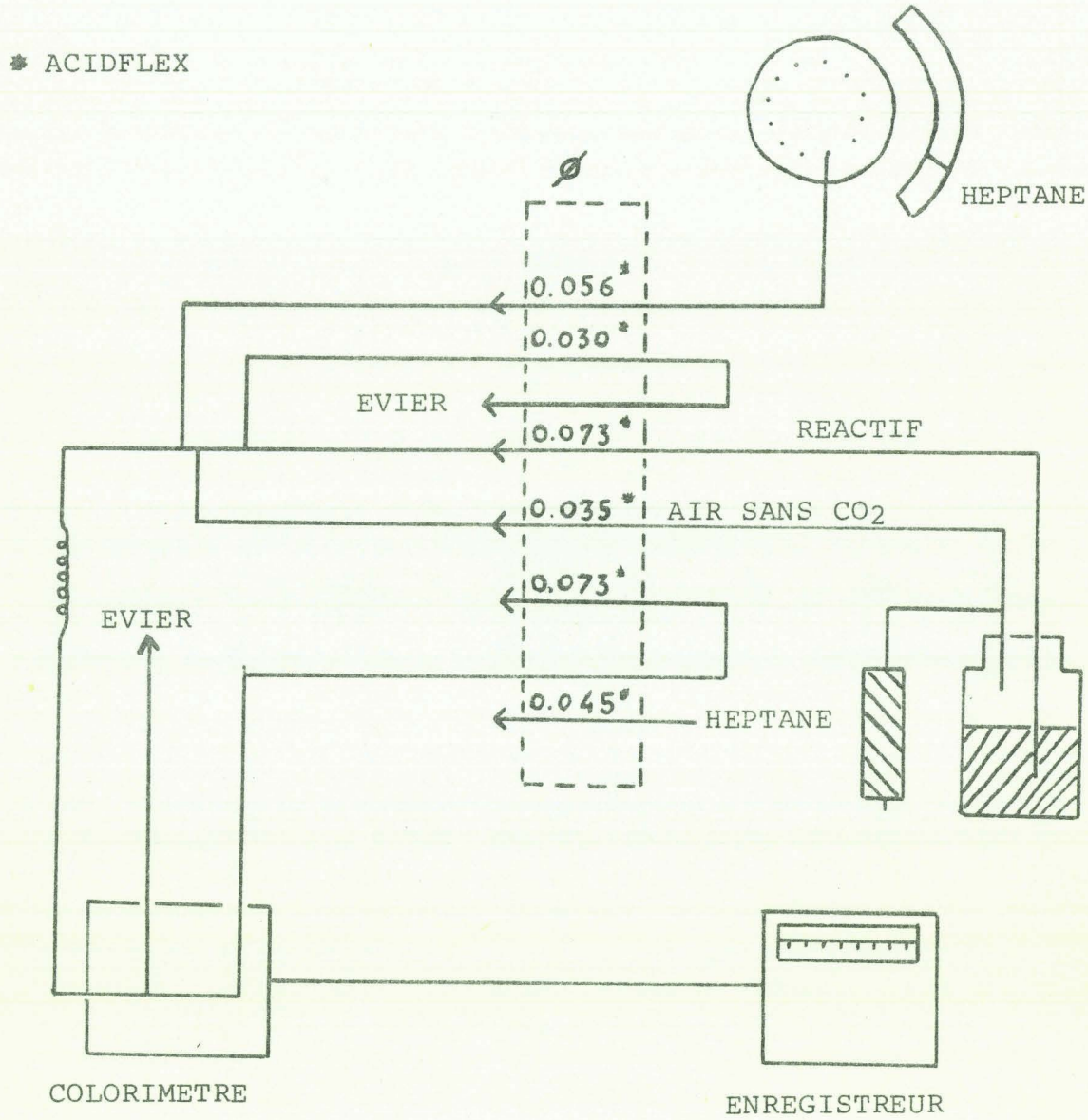
C/ EXTRACTION ET DOSAGE :

Tout en agitant verser 1 ml de plasma dans 5 ml de mélange d'extraction. Après 10 mn de repos, on ajoute 3 ml d'heptane et 2 ml d'$H_2O$. On mélange soigneusement et on effectue pendant quelques secondes un barbotage d'azote destiné à éliminer les acides volatils.

On laisse reposer de façon à obtenir deux phases et on prèlève 3 ml de phase heptanoïque supérieure. Ce prélèvement est agité avec 3 ml d'une dilution aqueuse à 1/2000 (en volume) d'acide sulfurique dans le but d'éliminer les composés acides autres que les acides gras ; après repos, on récupère la phase heptanoïque qui peut être conservée plusieurs jours à + 4° C.

Les différentes dilutions de la gamme étalon sont traitées de la même façon, sur 1 ml, en utilisant le solvant d'extraction correspondant, on omet cependant le barbotage d'azote.

Le schéma du montage pour le dosage est décrit page suivante.




BUS LILLE

SCHEMA DE MONTAGE

POUR LE DOSAGE DES ACIDES GRAS LIBRES

# B I B L I O G R A P H I E

- ACKMAN R.G.

J. Amer. oil Chemist' Soc. (1963) 40 558 - (66)

- AILHAUD G., SARDA L. and DESNUELLE P.

Biochim. Biophys. Acta (1962) 59 261 - (26)

- ALBRINK M. J.

J. Clin. Invest. (1961) 40 536 - ( 35)

- ALLEN P. C. and LEE H.A.

in "A clinical Guide to Intravenous nutrition"

Blackwell Scient. Publications, Oxford and

EEinbourg ( 1969 ) - (8)

- ASADA S.

Acta Sch. Med. Uni. Kioto (1954) 31 171 - (82)

- ASSMANN G., KRAUSS R.M., FREDRICKSON D.S. and LEVY R.I.

Third International Symposium on Artherosclersis

West Berlin October 1973 24-28 - (31)

- BEAL J. M., PAYNE M. A., GILDER H., JOHNSON G. A. and GRAVER W. L.

Metabolism (1957) 6 673 - (10)

- BERG G., ZELLER W., RUGMEIMER E. and ELSTER K.

Arzneimittel Forsch (1965) 15 1472 - (14) (47) (84)

-BLOOM B., CHAIKOFF I. L. and REINHARD W. O.

Amer. J. Physiologie (1951) 166 451 - (27)

- BOBERG J. and CARLSON L. A.

Clin. Chim. Acta (1964) 10 420 - (38)

- BOMYER D.E., LEAT W.M.F, HOWARD A.N. and GRESHAM G.A.

Biochim. Biophys. Acta (1963) 70 423 - (60)

- BOZIAN R. C, DAVIDSON N.W, STUTMAN L.J. and WILKINSON C.F.Jr.

Metabolism (1957) 6 703 - (74)

- BROWN J.L and JOHNSTON J. M.

Biochim. Biophys. Acta (1964) 84 448 - (22)

- CARLSON L.A and HALLBERG D.

Acta Physiol. Scand. (1963) 59 52 - (40)

-CLARK B. and HUBSCHER

Biochim. Biophys. Acta (1961) 46 479 - (21)

- CLEMENT G., CLEMENT J., COUREL E., KLEPPING J. et BRIET S.

Compt. Rend. Soc. Chim. Biol. (1962) 255 2004 - (28)

- COHN I. Jr., ATIK M., HARTWIG Q.L., COTLAR A.M., MORELAND J. and WERNER J.C.

J. Lab. Clin. Med.(1960) 55 917 -(50) (79)

- COLLINS H. S., KRAFT L. M., Kinney T. D., DAVIDSON C. S., YOUNG J. and STARE F. J.

J. Lab. Clin. Med (1948) 33 143 - (72)

- COURTEN W.

Phil. Trans. R. Soc. (1712) 27 485 - (1) (34)

- ECKART J., SCHREIBER U., HARING R. and ROGOSZ S.

in "Parenteral Nutrition" Springfield Thomas U.S.A. (1970) p. 440 - (54)

-EDGREN B.

Acta Pharmacol. Toxicol (1960) 16 260 - (80)

- EDGREN B.

Acta Physiol. Scand. (1970) 48 390 - (75)

- ELSTER K.

Med. Ernachr (1963) 4 61 - (78)

- ELSTER K.

in "Parentéral Nutrition" Springfield Thomas U.S.A. (1970) p. 434 - (76)(81)(83)

- ENTRESSANGLES B., PASEROL L., SAVARY P., SARDAL L. et DESNUELLE P.

Bull. Soc. Chim. Biol. (1961) 43 581 - (24)

- ENTRESSANGLES B., SAVARY P., CONSTANTIN M. J. et DESNUELLE P.
Biochim. Biophys. Acta (1964) 84 140 - (25)

- FOLCH J., LEES M. and SLOANE-STANLEY G.M.
J. Biol. Chem. (1957) 226 497 - (58)

- FRAZER A.C. and STEWART H. C.
J. Physiol. (1937) 90 18 - (46)

-FRIEDMAN M. and BYERS S.O.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (1955) 90 496 - (70)

- FRIEDMAN M. and BYERS S.O.
Amer. J. Physiol. (1956) 186 13 - ( 71)

- HAKANSSON J.
Nutr. Dieta.(1965) 7 90 - (69)

- HAKANSSON J., HOLM I. and WRETLIND A.
Nutr. Dicta. (1965) 7 241 - (12)

- HALBERG D. and WERSALL J.
Acta Chir. Scand. (Scypl) (1964) 325 25 - (36)

- HALLBERG D.
Acta Physiol. Scand. (1965) 65 254 - (39)

- HALLBERG D.
Acta. Physiol. Scand. (1965) 65 279 - (89)

- HARTWIG Q.L., COTLAR A.M., SHELBY J.S., ATIK M. and COHN I. Jr.
Surgery (1961) 49 308 -(51)

- HODDER E.
Practitioner (1873) 10 14 -(2)

- HOFMANN A.F. and BERGSTROM B.
Fed. Proc. (1962) 21 43 -(18)

- JAPPE R. and BERMAN S.L.
Arch. Patholo (1928) 5 1020 -(5)

- JAILLARD J., SEZILLE G., FRUCHART J.C., DEWAILLY P., SCHERPEREEL P. et RAULT C.
Nutr. and Metab. (1973) 15 232 -(88)

- JOHNSTON J.M. and BERGSTROM B.
Acta Chem. Scand. (1963) 17 905 -(19)

- KERN F. Jr., JACKSON R.G., MARTIN T.E. and MUELLER J.F.
Metabolism (1957) 6 743 -(56)(68)

- KESSLER J. I.
J. Clin. Invest. (1963) 42 362 -(43)

- KING N. W., JONES L.D., SASAKI M. and SCHAFFNER F.
Amer. J. Clin. Nutr. (1965) 16 88 -(77)

- KOVATS E.
Z.Anal. Chem. (1961) 181 351 -(67)

- LAROSA J. C., LEVY R.I., WINDMUELLER M. G. and FREDRICKSON D.S.
J. Lipid. Res. (1972) 13 356 - (33)

- LARSEN V. and BROCKNER J.
Acta Chir. Scand. (suppl.) (1965) 343 191 - (49)

- LEE H.A., SHARPSTONE P. and AMES A.C.
Prostgad. Med. J. (1967) 43 81 - (55)

- LEON L.P., RUSH R.L. and TURREL J.
Advances in automated analyses Technicon
International Congress (1970) - (59)

- LEUBE W.
Nutr. Dicta. (1895) 5 295 - (3)

- LEVEEN H.H., GIORDANO P.R. and SPLETZER J.
J. Arch. Surg. (1961) 83 311 - (44)

- LEVENSON S.M.
Amer. J. Surg. (1962) 103 330 - (48)

- MALINS D.C. and MANGOLD M. K.
J. Amer. oil Chemists' Soc. (1960) 37 576 - (61)

- MATTSON F.M. et BECK L.W.
J. Biol. Chem. (1956) 219 755 - (17)

- MEYER C.E., FANCHER J.A., SCHURR P.E. and WEBSTER H.D.
Metabolism (1957) 6 591 - (73)

- MILLER L.L., BARTOSEK I. and GUAITANI A.
in Isolated Liver Perfusion and its Applications.
Raven Press New - York (1973) - (15)(86)

- NESTEL P.J.
J. Clin. Invest. (1964) 43 943 - (29)

- OLIVE CRONA T. and BELFRAGE P.
Biochim. Biophys. Acta (1965) 98 81 - (30)

- RAHEJA R., KAUR C., SINGH A. and BHATIA S.
J. Lipid. Res. (1973) 14 695 - (65)

- REID D.J.
Br. J. Surg. (1967) 54 198 - (11)

- ROA G.A., JOHNSON J. M.
Biochim. Biophys. Acta (1966) 125 465 - (20)

- ROUSER G., KRITCHEVSKY G., SIMON G. and YAMAMOTO A.
in "Lipid. chromatographie Analyses"
edited Marinetti G.V. London (1967) vol. 1p99 - (62)(63)

- SAVARY P. et DESNUELLE P.
Biochim. Biophys. Acta (1956) 21 349 - (16)

- SAXL P. and DONATH F.
Wien. Arch. In. Med. (1926) 13 7 - (4)

- SCHERPEREEL P., NOUVELOT A. et DEWAILLY P.
Communication présentée au Congrès International de Nutrition Parentérale de Montpellier (Septembre 1974) -(85)

- SHOEFL G.I.
Proc. R. Soc. Sa. Biol. (1968) 169 147 -(37)

- SCHOLLER K.L.
Z. Prakt. Anoïsth. Wiederbal (1968) 3 193 -(32)

- SINGLETON W.S., BENERITO R.R., TALLUTO K.F., BROWN M.L., DITRAPANI L.L. and WHITE J.L.
Metabolism (1960) 9 956 -(53)

- THOMPSON S.W., JONES L.D., FERREL J.F., HUNT R.D., MENG H.C., KUYAMA T., SASAKI H., SCHAFFNER F., SINGLETON W.S. and COHN J.
Amer. J. Clin. Nutr. (1965) 16 43 -(13)(52)

- TIDWELL H.C. and JOHNSTON J.M.
Arch. Biochim. Biophy. (1960) 89 79 -(23)

- WADDELL W.R., GEYER R.P., CLARK Ead. , STARE F.J.
Amer. J. Physiol. (1954) 177 90 -(45)

- WAGNER H., HORMAMMER L. and WOLFF P.
Biochim. Z. (1961) 334 175 -(64)

- WAREMBOURG H., BIZERTE G., JAILLARD J.,BERTRAND M. et SEZILLE G.
C.R. Soc. Biol. (1966) 160 1234 -(41)(42)
(87)

- WILKINSON A.W.

in "Parenteral Nutrition"

Churchill Livingstone, Edinbourgh and London (1972) - (9)

- WRETLIND A.

Amtracts of the first world fat Congress Hambourg p254 - (7)
(57)

- YAMAKA S. and NOMURA T.

Jikken Iho (1928) 14 523 - (6)

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE