

BBA 75875

## VITESSE DES PROCESSUS DE RENOUVELLEMENT DU CHOLESTÉROL CONTENU DANS SON ESPACE DE TRANSFERT, CHEZ LE RAT

### III. MODIFICATIONS ET ÉTUDE CRITIQUE DE LA MÉTHODE D'ÉQUILIBRE ISOTOPIQUE

CLAUDE LUTTON ET FRANÇOIS CHEVALLIER

*Laboratoire de Physiologie de la Nutrition, Université de Paris-Sud, 91-Centre d'Orsay (France)*

(Réçu le 7 octobre, 1971)

---

#### SUMMARY

Since the isotopic equilibrium method as applied to rat cholesterol was described, some practical modifications have been made which are reported here. Sometimes the use of a subcutaneous implantation of capsules containing tritiated cholesterol leads to an over-estimate of the rate of fecal cholesterol excretion. For the questionable cases, it is necessary to use the initial method of daily subcutaneous injections of radioactive cholesterol.

In another connection, 17 experiments using the isotopic equilibrium method have shown great variability of the weekly radioactive balance. The radioactivity of cholesterol and its transformation products released from the organism of the rat and that of absorbed cholesterol are rarely equal as would be expected. To define the origins of these losses an experiment using the isotopic equilibrium method was carried out on rats which were killed after 4, 8 or 12 weeks.

Bacterial degradation cannot explain the deficit in the weekly radioactive balances, for the total radioactive balance which includes the radioactive cholesterol of the rat is always nil. In fact, these deficits can be explained on the basis that isotopic equilibrium is not really obtained or that the organism is not in a steady state but in an expansion state. In both cases the application of suitable relations permits the calculation of all the rates involved in the dynamics of cholesterol with certainty. But for an organism in an expansion state it is necessary to know the rate of cholesterol increase. After these corrections have been made, the percentage of error on each rate is defined.

In the particular case of this critical experiment, animals were fed with a basal diet to which, 0.2 % taurocholate was added. Although this results in an expansion state, the rates of synthesis, excretion and absorption are constant. The increase of mobile cholesterol in the organism is associated with a decrease of its transformation to bile acids.

---

#### INTRODUCTION

La méthode d'équilibre isotopique appliquée au cholestérol de rats adultes considérés en état stationnaire est particulièrement fructueuse<sup>1</sup>. Elle permet de

préciser dans l'élimination fécale quotidienne de stérols ( $m_F$ ) la non-absorption du cholestérol alimentaire ingéré ( $m_{NA}$ ), l'excrétion de cholestérol d'origine plasmatische ( $m_E$ ) et la sécrétion externe de stérols ( $m_{SE}$ ), c'est-à-dire des stérols synthétisés par l'appareil digestif et ses annexes, et directement déversés dans sa lumière, puis éliminés. Seule une fraction de ces stérols correspond à du cholestérol. L'application de la méthode d'équilibre isotopique permet, de plus, de calculer les vitesses de tous les processus qui assurent le renouvellement des molécules mobiles du cholestérol d'un organisme, c'est-à-dire celles qui sont incluses dans son espace de transfert. Les processus d'apparition du cholestérol sont l'absorption intestinale ( $m_A$ ) et la sécrétion interne ( $m_{SI}$ ) ou déversement dans le plasma de molécules synthétisées dans les organes. Les processus de disparition du cholestérol sont l'excrétion ( $m_E$ ) urinaire et fécale, et la transformation en acides biliaires ( $m_T$ ). En état stationnaire, on a :

$$m_F = m_{NA} + m_E + m_{SE} \quad (1)$$

$$m_A + m_{SI} = m_E + m_T \quad (2)$$

Les valeurs des vitesses des processus énumérés ci-dessus, exprimées en mg par jour, ont été définies dans un premier temps chez des rats adultes ingérant un régime semi-synthétique, puis avec des rats adultes ingérant ce même régime, mais de concentration croissante en cholestérol<sup>1,2</sup>. Depuis la publication de ces mémoires, quelques modifications pratiques ont été apportées à la méthode originelle. On les résumera dans cette introduction.

Telle que la méthode a été décrite, elle nécessite d'utiliser deux groupes de rats, l'un recevant quotidiennement du cholestérol marqué par voie sous-cutanée, l'autre par l'alimentation. Sur ce plan, deux modifications ont été apportées. D'une part, la pose d'un implant sous-cutané de cholestérol cristallisé, comme le pratique WILSON<sup>3</sup>, supprime l'obligation de faire des injections quotidiennes. D'autre part, l'emploi de [<sup>3</sup>H]cholestérol dans les implants et de [4-<sup>14</sup>C]cholestérol dans l'alimentation permet d'utiliser un seul groupe d'animaux. Par ailleurs, la première application de la méthode concernait des rats mâles adultes ingérant un régime semi-synthétique de composition connue. Sa concentration en stérols est de 0.015 %. Parmi eux, le cholestérol est le plus abondant (0.013 %). Les autres stérols sont, avant tout, d'origine végétale<sup>1</sup>. Leur proportion, comme la concentration totale en stérols du régime, étant sujette à des variations saisonnières, on a préféré porter à 0.05 % la concentration en cholestérol du régime quelle qu'en soit, du reste, sa composition. Cette modification est sans conséquence sur la vitesse de sécrétion interne du cholestérol. Une étude antérieure a, en effet, montré la constance de cette vitesse chez des animaux ingérant des régimes contenant 0.014, 0.1 et 0.5 % de cholestérol<sup>2</sup>. Enfin, l'application en routine de la méthode nous a fait adopter les règles suivantes. L'expérience de mise en équilibre débute lorsque les rats ont ingéré leur régime (non marqué) pendant un mois et demi à deux mois. L'expérience proprement dite dure 8 semaines. Les urines et les fèces ne sont recueillies qu'au cours des quatre dernières semaines. Chaque expérience comporte au minimum 4 rats. On a également pris l'habitude de calculer la masse de cholestérol transformé en acides biliaires dans le contexte des deux équilibres isotopiques réalisés en [4-<sup>14</sup>C]cholestérol et en [<sup>3</sup>H]cholestérol.

Depuis la publication de la méthode, on a entrepris l'étude de l'influence de divers facteurs sur le renouvellement du cholestérol. 17 expériences ont été réalisées.

Leurs résultats seront publiés dans plusieurs mémoires. Au vu de l'ensemble des résultats, quelques problèmes se sont posés. Ceux-ci nous ont conduits à entreprendre une analyse critique de la méthode, étayée par une expérimentation spécialement conçue dans ce but.

### (I) EQUILIBRE ISOTOPIQUE PAR VOIE PARENTERALE

Deux problèmes concernant cet équilibre sont apparus après avoir systématiquement substitué la technique de l'implant à celle des injections sous-cutanées quotidiennes.

#### *Validité de la mesure de l'excrétion fécale*

Rappelons que, chez les rats témoins, on obtient les mêmes valeurs d'excrétion fécale de cholestérol avec les deux techniques: 3 mg par jour soit 30 ou 32 % des stérols fécaux<sup>1</sup>. Pour 16 des 17 nouvelles expériences, toutes effectuées avec des implants, cette proportion se situe entre 31 et 47 %. Dans un cas (Expérience 14), elle atteint 89 % (Tableau I). Ce dernier résultat, en particulier, a-t-il une réelle valeur physiologique ou s'explique-t-il pour une raison contingente en relation avec l'utilisation des implants?

TABLEAU I

PROPORTIONS DU CHOLESTÉROL D'EXCRÉTION DANS LES STÉROLIS FÉCAUX AU COURS DE L'ÉQUILIBRE ISOTOPIQUE PAR VOIE PARENTERALE APRÈS POSE D'UN IMPLANT DE [<sup>3</sup>H]CHOLESTÉROL CHEZ DES RATS SOUMIS À 17 CONDITIONS EXPÉRIMENTALES DIFFÉRENTES

Bilan radioactif hebdomadaire, exprimé en pourcentage, au cours d'équilibres isotopiques par voie orale réalisés avec du [4-<sup>14</sup>C]cholestérol simultanément aux précédents. Variations pondérales des rats au cours de l'expérience. Contrôle des proportions du cholestérol d'excrétion dans les stérols fécaux au cours d'équilibre isotopique par voie parentérale après injection sous-cutanée quotidienne de [4-<sup>14</sup>C]cholestérol. (Durée de l'expérience témoin: 13 semaines, durée de chacune des 17 expériences: 8 semaines).

Expérience	Excrétion fécale (%)		Bilan radioactif hebdomadaire (%)	Poids moyen des rats (g)		
	Implant ( <sup>3</sup> H)cholestérol	Injections (4- <sup>14</sup> C)cholestérol		Début	Fin	Δ
Témoin	32	30	- 9	317	357	+ 40
1	38		- 30	599	560	- 39
2	41		- 29	338	331	- 7
3	39		- 18	311	330	+ 19
4	35		- 22	280	303	+ 23
5	38		- 12	289	339	+ 50
6	47		+ 5	328	280	- 48
7	35		- 22	280	272	- 8
8	34		- 12	443	441	- 2
9	33	24	- 29	397	428	+ 28
10		38	- 20	369	358	- 11
11		35	- 11	408	406	- 2
12	36	32	- 20	408	402	- 6
13	37	34	- 13	480	522	+ 42
14	89	42	- 20	325	369	+ 44
15	36		- 31	406	427	+ 21
16	43		- 29	380	425	+ 45
17	38		- 11	404	425	+ 21

Des rats sont soumis à des conditions identiques à celles des Expériences 9, 12, 13 et 14 mais reçoivent une injection sous-cutanée quotidienne de [<sup>14</sup>C]cholestérol au lieu d'un implant. Les animaux sont sacrifiés après 8 semaines d'expérience. Le dosage et la mesure de la radioactivité spécifique du cholestérol sanguin sont effectués comme précédemment<sup>4</sup>. Les nouvelles proportions de cholestérol excrété par rapport aux stérols totaux sont pratiquement inchangées pour les Expériences 12 et 13. Pour l'Expérience 9, le pourcentage passe de 33 à 24 (Tableau I). Il y a donc une assez bonne concordance entre les résultats acquis par les deux méthodes dans ces trois cas. Par contre, pour l'Expérience 14, la radioactivité spécifique des stérols fécaux atteint 42 % de celle du cholestérol plasmatique au lieu de 89 % (l'élimination fécale des stérols est la même dans les deux cas: 21.1 et 22.7 mg par jour). Ainsi, dans ce cas particulier, la technique de l'implant conduit manifestement à surestimer l'excration fécale du cholestérol.

La vérification complémentaire suivante en fournit une autre preuve. Chez les rats témoins, les radioactivités spécifiques du cholestérol et du coprostanol sont identiques et égales à la moitié environ de celles du cholestérol sanguin<sup>1</sup>. On a donc isolé des fèces d'un des rats de l'Expérience 14 (Rat A du Tableau II) ces deux stérols par chromatographie préparative en phase gazeuse<sup>1</sup>. On constate que la radioactivité spécifique du coprostanol est égale à 51 % de celle du cholestérol sanguin alors que celle du cholestérol fécal lui est 2.5 fois supérieure. Le cholestérol fécal est donc contaminé par du cholestérol fortement radioactif et la contamination est extradigestive puisque la radioactivité spécifique du coprostanol n'est pas affectée. Il est probable qu'au cours de ses fréquents grattages, le rat répand sur ses excréments des débris cellulaires ou des résidus des sécrétions cutanées et que ceux-ci, provenant de la zone où est déposé l'implant, contiennent du cholestérol de radioactivité spécifique élevée. Si l'on frotte la peau dans la zone de l'implant avec un coton imbibé d'éther, celui-ci entraîne une radioactivité non négligeable. Enfin, les raisons pour lesquelles cette contamination prend occasionnellement une réelle importance sont à relier à la richesse en graisse du régime. En effet, l'alimentation des rats de l'Expérience 14 contient 64 % de saindoux. Or le même problème se trouve posé avec des rats ingérant un régime en contenant 50 (Rat B) ou 35 % (Rats C et D du Tableau II) et non avec un régime n'en contenant que 20 % (Expériences 12 et 13, Tableau I).

TABLEAU II

RADIOACTIVITÉS SPÉCIFIQUES APRÈS LA POSE D'UN IMPLANT DE [<sup>3</sup>H]CHOLESTÉROL

Radioactivités spécifiques du cholestérol sanguin, des stérols précipités par la digitonine, du cholestérol et du coprostanol des fèces de rats collectés entre la 4ème et la 8ème semaine après la pose d'un implant sous-cutané de [<sup>3</sup>H]cholestérol cristallisé (20 mg, 4 µCi/mg) chez 4 rats. Les conditions expérimentales propres à chaque rat sont précisées dans le texte.

		<i>Radioactivité spécifique (désint./min par mg)</i>			
		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>
Sang	cholestérol	100 229	36 510	38 058	45 401
Fèces	stérols	105 591	39 908	37 120	40 795
	cholestérol	242 569	183 877	251 110	—
	coprostanol	51 687	13 209	11 720	16 170

Pour WILSON<sup>3</sup> qui n'a jamais employé que des implants, les stérols fécaux sont des produits d'excration. A l'équilibre isotopique, dans ses conditions expérimentales, la radioactivité spécifique des stérols fécaux est pratiquement égale à celle du cholestérol plasmatique. La similitude entre les résultats de WILSON<sup>3</sup> et ceux de l'Expérience 14 suggère que les valeurs élevées de l'excration fécale de cholestérol obtenues par cet auteur s'expliquent par des raisons semblables à celles exposées précédemment. Mais, de plus, WILSON utilise des implants contenant une plus grande quantité de cholestérol (75-125 mg) que les nôtres (15-25 mg). Cette richesse en cholestérol ne peut qu'accentuer les phénomènes invoqués. Afin de vérifier cette hypothèse, deux rats témoins reçoivent un implant sous-cutané contenant 100 mg de [<sup>3</sup>H]cholestérol cristallisé de radioactivité spécifique 60 000 désint./min par mg. Après deux mois d'expérience, la radioactivité spécifique des stérols fécaux précipitables par la digitonine de chacun des rats représente respectivement 53 et 40 % de la radioactivité spécifique de leur cholestérol sanguin. Si ces pourcentages sont inférieurs à ceux de WILSON, ils sont néanmoins plus grands que ceux de l'expérience initiale témoin (Tableau I) dans laquelle l'implant contient 15 mg de cholestérol.

En conclusion, la méthode la plus sûre pour déterminer les quantités de cholestérol excréte à l'équilibre isotopique consiste à introduire le cholestérol marqué par injection sous-cutanée. Si l'on utilise un implant, les résultats paraissent peu ou prou erronés par excès. Les conséquences d'une telle erreur sur les calculs des vitesses des autres paramètres sera envisagée dans la deuxième partie de ce travail. En pratique, nous avons pris pour règle de vérifier par la méthode d'injection le résultat

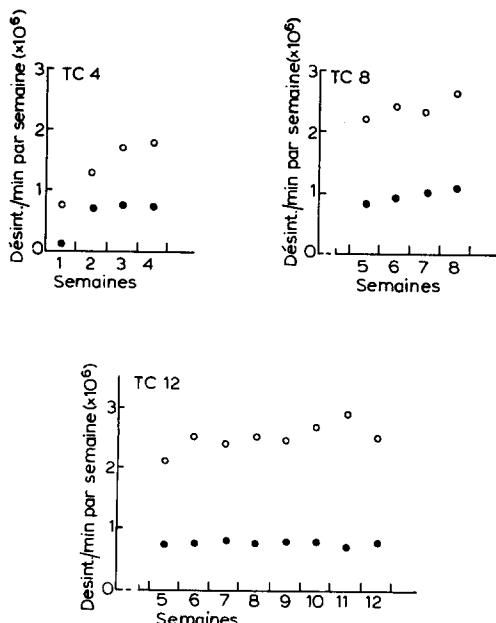


Fig. 1. Radioactivités moyennes éliminées chaque semaine (désint./min par semaine) dans les fractions saponifiable (○) et insaponifiable (●) des excréments de rats sacrifiés après 4 semaines (Lot TC 4), 8 semaines (Lot TC 8) ou 12 semaines (Lot TC 12) après la pose d'un implant de [<sup>3</sup>H]cholestérol.

TABLEAU III

## RADIOACTIVITÉS SPÉCIFIQUES DES STÉROLS FÉCAUX

Radioactivités spécifiques des stérols fécaux précipitables par la digitonine en cours d'expérience d'équilibre isotopique par voie parentérale après pose d'un implant de [<sup>3</sup>H]cholestérol chez des rats sacrifiés après 4 semaines (Lot TC 4), 8 semaines (Lot TC 8) ou 12 semaines d'expérience (Lot TC 12).

Numéro de la semaine	Radioactivité spécifique (désint./min par mg) Lot expérimental	TC 4						TC 8						TC 12					
		Numéro du rat: 1 2 3			5 6 7			8 9 10			11 12			11 12			11 12		
		1	4 393	231 387	1 066	481 463	107 748	31 580	8 025	21 785	11 198	10 296	5 698	8 193	8 996	5 893	11 422	11 010	
2		16 909	22 198	11 672	18 737	14 731	12 914	15 727	15 085	19 684	11 746	23 292	14 971	11 355	13 358	17 320			
3		19 091							16 183	21 756	14 111	21 283	15 332	12 660	15 421	21 107			
4									15 930	22 746	15 334	23 540	18 027	13 799	14 655	20 683			
5									17 059	19 856	13 333	23 182	20 603	16 284	16 961	23 917			
6													21 160	17 313	16 910	25 109			
7													22 104	17 654	16 196	21 961			
8													23 183	17 589	16 113	19 144			
9													21 216	15 317	23 629				
10																			
11																			
12																			

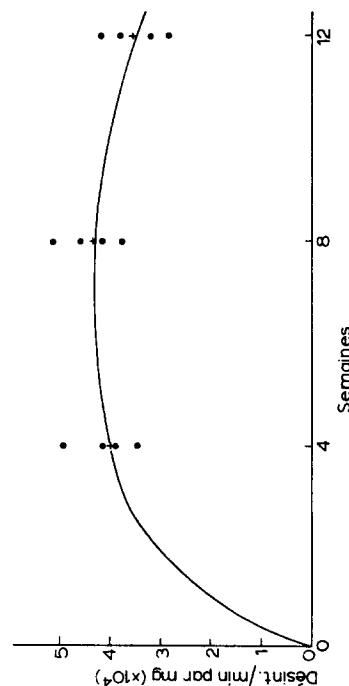


Fig. 2. Radioactivités spécifiques du [<sup>3</sup>H]cholestérol plasmatique (désint./min par mg) des rats sacrifiés après 4 semaines (TC 4), 8 semaines (TC 8) et 12 semaines (TC 12) après la pose d'un implant de [<sup>3</sup>H]cholestérol (+, valeur moyenne).

fourni par la méthode de l'implant toutes les fois que le rapport cholestérol excrétré sur stérols totaux dépasse 50 %.

#### *Validité de l'équilibre isotopique*

L'équilibre isotopique par voie parentérale dépend de la vitesse de diffusion du cholestérol de l'implant qui peut varier comme l'attestent les deux observations rapportées ci-dessous. Celles-ci sont tirées d'une étude dont les conditions expérimentales sont détaillées dans la deuxième partie de ce travail. Seuls les résultats obtenus dans le contexte de l'équilibre isotopique réalisé par voie parentérale sont consignés ici. Les radioactivités spécifiques des [<sup>3</sup>H]stérols fécaux sont portées dans le Tableau III, les radioactivités éliminées dans les fractions insaponifiables et saponifiables des excréments au cours de l'expérience ainsi que les radioactivités spécifiques du cholestérol sanguin au sacrifice le sont sur les Figs. 1 et 2.

(1) Au début de l'expérience isotopique, on observe parfois une augmentation temporaire particulièrement élevée de la radioactivité spécifique des stérols fécaux (1<sup>ère</sup> semaine des Rats 2 et 4, 2<sup>ème</sup> semaine du Rat 1, Tableau III). Ces augmentations brutales de radioactivité spécifique qui sont toujours observées en début d'expérience, ne sont pas prises en considération.

(2) En cours d'expérience, on peut observer, dans certains cas, une augmentation ou une diminution continue de la radioactivité des stérols fécaux ou celle de la fraction acide des excréments, le décrément pouvant atteindre 10-20 % par semaine (5, 6, 7 et 8<sup>ème</sup> semaines des Rats TC 8, Tableau III). Si la quantité de stérols éliminés est effectivement constante, ces variations sont en relation avec une évolution continue de la radioactivité spécifique du cholestérol plasmatique, comme en témoigne la courbe de la Fig. 2.

Pour le calcul de la vitesse d'excration ou de transformation, on utilise la valeur moyenne des radioactivités ( $\bar{R}$ ) correspondant aux quatre dernières semaines de collection (exception faite pour le groupe TC 4, où l'on ne considère que les deux dernières semaines) et la radioactivité spécifique du cholestérol plasmatique au moment du sacrifice ( $r_p$ )<sup>1</sup>. Suivant le sens des variations observées, ce calcul est erroné par excès ou par défaut. Pour minimiser cette erreur, deux autres modes de calcul peuvent être appliqués. On peut, tout d'abord, diviser les radioactivités moyennes ( $\bar{R}$ ) par une valeur moyenne de la radioactivité spécifique du cholestérol plasmatique entre le temps  $t_1$  au début de la collection et le temps  $t_2$  au sacrifice de l'animal ( $r_p^{1-2}$ )<sup>3,5</sup>. On peut aussi ne considérer que les radioactivités de la dernière semaine de collection des fèces ( $R$ ) et les diviser par la radioactivité spécifique du cholestérol au sacrifice de l'animal ( $r_p$ ). Les résultats de ces divers calculs sont reportés dans le Tableau IV. Le plus grand écart observé (excration des Rats TC 12) ne représente qu'une variation relative de 15 %. Il est donc clair, que dans ces expériences d'équilibre isotopique, par voie parentérale, l'erreur relative faite sur la masse de cholestérol excrétré et transformé en acides biliaires est faible. Elle est, en moyenne, inférieure à 10 %. Les valeurs utilisées par la suite sont les moyennes des deux valeurs tenant compte des corrections proposées.

#### (II) EQUILIBRE ISOTOPIQUE PAR VOIE ORALE

Le problème soulevé par les expériences d'équilibre isotopique par voie orale est, en fait, celui des validités de l'état stationnaire et de l'équilibre isotopique. Il

TABLEAU IV

## EXCRÉTION ET TRANSFORMATION DU CHOLESTÉROL

Valeurs des vitesses de l'excrétion fécale de cholestérol et de sa transformation en acides biliaires au cours d'équilibres isotopiques par voie parentérale après pose d'un implant de [<sup>3</sup>H]cholestérol et valeurs de cette même vitesse de transformation au cours d'équilibres isotopiques par voie orale réalisés avec du [<sub>4</sub><sup>14</sup>C]cholestérol chez des rats sacrifiés après 4, 8 et 12 semaines après le début de l'expérience.  $\bar{R}$ , radioactivité moyenne des 4 dernières semaines de collection des fèces;  $R$ , radioactivité de la dernière semaine de collection des fèces;  $r_p^{1-2}$ , radioactivité spécifique moyenne du cholestérol plasmatique entre le début de la collection des fèces et le sacrifice de l'animal;  $r_p$ , radioactivité spécifique moyenne du cholestérol plasmatique au sacrifice de l'animal;  $M$ , moyenne des valeurs avec astérisque.

Type du calcul	Vitesse (mg par jour)			
	Lot expérimental			
	TC 4	TC 8	TC 12	
Excrétion ( <sup>3</sup> H)	$\bar{R}:r_p$	2.4	3.1	3.1
	$\bar{R}:r_p^{1-2}*$	2.7	3.2	3.3
	$\bar{R}:r_p^*$	2.4	3.5	2.8
	$M$	2.5	3.3	3.1
Transformation ( <sup>3</sup> H)	$\bar{R}:r_p$	10.6	16.3	20.6
	$\bar{R}:r_p^{1-2}*$	14.1	16.7	19.1
	$\bar{R}:r_p^*$	12.9	17.8	20.2
	$M$	13.5	17.2	19.6
Transformation ( <sup>14</sup> C)	$\bar{R}:r_p$	10.5	13.5	17.5
	$\bar{R}:r_p^{1-2}*$	12.4	15.0	18.9
	$\bar{R}:r_p^*$	11.6	15.5	18.9
	$M$	12.0	15.25	18.9

est indépendant des modifications apportées à la méthode. On rappellera que les bilans radioactifs globaux des expériences effectuées sur les rats témoins sont quasi nuls<sup>1,2</sup>. En d'autres termes, il y a égalité, d'une part, entre la somme des radioactivités des stérols et acides biliaires, éliminés par l'animal et contenus dans l'animal entier, et d'autre part, la radioactivité du cholestérol ingéré par le rat durant toute l'expérience. Par ailleurs, le bilan radioactif hebdomadaire est défini en comparant la radioactivité des stérols et acides biliaires éliminés (excrétion plus transformation) par semaine à la radioactivité du cholestérol absorbé par le rat durant la même semaine. A l'équilibre isotopique, ce bilan devrait être nul. Or, en fin d'expérience, chez les rats témoins, celui-ci est en défaut de 9 %<sup>1</sup>. Diverses raisons physiologiques (accroissement du poids des animaux en cours d'expérience, accroissement de l'espace de transfert, vitesses lentes de transfert) ont été invoquées pour expliquer ce résultat. Dans les nouvelles expériences le déficit du bilan radioactif hebdomadaire s'est, en moyenne, accru et atteint jusqu'à 31 % (Tableau I). Si l'on considère le poids moyen des animaux au début et à la fin de l'expérience, on constate qu'il n'y a aucune corrélation entre leur variation pondérale et l'importance du déficit. Ainsi, l'une des raisons mises en avant à propos des rats témoins n'a pas la portée pratique qu'on lui attribuait. En conséquence, le problème posé est double: déterminer les causes du déficit et préciser les erreurs que ses variations peuvent entraîner sur le calcul des vitesses de renouvellement du cholestérol.

### *Protocole expérimental*

On a entrepris une expérience isotopique de longue durée (12 semaines) dans des conditions pour lesquelles on avait précédemment obtenu le plus faible bilan radioactif hebdomadaire entre les 5ème et 8ème semaines d'équilibre isotopique ( $-31\%$ , Expérience 15 du Tableau I). 12 rats mâles, adultes, de souche Wistar, pesant environ 385 g reçoivent une alimentation semi-synthétique identique à celle décrite précédemment<sup>1</sup> mais contenant 0.047 % de cholestérol et, en supplément, 0.2 % de taurocholate de sodium (DIFCO Lab. Detroit). Après 8 semaines de régime, le cholestérol alimentaire est marqué par du [ $4^{14}\text{C}$ ]cholestérol ( $0.7 \mu\text{Ci/kg}$  de régime) et chaque animal reçoit un implant sous-cutané de [ $^3\text{H}$ ]cholestérol cristallisé (20 mg,  $4 \mu\text{Ci/mg}$ ). Les animaux sont sacrifiés par lot de 4 rats après 4 semaines (Lot TC 4), 8 semaines (Lot TC 8) ou 12 semaines d'expérience isotopique (Lot TC 12). Les autres modalités expérimentales et les techniques utilisées restent inchangées<sup>1</sup>.

### RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### *Etat stationnaire des animaux*

Les prises de nourriture des Rats TC 4, TC 8 et TC 12 sont, en moyenne, respectivement de 16.3, 17.8 et 18.4 g par jour (Tableau V). On note une prise de poids des animaux en cours d'expérience (1 % par semaine) et du foie: 21.2 (TC 4), 24.4 (TC 8) et 26.1 g (TC 12). La concentration en cholestérol libre est, en moyenne, 2.20 mg/g. Celle du cholestérol estérifié dépasse en général 14 mg/g et croît pendant la première partie de l'expérience. La concentration en cholestérol total du plasma marque aussi une progression: 0.66, 1.18 et 1.53 mg/ml, respectivement pour les Rats TC 4, TC 8 et TC 12. Celle de la carcasse demeure constante. Enfin, les masses de stérols éliminés quotidiennement dans les fèces atteignent, en moyenne, 6.2 (TC 4), 7.7 (TC 8) et 6.6 mg (TC 12) (Tableau VII).

Ainsi, l'augmentation pondérale des rats aboutit à un accroissement moyen de 6 mg de stérols par semaine, comme celle des rats témoins<sup>1</sup>. On a admis qu'il s'agissait essentiellement de cholestérol<sup>6</sup>. L'augmentation en cholestérol hépatique est de 30 mg entre la 4ème et la 8ème semaine d'expérience (cette valeur sera aussi adoptée entre la 1ère et la 4ème semaine). Elle n'est plus que de 3.8 mg par semaine entre la 8ème et la 12ème semaine. Les rats ne sont donc pas en état stationnaire pour deux raisons: accroissement pondéral et formation d'un foie gras. Cette 2ème raison a une importance pratique quadruple de la première, étant donné que tout le cholestérol d'un foie gras est mobile<sup>7</sup>. Ces observations soulignent l'importance de la période préparatoire à l'expérience proprement dite. Dans le cas particulier, 6 mois auraient été nécessaires pour parvenir au nouvel état stationnaire. C'est alors seulement que l'on aurait dû commencer l'expérience d'équilibre isotopique.

#### *Relativité de l'équilibre isotopique*

Les augmentations continues des radioactivités spécifiques moyennes du cholestérol plasmatique des Rats TC 4, TC 8 et TC 12 (respectivement 737, 914 et 1058 désint./min par mg), du cholestérol du foie (721, 920, 1020 désint./min par mg) et de la carcasse (315, 461, 542 désint./min par mg) attestent que cet équilibre n'est pas atteint (Fig. 3). Ces variations sont trop importantes pour qu'elles puissent être expliquées par la seule augmentation de la prise de nourriture des rats. Par ailleurs,

## TABLEAU V

## BILANS RADIOACTIFS

Radioactivités de [ $4^{-14}\text{C}$ ]cholestérol ingéré au cours d'expériences d'équilibre isotopique par voie orale, des stérols fécaux et urinaires, éliminés au cours des expériences et des stérols contenus dans les rats, les sacrifices ayant lieu 4, 8 et 12 semaines après le début des expériences.  $M$ , moyenne.

Numéro du rat:	Lot expérimental: TC 4				TC 8				TC 12						
	1	2	3	4	M	5	6	7	8	M	9	10	11	12	M
Ingestion	653	688	788	808	734	1729	1596	1613	1552	1623	2461	2672	2493	2433	2514
Excréments	217	234	261	241	238	830	858	616	682	746	1329	1512	1395	1515	1438
Urinés	20	21	21	21	21	47	47	41	46	45	71	72	71	71	71
Animal	236	259	287	262	261	375	361	321	363	355	460	479	452	439	457
carcasse															
foie et sang	133	194	222	263	203	353	257	593	360	390	540	521	389	380	457
Bilan	369	447	509	525	462	728	618	914	723	745	1000	1000	841	819	915
Bilan radioactif (%)	-7	+2	0	-3	-2	-7	-5	-3	-6	-5	-3	-3	-7	-1	-3

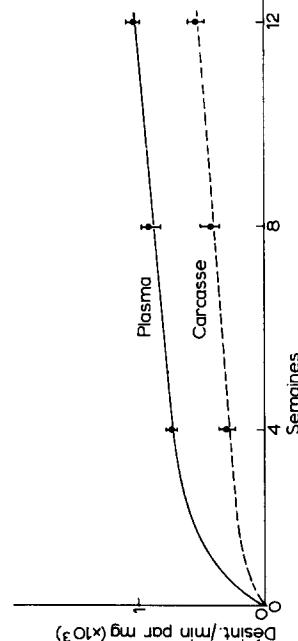


Fig. 3. Radioactivités spécifiques du [ $4^{-14}\text{C}$ ]cholestérol du plasma et des stérols de la carcasse (désint./min par mg) de rats sacrifiés après 4 semaines (Lot TC 4), 8 semaines (Lot TC 8) ou 12 semaines d'expérience isotopique par voie orale (Lot TC 12).

TABLEAU VI  
RÉSULTATS PONDÉRAUX

Poids des animaux et quantité de nourriture ingérée quotidiennement, poids du foie et concentrations en cholestérol du plasma du foie et de la carcasse au sacrifice des rats après 4 semaines (Lot TC 4), 8 semaines (Lot TC 8) ou 12 semaines d'expérience (Lot TC 12). M, moyenne.

Numéro du rat:	Lot expérimental: TC 4				TC 8				TC 12						
	1	2	3	4	M	5	6	7	8	M	9	10	11	12	M
Poids des rats (g):															
Début	41.0	45.1	48.0	44.7	44.7	50.0	45.2	53.5	46.9	48.9	49.7	48.3	45.2	47.2	47.6
Fin	43.1	46.5	49.9	46.8	46.5	54.2	46.7	55.8	48.6	51.3	53.3	54.2	50.7	52.8	52.7
+ Δ	21	14	19	19	18	42	15	23	17	24	36	59	55	56	51
Nourriture ingérée (par jour)	14.6	15.3	17.5	18.0	16.3	19.1	17.7	17.6	17.0	17.8	17.9	19.6	18.3	17.9	18.4
Poids du foie (g)	18.0	18.5	24.5	24.0	21.2	24.2	23.8	25.3	24.3	24.4	26.3	29.1	23.9	25.2	26.1
Cholestérol du plasma (mg/ml)															
Total	0.43	0.51	0.73	0.98	0.66	1.37	1.02	—	1.41	1.16	—	0.92	2.40	1.28	1.53
Cholestérol du foie (mg/g)															
Libre	2.26	2.17	2.14	2.03	2.15	2.18	2.08	2.53	2.14	2.23					
Esterifié	12.38	11.34	9.92	12.25	11.47	12.25	8.45	24.23	13.68	14.65					
Total	14.65	13.51	12.06	14.28	13.62	14.43	10.53	26.76	15.82	16.88	19.22	17.26	15.35	13.57	16.35
Stérols de la carcasse (mg/g)															
Total	1.35	1.51	1.70	1.51	1.52	1.28	1.74	1.64	1.58	1.56	1.48	1.63	1.66	1.45	1.55

l'augmentation progressive du rapport de la radioactivité spécifique du cholestérol de la carcasse à celle du cholestérol sanguin (43, 50 et 53 %, respectivement pour TC 4, TC 8 et TC 12) peut être due à l'existence de vitesses lentes de transfert de cholestérol<sup>8,9</sup>. Or, les radioactivités du cholestérol de la carcasse croissent ainsi: 269 000 (TC 4), 355 000 (TC 8) et 430 000 désint./min (TC 12) (Tableau V). On doit donc distinguer deux parts dans l'accroissement de ces radioactivités. La première correspond à l'approche progressive de l'équilibre isotopique dans l'organisme, la deuxième rend compte de son expansion. Il en résulte un retard dans l'établissement de l'équilibre isotopique.

#### Bilan radioactif et dégradation bactérienne du cholestérol

Le bilan radioactif global atteint, en moyenne, -5 à -3 % pour chacun des 3 lots étudiés, alors que le bilan radioactif hebdomadaire est successivement de -53 % (TC 4), -38,5 % (TC 8) et -15 % (TC 12) (Tableau V et Fig. 4). Pour expliquer, chez l'homme, le déficit du bilan radioactif hebdomadaire dans des expériences type "équilibre isotopique", GRUNDY *et al.*<sup>10</sup> ont suggéré que 10-40 % du [4-<sup>14</sup>C]cholestérol et du  $\beta$ -[<sup>3</sup>H]sitostérol alimentaires, sont dégradés par la flore intestinale. Dans cette étude, le bilan radioactif global est quasiment nul quelle que soit la durée expérimentale, en accord avec des résultats antérieurs<sup>1,2</sup>. De plus, la radioactivité de l'animal au sacrifice est sous forme de stérols: le produit de la masse des stérols par leur radioactivité spécifique rend compte de la radioactivité de l'extrait alcoolique. Ainsi, en accord avec d'autres auteurs, chez le rat, le noyau du cholestérol n'est pas dégradé de façon appréciable en molécules plus petites dans le contenu intestinal, comme, du reste, dans les organes<sup>11,12</sup>.

On a enfin voulu apporter une dernière preuve à cette conclusion. A des homogénats de contenus coliques et caecaux de rats témoins ou ayant ingéré trois régimes

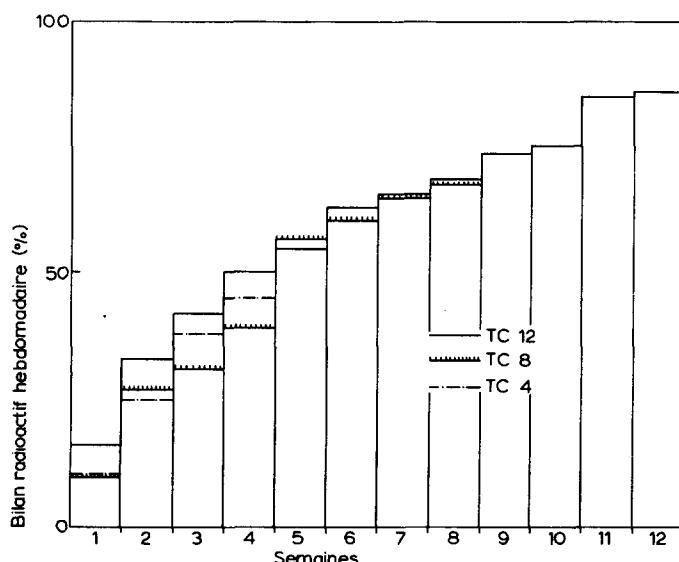


Fig. 4. Bilan radioactif hebdomadaire moyen de rats sacrifiés après 4 semaines (Lot TC 4), 8 semaines (Lot TC 8) ou 12 semaines d'expérience isotopique par voie orale (Lot TC 12).

TABLEAU VII  
PROCESSEUS IMPLIQUÉS DANS L'ÉLIMINATION DES STÉROOLS FÉCAUX

Valeurs des vitesses des processus intervenant dans l'élimination des stérols fécaux au cours d'équilibres isotopiques par voie orale réalisés avec du [ $4^{-14}\text{C}$ ]cholestérol chez des rats sacrifiés 4, 8 et 12 semaines après le début de l'expérience.  $M$ , moyenne.

Numéro du rat:	Lot expérimental: TC 4 *				TC 8 **				TC 12 ***						
	I	2	3	4	M	5	6	7	8	M	9	10	11	12	M
Ingestion	7.0	7.3	8.4	8.8	7.8	9.6	8.8	8.5	8.3	8.8	8.6	9.7	9.3	8.8	9.1
Absorption	6.3	7.0	7.7	8.2	7.3	9.1	8.1	8.0	7.7	8.2	8.5	9.3	9.1	8.4	8.8
Non absorption	0.7	0.3	0.7	0.6	0.5	0.5	0.7	0.5	0.6	0.6	0.1	0.4	0.2	0.4	0.3
Excréition	2.6	2.8	2.2	2.3	2.5	3.2	2.7	3.8	3.4	3.3	2.5	3.3	3.2	3.4	3.1
Sécrétion externe	3.1	2.1	3.5	3.9	3.2	3.8	4.5	3.8	3.2	3.8	3.1	3.7	2.8	3.3	3.2
Stérols fécaux	6.4	5.2	6.4	6.8	6.2	7.5	7.5	7.9	8.1	7.2	7.7	5.7	7.4	6.2	7.1
Absorption (%)	91	95	92	93	92	95	92	94	92	93	99	96	98	96	97

\* Calculs portant sur les 3ème et 4ème semaines d'expérience.

\*\* Calculs portant sur les 5 à 8èmes semaines d'expérience.

\*\*\* Calculs portant sur les 9 à 12èmes semaines d'expérience.

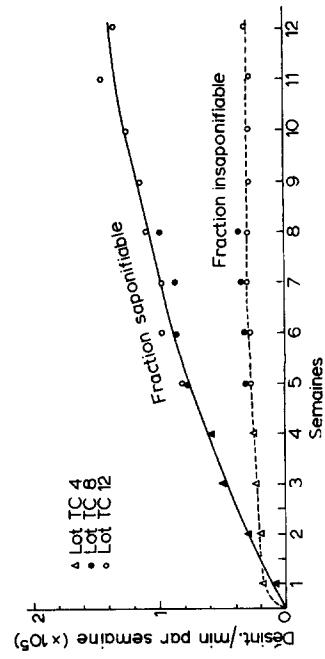


Fig. 5. Radioactivités moyennes éliminées chaque semaine (désint./min par semaine) dans les fractions saponifiable et insaponifiable des excréments de rats sacrifiés après 4 semaines (Lot TC 4), 8 semaines (Lot TC 8) ou 12 semaines d'expérience isotopique par voie orale (Lot TC 12).

différents, on a additionné des quantités traceuses de [4-<sup>14</sup>C]cholestérol, selon Wood ET HATOFF<sup>13</sup>. Après incubation à 37°, dans l'obscurité, en aérobie ou en anaérobie, pendant 48 h, la radioactivité dans la fraction acide est négligeable. Cette observation est identique à celle des auteurs cités ci-dessus qui ont étudié les fèces humaines. Pour d'autres, la dégradation bactérienne du cholestérol ne serait possible, chez l'homme, que dans des conditions alimentaires particulières<sup>14</sup>. En conséquence, les causes du déficit des bilans radioactifs abdominaux chez nos rats, sont à rechercher dans un tout autre contexte.

#### *Vitesses des processus de renouvellement*

Connaissant les radioactivités des fractions insaponifiable et saponifiable des excréments (Fig. 5), on a calculé ces vitesses en appliquant les formules précédemment établies qui, rappelons-le, concernent un organisme en état statonnaire<sup>1</sup>.

#### *Absorption et sécrétion externe*

L'absorption du cholestérol est de 7.3, 8.2 et 8.8 mg par jour et la sécrétion externe de cholestérol de 3.2, 3.8 et 3.2 mg par jour, respectivement pour les Rats TC 4, TC 8 et TC 12. Le coefficient d'absorption est particulièrement élevé: 93-97 % (Tableau VII).

Les pourcentages de stérols d'excration restant dans les limites physiologiques définies dans le premier chapitre (respectivement 39-40 et 47 % en moyenne pour les Rats TC 4, TC 8 et TC 12), on admettra, en premier lieu, que l'erreur faite sur la masse de cholestérol d'excration ( $m_E$ ) mesurée dans le contexte de l'équilibre isotopique réalisé par voie parentérale est négligeable. La radioactivité spécifique ( $r_p$ ) du [<sup>14</sup>C]cholestérol plasmatique augmentant constamment au cours de la période de recueil (Fig. 3), et  $r_p$  étant mesurée à la fin de cette période, la radioactivité moyenne attribuée à l'excration ( $R_E$ ) sera surestimée. Une surestimation de  $R_E$  entraîne une erreur par défaut sur la radioactivité du cholestérol non absorbé ( $R_{NA}$ ) et donc une erreur par excès sur celle du cholestérol absorbé ( $R_A$ ). En effet:

$$\begin{aligned} R_{NA} &= R_F - R_E \\ R_A &= R_I - R_{NA} \end{aligned}$$

$R_F$  étant la radioactivité des stérols neutres fécaux,  $R_I$  étant la radioactivité du cholestérol ingéré.

Dans la majorité des cas,  $R_{NA}$  est plus grand que  $R_E$ . Ainsi, une erreur par excès de 10 % sur  $R_E$ , par exemple, quelle qu'en soit l'origine, entraîne une erreur par défaut de 10 % au maximum sur  $R_{NA}$ . Or, la masse de cholestérol absorbé est, en règle générale, 5 fois plus grande que la non absorbée. Une erreur par défaut de 10 % sur  $R_{NA}$  n'entraîne donc qu'une erreur de 2 % sur  $R_A$ . Des erreurs relatives de même grandeur affectent, en conséquence, les masses de cholestérol non absorbé ( $m_{NA}$ ) et absorbé ( $m_A$ ). En considérant la Relation 1, on constate que l'erreur sur la vitesse de sécrétion externe ( $m_{SE}$ ) est entachée d'erreur minime puisque celles affectant  $m_E$  et  $m_{NA}$  sont de signes contraires. Ainsi, bien que l'organisme soit en état d'expansion et l'équilibre isotopique en cours d'établissement, la méthode fournit des valeurs sûres des flux de cholestérol dans l'intestin: excration, sécrétion externe, absorption.

### *Transformation et sécrétion interne*

Les masses de cholestérol transformé quotidiennement en acides biliaires croissent ainsi: 10.5 (TC 4), 13.5 (TC 8) et 17.5 mg par jour (TC 12) (Tableau IV). L'équilibre isotopique n'étant pas atteint, on a calculé de nouvelles vitesses selon les deux types de correction déjà proposés à propos de l'équilibre isotopique par voie parentérale. Les valeurs sont reportées dans le Tableau IV. Elles sont très proches les unes des autres, la variation maximale (TC 4) étant de 6 %. La comparaison des résultats obtenus avec le [<sup>3</sup>H]cholestérol et le [<sup>14</sup>C]cholestérol est satisfaisante. Pour les Rats TC 4, on a 13.5 mg au lieu de 12 mg par jour (moyenne adoptée 12.6 mg par jour); pour les Rats TC 8, on a 17.2 au lieu de 15.2 mg par jour (moyenne 16.2 mg par jour); pour les Rats TC 12, on a 19.6 au lieu de 18.9 mg par jour (moyenne 19.3 mg par jour). Les valeurs obtenues pour l'équilibre isotopique par voie parentérale sont toutes en excès par rapport à celles obtenues par l'équilibre isotopique par voie orale. Enfin, on constate que malgré les corrections, les vitesses de transformation du cholestérol en acides biliaires croissent avec la durée de l'expérience. L'explication de ce fait sera fournie ci-après.

Connaissant les valeurs  $m_A$ ,  $m_T$  et  $m_E$ , l'application de la Formule 2 fournit des valeurs de la sécrétion interne: 5.7 (TC 4), 8.6 (TC 8) et 11.8 mg par jour (TC 12) (Tableau VIII). Ces valeurs sont erronées car la relation exprime l'équilibre dynamique du cholestérol mobile dans un état stationnaire et non dans un état d'expansion. Dans ce dernier cas, la masse du cholestérol mobile de l'organisme s'accroît. On écrira donc:

$$m_A + m_{SI} = m_T + m_E + m_{AC} \quad (3)$$

$m_{AC}$  étant la vitesse d'accroissement en cholestérol mobile de l'organisme.

Les nouvelles valeurs ainsi calculées sont, respectivement, égales à 13.8, 17.1 et 15.7 mg par jour pour les Rats TC4, TC 8 et TC 12. BLOOMFIELD<sup>15</sup> ayant montré chez le rat que la synthèse du cholestérol est proportionnelle à l'apport énergétique des régimes, on a rapporté ces derniers résultats à un apport unitaire de 100 cal,

TABLEAU VIII

#### **ÉQUILIBRE DYNAMIQUE DU CHOLESTÉROL MOBILE**

Vitesses moyennes des vitesses des processus intervenant dans l'équilibre dynamique du cholestérol mobile chez des rats sacrifiés 4, 8 et 12 semaines après le début de l'expérience d'équilibre isotopique.

	<i>Vitesse moyenne (mg par jour)</i>		
	<i>TC 4</i>	<i>TC 8</i>	<i>TC 12</i>
Transformation	12.6	16.2	19.3
Excrétion fécale	2.5	3.3	3.1
Excrétion urinaire	0.7	0.7	0.7
Disparition	15.8	20.2	23.1
Absorption	7.3	8.2	8.8
Sécrétion interne (Eqn. 2)	8.5	12.0	14.3
Accroissement	~5.3	5	1.5
Sécrétion interne (Eqn. 3)	13.8	17.0	15.8
Sécrétion interne par 100 cal	20.2	22.7	20.4

puisque les ingestas des Rats TC 4, TC 8 et TC 12 ne sont pas rigoureusement les mêmes. Les vitesses de sécrétion interne sont alors, respectivement, de 20.2, 22.7 et 20.4 mg/100 cal par jour. Ainsi, dans le cas expérimental traité, la vitesse de sécrétion interne est constante (21 mg/100 cal par jour) et indépendante de l'état d'expansion de l'organisme. On en déduit donc que cet état aboutit à une réduction de la vitesse de transformation, puisque la vitesse d'excrétion est elle-même pratiquement constante.

#### DISCUSSION GÉNÉRALE

Pour 6 des 17 expériences effectuées (Nos. 2, 7, 8, 10-12, Tableau I), le poids des animaux est pratiquement constant durant l'expérience. Le déficit du bilan radioactif hebdomadaire est alors à rapporter exclusivement au fait que l'équilibre isotopique n'est pas encore atteint. Dans tous ces cas, le calcul des vitesses de renouvellement doit tenir compte non pas de la radioactivité spécifique du cholestérol plasmatique au sacrifice de l'animal, mais de la radioactivité spécifique moyenne de ce cholestérol durant la période de collection des fèces.

Le poids des animaux augmente au cours de 9 autres expériences (Nos. 3-5, 9, 13-17, Tableau I). Dans ces cas, le déficit du bilan radioactif hebdomadaire peut avoir une double cause. D'une part, l'organisme étant en expansion, son accroissement en cholestérol peut, à lui seul, suffire à expliquer le déficit du bilan. D'autre part, l'équilibre isotopique peut aussi ne pas être atteint. On a vu ci-dessus que l'on peut tenir compte de ces deux états de fait et calculer avec précision les vitesses du processus d'apparition et de disparition du cholestérol mobile. Mais, dans tous ces cas, ces vitesses ne sont plus à rapporter au seul renouvellement, mais aussi à l'accroissement du cholestérol de l'organisme.

Dans un organisme en expansion du type de celui d'un rat ingérant un régime contenant 0.2 % de taurocholate, les vitesses d'apparition ne sont pas modifiées. L'accroissement en cholestérol mobile de l'organisme se fait aux dépens de la transformation en acides biliaires. Ce processus est donc un élément très sensible de la régulation de l'équilibre dynamique du cholestérol mobile. Rappelons, en effet, que chez des rats dont l'absorption de cholestérol est augmentée, c'est l'accélération de la transformation du cholestérol en acides biliaires qui rétablit l'égalité de la Relation 2 (ref. 2). Il en est de même lorsque la vitesse de sécrétion interne est accrue<sup>16</sup>.

Les valeurs relatives des radioactivités des stérols totaux, du cholestérol excréte et du cholestérol absorbé, au cours d'expériences d'équilibre isotopique, sont telles que l'erreur sur l'absorption intestinale du cholestérol est négligeable. De plus, le calcul de la masse excrétée est fournie à moins de 10 % près. Dans un état stationnaire (Eqn. 2), c'est donc l'erreur sur la vitesse de transformation en acides biliaires (quantitativement cinq fois supérieure à celle de l'excrétion) qui détermine l'erreur sur la sécrétion interne. Dans cette optique, le fait de mesurer cette vitesse de transformation à la fois par l'équilibre isotopique par voie parentérale et par voie orale, est un gage de l'exactitude de sa valeur, et, en conséquence, de celle de la sécrétion interne. Dans un état d'expansion (Eqn. 3), la connaissance exacte de la vitesse d'accroissement est la deuxième condition indispensable au calcul de la vitesse de sécrétion interne.

## RÉSUMÉ

Depuis la publication de la méthode d'équilibre isotopique appliquée au cholestérol chez le rat, des modifications pratiques ont été apportées. Elles sont décrites. L'utilisation d'un implant de cholestérol marqué conduit dans certains cas à surestimer la vitesse d'excrétion fécale du cholestérol. Dans les cas douteux, il est nécessaire de faire appel à la technique initiale d'injection sous-cutanée quotidienne de cholestérol marqué.

Par ailleurs, la méthode d'équilibre isotopique utilisée en routine (17 expériences) a révélé la grande variabilité des bilans radioactifs hebdomadaires. La radioactivité du cholestérol et de ses produits de transformation qui sortent de l'organisme n'est que rarement égale à la radioactivité du cholestérol qui y pénètre comme cela devrait être le cas. Pour préciser les origines de ces déficits, une expérience d'équilibre isotopique a été entreprise avec des rats sacrifiés au bout de 4, 8 et 12 semaines.

La dégradation bactérienne ne peut être invoquée pour expliquer les déficits des bilans radioactifs hebdomadaires, car le bilan radioactif global qui inclut le cholestérol radioactif contenu dans les rats est toujours nul. En fait, les déficits des bilans hebdomadaires s'expliquent parce que, soit, l'équilibre isotopique n'est pas réellement atteint, soit, l'organisme est en expansion et non en état stationnaire. Dans les deux cas, l'utilisation de formules adéquates permet de calculer avec sûreté toutes les vitesses intervenant dans l'équilibre dynamique du cholestérol. Dans un organisme en expansion, il est indispensable de connaître la vitesse d'accroissement en cholestérol de l'organisme. Compte tenu de ces corrections, l'erreur relative sur chaque vitesse est précisée.

Dans le cas particulier des rats utilisés pour cette expérimentation critique, les animaux ingèrent un régime témoin auquel est additionné 0.2 % de taurocholate de sodium. Malgré l'état d'expansion qui en résulte, les vitesses de sécrétion interne, d'excrétion et d'absorption sont constantes. L'accroissement en cholestérol mobile de l'organisme se fait aux dépens de sa transformation en acides biliaires.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été accompli grâce à une subvention du Département de Biologie du Commissariat à l'Énergie Atomique, Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay, Essonne. Nous remercions vivement Madame C. VERNEAU et Monsieur J. C. SULPICE de leur aide technique.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 F. CHEVALLIER ET C. LUTTON, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 507.
- 2 F. CHEVALLIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 48 (1966) 715.
- 3 J. D. WILSON, *J. Lipid Res.*, 5 (1964) 409.
- 4 F. CHEVALLIER ET D. MATHE, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1964) 509.
- 5 L. BUGNARD, F. CHEVALLIER ET J. COURSAGET, *J. Physiol. Paris*, 45 (1953) 413.
- 6 F. D'HOLLANDER ET F. CHEVALLIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 176 (1969) 146.
- 7 F. CHEVALLIER, dans *Tritium in the Physical and Biological Sciences*, Vol. 2, I.A.E.G., Vienne, 1962.
- 8 F. CHEVALLIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 43 (1961) 447.

- 9 F. CHEVALLIER ET F. GIRAUD, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1966) 787.
- 10 S. M. GRUNDY, E. H. AHRENS ET G. SALEN, *J. Lipid Res.*, 9 (1968) 374.
- 11 I. L. CHAIKOFF, M. D. SIPERSTEIN, W. G. DAUBEN, H. L. BRADLOW, J. E. EASTHAM, G. M. TOMKINS, J. R. MEIER, R. W. CHEN, S. HOTTA ET P. A. SRERE, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 413.
- 12 B. BORGSTRÖM, *J. Lipid Res.*, 9 (1968) 473.
- 13 P. D. S. WOOD ET D. HATOFF, *Lipids*, 5 (1970) 702.
- 14 L. DENBESTEN, W. E. CONNOR, T. H. KENT ET D. LIN, *J. Lipid Res.*, 11 (1970) 341.
- 15 D. K. BLOOMFIELD, *Proc. Soc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 50 (1963) 117.
- 16 C. LUTTON ET F. CHEVALLIER, en préparation.

*Biochim. Biophys. Acta*, 255 (1972) 762-779