

50376  
1972  
43

50376  
1972  
43

# THÈSE

Présentée

**A L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE**

pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ  
MENTION SCIENCES**

par

**GILLES MONNIER**



SUJET DE LA THESE .- Recherches sur les lipoprotéines de rat :  
extraction, purification et marquage ;  
distribution et renouvellement dans le sang.  
Echanges avec le système réticulo-endothélial  
et le tissu conjonctif.

Soutenue le 28 juin 1972, devant la Commission d'examen

Mr MONTREUIL,	}	Président
Mr BEAUMONT,		Rapporteur
Mlle SPIK,		Examineurs
Mr BISERTE,		
Mr STEIN		
		Invité.



A mes Parents,

A ma Famille et Belle Famille,

A mon Frère,

A mes Amis.

A MA FEMME

Nous témoignons notre profonde reconnaissance à

Monsieur MONTREUIL

Professeur à la Faculté des Sciences de LILLE

Nous le remercions pour  
les précieux conseils qu'il  
nous a donnés sur l'élabora-  
tion de cette thèse qu'il a  
bien voulu présider.

Nous lui exprimons ici  
notre sincère admiration.

Nous exprimons nos remerciements à

Mademoiselle SPIK

Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Lille

Nous la remercions pour  
avoir bien voulu juger notre  
travail en faisant partie de  
notre jury.

Nous lui témoignons  
ici notre gratitude.

Nous exprimons notre sincère gratitude à

Monsieur BISERTE

Professeur à la Faculté de Médecine de LILLE

Qu'il veuille trouver ici  
l'expression de notre vive  
reconnaissance pour l'intérêt  
qu'il a bien voulu porter à  
notre travail en l'encourageant  
et en le jugeant.

Nous lui témoignons notre  
profond respect.

Nous témoignons notre profond respect à

Monsieur Jean-Louis BEAUMONT

Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil

Président de l'Université Paris - Val de Marne

Il nous a accueilli agréablement dans son laboratoire et guida régulièrement l'orientation de ce travail avec la bienveillance objective et l'extraordinaire esprit de synthèse qui le caractérise.

Qu'il nous soit permis de saluer en lui le penseur et le philosophe à qui nous exprimons ici notre sincère attachement et notre profonde admiration.

.Nous remercions tout spécialement

.Monsieur Bernard JACOTOT

Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine de Créteil

Nous ne l'avons jamais sollicité en vain. Ses conseils éclairés et la finesse de son jugement nous ont été très précieux dans l'élaboration de ce travail qu'il nous avait inspiré.

Qu'il soit assuré de notre respect et de notre amicale reconnaissance.



Nous témoignons notre profonde reconnaissance à

Monsieur STEIN

Professeur à l'Université Hadassah - Israël

et à

Monsieur SAMUEL

Professeur à l'Université Rockefeller - New-York

Nous les remercions pour  
les précieux conseils qu'ils  
nous ont donnés tant sur le  
plan expérimental que sur  
celui de la rédaction de notre  
travail.

Nous leur témoignons  
notre profond respect.

Nous exprimons notre profonde gratitude

aux Docteurs Ladislav, Barbara et Michel ROBERT

Directeurs du Laboratoire de Biochimie

du tissu conjonctif

Qu'ils veuillent trouver ici  
l'expression de notre vive reconnaissance pour la gentillesse et  
l'efficacité avec lesquelles ils  
nous ont aidé dans la réalisation  
de nos travaux.

Nous les assurons ainsi que  
leur équipe de notre sincère sympathie.

En gage d'amitié et en témoignage

d'une étroite collaboration

Nous remercions

Mlle Nicole NAVARRO, Mme Claude MARTIN,

les Docteurs Violette BEAUMONT, Marta SZIGETI,

Jean-Charles FRIEDMANN et Jean-Claude BUXTORF

ainsi que

Mme Françoise BERNEAU et Mme Thérèse GHEMBAZA

qui nous ont aidé au sein d'une équipe amicale



RECHERCHES SUR LES LIPOPROTEINES SERIQUES DE RAT :

EXTRACTION, PURIFICATION ET MARQUAGE

DISTRIBUTION ET RENOUVELLEMENT DANS LE SANG.

ECHANGES AVEC LE SYSTEME RETICULO-ENDOTHELIAL

ET LE TISSU CONJONCTIF

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE ..... p.31

## CHAPITRE I : SEPARATION ET PURIFICATION DES LIPOPROTEINES

### SERIQUES DE RAT

A - <u>Introduction</u> .....	p. 47
B - <u>Matériel et Méthodes</u> .....	49
a) Réactifs .....	49
b) Chromatographie et gel filtration .....	50
c) Immuns-sérums .....	50
C - <u>Procédé de séparation et de purification des lipoprotéines du rat</u> .....	52
1) <u>Béta-Lipoprotéines</u> .....	52
a) Séparation des béta-lipoprotéines par précipitation .....	52
b) Purification des béta-lipoprotéines .....	53

2) <u>Alpha-lipoprotéines</u> .....	p. 54
a) Séparation des alpha-lipoprotéines par ultracentrifugation .....	54
b) Purification de l'alpha-lipoprotéine ..	55
D - <u>Résultats</u> .....	57
1) <u>Béta-lipoprotéines</u> .....	57
2) <u>Alpha-Lipoprotéines</u> .....	59
E - <u>Discussion</u> .....	65
a) La précipitation des bêta-lipoprotéines.	65
b) L'ultracentrifugation .....	66
c) Les chromatographies .....	66



CHAPITRE II : MARQUAGE ET DISTRIBUTION SANGUINE DES LIPOPROTEINI

DEMI-VIE

A - <u>Introduction</u> .....	p.	68
B - <u>Matériel et Méthodes</u> .....		72
1) <u>Marquage des lipoprotéines sériques</u>		
<u>in vitro</u> .....		72
a) Marquage de la bêta-lipoprotéine sérique avec le cholestérol 14 C-4..		72
b) Marquage de l'alpha-lipoprotéine sérique avec le cholestérol 14 C-4..		72
2) <u>Marquage des lipoprotéines sériques</u>		
<u>in vivo</u> .....		73
a) Marquage de la bêta-lipoprotéine sérique avec le cholestérol 14 C-4..		73
b) Marquage de la bêta-lipoprotéine sérique avec l'acétate 14 C-U .....		74
c) Marquage de l'alpha-lipoprotéine sérique avec la L-Leucine 14 C-U ...		74

d) Marquage de l'alpha-lipoprotéine sérique avec l'acétate 14 C-U .....p.	75
3) <u>Conduite à tenir</u> .....	75
 C - <u>Epuration des lipoprotéines sériques injectées</u> <u>dans le sang</u> .....	 77
1) <u>Béta-lipoprotéines</u> .....	77
2) <u>Alpha-Lipoprotéines</u> .....	78
 D - <u>Discussion</u> .....	 86
1) <u>Béta-lipoprotéines</u> .....	86
2) <u>Alpha-lipoprotéines</u> .....	87

CHAPITRE III : ROLE DU SYSTEME RETICULO-ENDOTHELIAL SUR LE  
METABOLISME DES LIPIDES CIRCULANTS

I - ROLE D'AGENTS MODIFICATEURS DE L'ACTIVITE DU SYSTEME  
RETICULO-ENDOTHELIAL SUR LE RENOUVELLEMENT DU CHOLESTEROL

A - <u>Introduction</u> .....	p.	90 A
B - <u>Matériel et Méthodes</u> .....		90 F
a) Incorporation du cholestérol 14 C-4 dans l'organisme .....		90 F
b) Injections et prélèvements .....		90 F
c) Mesure de la radioactivité spécifique du cholestérol sanguin .....		90 G
d) Méthodes statistiques .....		90 H
e) Conduite des expériences .....		90 H

C - Résultats .....p. 90 J

1) Etude de l'incorporation des particules  
de carbone dans le système réticulo-  
endothélial ..... 90 J

2) Expérience I ..... 90 M

3) Expérience II ..... 90 N

D - Discussion ..... 90 Q

Rôle de deux agents modificateurs de l'ac-  
tivité du système réticulo-endothélial sur  
la radioactivité spécifique du cholestérol  
sérique ..... 90.Q

ROLE DES AGENTS MODIFICATEURS DE L'ACTIVITE DU SYSTEME RETICULO-ENDOTHELIAL SUR L'EPURATION DES LIPOPROTEINES SERIQUES .....	p.	91
- <u>Introduction</u> .....		91
- <u>Béta-lipoprotéines</u> .....		93
1) <u>Matériel et Méthodes</u> .....		93
a) Conduite des expériences .....		93
b) Mesure de la radioactivité des lipides sanguins .....		94
c) Composition du carbone colloïdal et du Freund .....		94
d) Méthodes statistiques .....		95
2) <u>Résultats</u> .....		95
3) <u>Discussion</u> .....		97

C - <u>Alpha-Lipoprotéines</u> .....	p.	99
1) <u>Conduite de l'expérience</u> .....		99
2) <u>Résultats et Discussion</u> .....		100
a) Fixation .....		101
b) Libération .....		102
c) Epuration .....		104

IV - ROLE DU TISSU CONJONCTIF SUR LA FIXATION DU CHOLESTER  
SERIQUE.

A - <u>Introduction</u> .....	p.	106
B - <u>Matériel et Méthodes</u> .....		109
a) Incorporation du cholestérol 14 C-4 dans l'organisme .....		109
b) Extractions et dosages .....		109
c) Implantations .....		110
C - <u>Résultats</u> .....		111
1) <u>Radioactivité spécifique du cholestérol         sérique</u> .....		111
2) <u>Radioactivité spécifique du cholestérol         dans l'alpha et les bêta-lipoprotéines</u> .....		114
3) <u>Radioactivité spécifique du cholestérol         des éponges</u> .....		114

4) <u>Radioactivité spécifique du cholestérol</u> <u>dans la peau et l'aorte</u> .....	p. 115
---	--------

D - <u>Discussion</u> .....	118
-----------------------------	-----



<u>CONCLUSIONS GENERALES</u> .....	p. 122
- <u>Rôle du système réticulo-endothélial sur</u> <u>l'épuration des lipoprotéines sériques</u> .....	124
- <u>Rôle du tissu conjonctif sur l'épuration des</u> <u>lipoprotéines sériques</u> .....	126
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	129

## INTRODUCTION GENERALE

---

Ce travail qui fait l'objet d'une thèse de Doctorat es-sciences, décrit un certain nombre d'expériences physiologiques et biochimiques visant à étudier un des aspects du métabolisme des lipoprotéines sanguines.

Nous avons plus particulièrement étudié le rôle de ces lipoprotéines de rat dans le déterminisme des lésions artérielles de l'athérosclérose.

Nous commencerons par un rappel des données actuelles concernant l'athérosclérose et les lipoprotéines.

## L'ATHEROSCLEROSE

L'athérosclérose est une maladie de la paroi artérielle, génératrice d'ischémie. Suivant le territoire touché par le processus ischémique, l'athérosclérose est responsable de maladies graves et très fréquentes, telles que l'angine de poitrine et l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux, les artériopathies des membres.

L'athérosclérose est caractérisée par des lésions de la paroi des grosses et moyennes artères qui intéressent la tunique interne (intima), et la partie voisine de la tunique moyenne (média).

L'athérosclérose groupe deux catégories de lésions qui sont toujours associées :

1) - Des modifications des structures conjunctivo-élastiques, notamment de la limitante élastique interne qui sépare la média de l'intima :

. dislocation des fibres élastiques, notamment de la limitante élastique interne qui sépare la média de l'intima,

. modification de la substance fondamentale avec accumulation de certains mucopolysaccharides,

. calcifications apparaissant dans les lésions évoluant depuis plusieurs années.

2) - Un dépôt de lipides (20), principalement du cholestérol estérifié (21) ; ce dépôt (athérome) est à la fois intra et extra-cellulaire, et siège surtout dans la région sous-endothéliale de l'intima, réalisant une déformation de l'intima avec rétrécissement du calibre artériel.

3) - A ces lésions pariétales s'associent dans la lumière du vaisseau, plus ou moins rapidement, des coagulations fibrineuses qui aboutissent à une obstruction du vaisseau.

Bien que l'on ignore encore les mécanismes précis qui conduisent aux lésions d'athérosclérose, un certain nombre de facteurs favorisant la maladie sont connus : à côté de facteurs généraux tels que l'hypertension, le tabagisme, l'obésité, le diabète (30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 316), l'un des facteurs de risque les plus importants consiste en anomalies des lipides sanguins (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 33, 317). Les enquêtes épidémiologiques maintenant nombreuses ont bien montré qu'il existait un lien entre l'athérosclérose humaine et les troubles des lipides sanguins. Ces troubles consistent essentiellement en une hypercholestérolémie, presque constamment retrouvée chez les sujets athéroscléreux. Il est en effet frappant de constater que les sujets athéroscléreux vivant dans les pays riches ont tous une cholestérolémie supérieure à 2,50 g/l, alors que dans les pays en voie de développement

où l'athérosclérose est très rare, la moyenne de la cholestérolémie reste normale autour de 1,80 g/l.

Les anomalies des autres constituants lipidiques du sérum, triglycérides et phospholipides ont été moins régulièrement étudiées ; de même que les réponses anormales aux épreuves d'hyperlipidémie provoquée.

Depuis une dizaine d'années beaucoup d'auteurs ont étudié le métabolisme des transporteurs sanguins des lipides, alpha-lipoprotéines et bêta-lipoprotéines d'une part, lipoprotéines de très basse densité (V.L.D.L.) et chylomicrons d'autre part. Il semble en effet d'après l'analyse de la plupart des travaux récents sur les hyperlipidémies humaines et expérimentales, qu'il faille aller plus loin que l'étude des seuls lipides sanguins (cholestérol, triglycérides, phospholipides) et préciser le rôle des lipoprotéines dans la genèse de l'athérosclérose.

Un certain nombre de travaux semblent prouver que les lipoprotéines sanguines traversent l'intima des artères et participent à la vie de la paroi artérielle (39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47). Il est également admis que le cholestérol qui se dépose dans la paroi provient du sérum. Il est probable que le tissu artériel synthétise du cholestérol, mais la quantité ainsi formée est faible -au moins dans les circonstances normales- par rapport au flux de cholestérol sanguin qui traverse la paroi (48, 49, 50, 51, 52).

## IPOPORTEINES

Les lipoprotéines circulantes sont un exemple du rôle spécifique des protéines comme transporteur de substances non protéiques. En effet, les lipides, de par leur insolubilité dans l'eau ne peuvent être véhiculés que grâce à une union physique avec les protéines, sous forme d'associations moléculaires que MACHEBOEUF a découvertes en 1928 (54), et auxquelles il a donné le nom de cénapses.

Les lipides sont en fait unis à des protéines spécifiques (55), immunologiquement distinctes des autres protéines plasmatiques, et qu'on ne trouve pas à l'état libre sans lipides. Il ne s'agit donc pas d'une union fortuite, en proportions variables, mais d'édifices de structure et de composition bien déterminées.

On distingue 2 classes principales de lipoprotéines :

- Les alpha-lipoprotéines (lipoprotéines de haute densité ou H.D.L.),
- Les bêta-lipoprotéines (lipoprotéines de basse densité ou L.D.L.).

Il existe 2 classes de particules lipido-protéiques :

- Les pré-bêta-lipoprotéines (lipoprotéines de très basse densité ou V.L.D.L.),

- Les chylomicrons ou micelles apparaissant dans le sang à la période post-prandiale.

Les lipoprotéines, les particules V.L.D.L. et les chylomicrons ont été principalement étudiés chez l'homme. Chez l'animal, notamment chez le rat, elles ont fait l'objet de travaux peu nombreux (318).

#### A - Alpha-Lipoprotéines :

Ce sont les lipoprotéines les plus denses.

La partie lipidique a fait l'objet de nombreuses études (58, 59, 60) ; elle est principalement constituée, chez l'homme, de phospholipides (20 à 25%), d'esters de cholestérol (10 à 15%) et de petites quantités de triglycérides et de cholestérol libre. La partie protéique (52%) se comporte comme un polypeptide (61, 62, 63, 64). Sa composition en acides aminés est légèrement différente de celles des autres protéines plasmatiques par une teneur inférieure en acides aminés soufrés. L'acide aminé N-terminal est l'acide aspartique (65).

Au point de vue immunologique, la protéine présente une certaine hétérogénéité (66) dont l'interprétation n'est pas encore claire. L'ultra-centrifugation permet d'autre part de distinguer des fractions d'alpha-lipoprotéines plus légères

(HDL<sub>1</sub> flottant dans un milieu de densité 1,12) que les alpha-lipoprotéines principales qui ne flottent que dans des milieux de densité plus élevée variant entre 1,17 et 1,21 (67, 68, 69, 70, 71) ; ces différences sont probablement explicables par une teneur en triglycérides plus élevée (69, 70). Le poids moléculaire approximatif des alpha-lipoprotéines est voisin de 250.000.

Le mode d'attache des lipides à la protéine a donné lieu à de nombreux travaux (84). Il fait sans doute intervenir à la fois des liaisons électrovalentielles et des liaisons entre chaînes hydrophobes (72). Il est possible que de petites quantités de lipides soient liées par covalence avec la protéine (56), mais ce n'est certainement pas le cas pour la majorité de ces particules. Les lipides neutres sont liés à l'ensemble de la molécule par l'intermédiaire des phospholipides. Une fois extraits (73), ces lipides ne peuvent plus s'introduire spontanément à nouveau dans l'édifice lipoprotéinique.

#### B - Béta-Lipoprotéines :

Les LDL sont encore plus hétérogènes que les alpha-lipoprotéines ; la partie lipidique (72, 58, 74, 75, 76) est constituée, chez l'homme, par 20% de phospholipides, 35 à 40% d'esters de cholestérol, 10% de cholestérol libre et 5 à 10% de triglycérides.



La partie protéique (20%) montre à l'analyse des amino-acides (77, 78), une pauvreté en acides aminés soufrés commune avec les alpha-lipoprotéines, l'acide aminé N-terminal étant l'acide glutamique (65). Les LDL, les plus denses des bêta-lipoprotéines, flottent en ultracentrifugation à des densités comprises entre 1,006 et 1,063 (83, 79), leur poids moléculaire variant entre deux et trois millions.

Au sein de la molécule, il existe en plus des liaisons entre les chaînes hydrophobes des protéines et des phospholipides, des liaisons électro-valentiennes entre les pôles de signes opposés de la protéine et des phospholipides (72).

#### C - Pré-bêta-lipoprotéines :

Les V.L.D.L. sont des particules lipido-protéiques très légères puisqu'elles flottent en ultracentrifugation pour des densités comprises entre 0,95 et 1,006 (83, 79). Elles sont pauvres en protéines (6 à 12%) et riches en triglycérides (50 à 70%) ; leur mobilité électrophorétique est différente des LDL.

La partie protéique révèle à l'analyse plusieurs acides aminés N-terminaux (théorine, sérine, acides aspartique et glutamique (80), ce qui laisse penser que plusieurs protéines ou polypeptides sont présents dans l'édifice protéique. Il s'agit

d'ailleurs d'une véritable gamme de bêta-lipoprotéines de densités échelonnées de 0,94 à 1,0 avec un poids moléculaire variant entre 5 et 100 millions, divisée en trois sous groupes (81) séparables par ultracentrifugation. Il est difficile de dire s'il s'agit réellement de familles différentes ou d'un édifice lipoprotéinique dont la composition en protéines, triglycérides, phospholipides et cholestérol pourrait varier assez largement (82).

C'est cette fraction lipoprotéique riche en triglycérides qui augmente dans le sérum pendant la période post-digestive qui suit l'utilisation des chylomicrons par le foie (88).

### Rôle de transport des lipoprotéines

Il est clair que des lipides se trouvent véhiculés dans le sang sous forme de lipoprotéines, mais pour qu'on puisse parler de transport, il est nécessaire de démontrer une origine et une destinée de ces lipides ainsi mobilisés.

Les alpha et bêta-lipoprotéines principales ont une composition relativement constante qui s'accorde mal avec un rôle de transport. Pourtant lorsqu'on met en présence des chylomicrons (1% de protéine et 80% de triglycérides) et des alpha-lipoprotéines, il est possible de montrer que les alpha-lipopro-

téines peuvent s'enrichir en triglycérides et que les chylomicrons peuvent capter du cholestérol (85, 86, 87). Il y a donc une certaine marge dans la composition des alpha-lipoprotéines. Cette marge est petite et le nombre de molécules transportables est sans doute relativement faible.

Après un repas gras, on observe dans le sang l'apparition de chylomicrons et secondairement de pré-béta-lipoprotéines (88).

Le fait est interprété à la lumière des expériences faites in vitro avec des foies perfusés (89, 90) ou des coupes de foies ; les chylomicrons sont rapidement captés par le foie qui remet en circulation des pré-béta-lipoprotéines.

- Transportés principalement par les pré-béta-lipoprotéines, les triglycérides sont utilisés par les tissus périphériques (91), le tissu adipeux en particulier, après hydrolyse par la lipoprotéine lipase (92) ; les pré-béta-lipoprotéines sont ainsi progressivement remplacées par des lipoprotéines plus denses (93, 94, 95).

- Les triglycérides des béta et des pré-béta-lipoprotéines ont fait l'objet de nombreux travaux (96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105). Dans l'organisme, les acides gras libres captés par le foie sont transformés en triglycérides. Ceux-ci sont en majeure partie remis en circulation sous forme de pré-béta-lipoprotéines.

- Le cholestérol est véhiculé électivement par les bêta-lipoprotéines ; il s'échange assez facilement avec le cholestérol des tissus (85, 109, 110). Les échanges avec la forme estérifiée sont beaucoup plus difficiles (111). In vitro, le cholestérol libre peut être incorporé dans les lipoprotéines (112).

En ce qui concerne les alpha-lipoprotéines, elles incorporent les lipides ingérés assez longtemps auparavant principalement le cholestérol et les phospholipides.

Des études faites in vitro ont montré que les échanges de phospholipides entre alpha et bêta-lipoprotéines étaient lents et qu'ils jouaient un rôle peu important dans les conditions physiologiques (106, 107, 108).

### Épuration des lipoprotéines

L'épuration des lipoprotéines est très mal connue. Certes il est très probable que les lipoprotéines traversent la paroi des grosses artères, et cette notion est capitale dans la pathogénèse de l'athérosclérose ; mais c'est un processus de faible amplitude.

Pour étudier l'épuration des lipoprotéines du rat, nous avons choisi deux tissus, le système réticulo-endothélial et le tissu conjonctif. En effet en nous replaçant dans le cadre d'une étude sur l'athérosclérose, nous avons voulu juger

du rôle de deux tissus qui occupent une place prédominante dans la paroi artérielle.

1) Le système réticulo-endothélial

Le système réticulo-endothélial est probablement impliqué dans le métabolisme des lipides circulants puisqu'on observe au cours des hyperlipidémies, des dépôts importants de lipides au sein de certains éléments cellulaires du système réticulo-endothélial. Plusieurs auteurs ont étudié, in vivo ou in vitro, l'activité des cellules du système réticulo-endothélial sur les lipides.

a) Les lipides et les lipoprotéines sont incorporés par les cellules macrophages :

Les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol injectés sont retrouvés dans les cellules réticulo-endothéliales (255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272).

L'incorporation des lipides par les macrophages alvéolaires pulmonaires a donné lieu à plusieurs études (275, 276, 277, 278) ; le cholestérol plus spécialement a été étudié, et après injection il se retrouve dans les phagocytes alvéolaires (273). DI LUZIO (274) montre la présence de cholestérol dans

les cellules de Kupffer et suggère que les cellules réticulo-endothéliales jouent un rôle dans le métabolisme du cholestérol.

Les lipoprotéines elles-mêmes ne semblent pas être incorporées naturellement dans les macrophages sains (279), ou en très petite quantité (280), mais elles pourraient changer l'activité macrophagique ; par contre, la partie lipidique de ces lipoprotéines est incorporée dans les macrophages de la paroi artérielle (281).

Expérimentalement, l'injection de lipoprotéines permet de retrouver une partie de ces lipoprotéines dans les macrophages (282). On sait d'autre part que le blocage du système réticulo-endothélial empêche l'augmentation de certains lipides (cholestérol) dans le foie, augmentation produite normalement par un régime hypercholestérolémique (283).

Enfin, et c'est très important, on a réussi à produire des plaques d'athérome en bloquant le système réticulo-endothélial chez le rat et le lapin (284, 285) et à stopper la progression de l'athérosclérose en injectant des stimulants du système réticulo-endothélial (295).

b) Les macrophages jouent un rôle dans le métabolisme des lipides (40).

En effet, les cellules réticulo-endothéliales synthéti-

sent et hydrolysent le cholestérol ester, elles peuvent aussi estérifier le cholestérol libre (286) ; les macrophages du lapin contiennent de la cholestérol-estérase. L'incorporation et l'hydrolyse du cholestérol par les macrophages ont été démontrées chez le lapin (280).

TOMPKINS a émis l'hypothèse (290) que le cholestérol peut être converti en lipoprotéines sous une forme complexe grâce à l'action des macrophages.

c) Les macrophages peuvent synthétiser les lipides :

Les lipides peuvent être synthétisés dans la paroi artérielle par les macrophages (288, 289). Le système réticulo-endothélial joue un rôle dans le métabolisme des lipides qu'il ingère (271, 272).

En ce qui concerne le rôle des macrophages circulants dans l'athérosclérose, plusieurs auteurs dont DAY ont soutenu que chez le lapin au régime hypercholestérolémique, les lésions d'athérosclérose ainsi provoquées sont composées de macrophages bourrés de lipides. Certains auteurs ont même suggéré que ces cellules viennent du foie et transportent les lipides dans la paroi artérielle (291, 292, 293, 294) ce qui serait en accord avec des recherches microscopiques (295, 296).

## 2) Le tissu conjonctif

Le problème de la fixation des lipoprotéines sériques par les différents tissus, notamment artères et tissu conjonctif est loin d'être élucidé, de même que le rôle joué par les cellules pariétales de la paroi artérielle dans les échanges de lipoprotéines entre le sang et le tissu.

Certains arguments sont en faveur d'une action du tissu conjonctif sur l'épuration des lipoprotéines. La paroi des grosses et moyennes artères est constituée pour une grande part de tissu conjonctif et l'aptitude des cellules de la paroi artérielle à métaboliser les lipoprotéines a été maintes fois suggérée (242, 301, 244, 302, 232). L'altération du tissu conjonctif sous endothélial est perceptible dès le premier stade de l'athérosclérose sous forme d'une augmentation des mucopolysaccharides et d'un dépôt de cholestérol intra et, plus-tard, extra-cellulaire.

De plus, les cellules conjonctives de l'artère peuvent se transformer en cellules xanthomateuses (242).

On sait maintenant que la majeure partie du cholestérol qui apparaît dans le tissu conjonctif provient des lipoprotéines du sang (243, 244, 245). L'incorporation des lipides d'origine sérique par les cellules conjonctives a fait l'objet de plusieurs études en culture in vitro de fibroblastes (303, 244,



304), et in vivo dans des granulomes formés au sein d'implants sous-cutanés d'éponges en polyvinyle (242, 232, 305, 306).

En conclusion les cellules du système réticulo-endothélial et les cellules conjonctives qui sont parfois assez peu différenciées, notamment dans l'artère, sont capables de capter les lipides d'origine sérique et de se transformer en cellules xanthomateuses.

L'hypothèse selon laquelle la lésion initiale d'athérosclérose pourrait être due à un dérèglement de l'activité des cellules réticulo-endothéliales et conjonctives vis à vis des lipides sanguins a déjà été soulevée. C'est dire l'intérêt qu'il y a à étudier le rôle du système réticulo-endothélial et du tissu conjonctif sur l'épuration des lipoprotéines.

CHAPITRE I

SEPARATION ET PURIFICATION

DES LIPOPROTEINES SERIQUES

DE RAT

A - Introduction

Nous devons à MACHEROEUF en 1929 (1), la première technique de séparation de l'alpha-lipoprotéine sous une forme relativement pure, à partir d'un sérum de cheval, par précipitation saline.

En 1950 COHN (2), par une technique de fractionnement à l'éthanol, séparait les bêta-lipoprotéines des alpha-lipoprotéines en deux fractions distinctes.

Le fractionnement original des lipoprotéines par ultracentrifugation préparative est dû à DE LALLA et COFMAN en 1954 (3), dans des solutions dont la densité était ajustée

par le nitrate de sodium et l'eau lourde. Depuis les bromures de sodium et de potassium ont remplacé le nitrate de sodium et l'eau lourde dans les méthodes décrites par HAVEL en 1955 (4), RADDINGS et STEINBERG en 1960 (5), FREEMAN en 1963 (6) LINDGREN en 1961 et 1964 (7, 8), EWING en 1965 (9).

Actuellement, la précipitation des lipoprotéines par des polysaccharides tels que l'héparine et le sulfate de dextrane, joint à l'ultracentrifugation, est une technique autant préparative qu'analytique. BURSTEIN et SAMAILLE en 1955 et 1960 (10, 11), KRITCHEVSKY en 1963 (12).

En combinant la précipitation par l'héparine à une chromatographie sur DEAE cellulose et une gel filtration sur Séphadex G.200, POUILLIN, VILAIN et BEAUMONT en 1967 (14) ont obtenu des bêta-lipoprotéines humaines très pures sans recourir à l'ultracentrifugation.

Plus récemment, en ajoutant à ces trois étapes une ultracentrifugation BEAUMONT et LEMORT en 1969 (15) ont obtenu aussi des alpha-lipoprotéines d'excellente qualité.

C'est en partant de ces procédés que nous avons pu mettre au point une méthode applicable aux alpha et bêta-lipoprotéines du rat dont la préparation nécessite en effet des modalités spéciales.

B - Matériel et méthodes

Les animaux sont des rats mâles Sprague-Dawley, pesant en moyenne 280 g, nourris au régime normal de laboratoire.

a) Réactifs.

Toutes les solutions sont conservées à +4° avec de l'azide de sodium 0,1%.

- Tampon véronal 0,3 M : mélanger 1 volume de solution véronal-acétate (véronal monosodique 29,49 g ; acétate de sodium 19,43 g p 1000) et 9 volumes de chlorure de sodium 0,15 M. Ajuster une partie de la solution à pH 7,3 et l'autre à pH 8,6.

- Tampon phosphate 1 M : phosphate monopotassique de sodium, 138 g p 1000. Ajuster à pH 6,5.

- Solution d'ultracentrifugation de densité 1,21 : sucrose 30%, urée 6%, azide de sodium 0,1% et bromure de potassium qsp D. 1,21. Ajuster à pH 7,3 dans le tampon véronal 0,3 M.

- Solution précipitante des bêta-lipoprotéines : 1 volume de sulfate de dextrane 2% (Dextran Sulfate Sodium Salt, type 2000-S- poids moléculaire : 2.000 000 - Sigma chemical company) et 1 volume de chlorure de magnésium 5% dans le tampon véronal 0,3 M, pH 8,6.

b) Chromatographie et gel filtration.

Pour les chromatographies sur DEAE cellulose le type de colonne et la quantité de DEAE utilisés sont fonction de la quantité de protéines à séparer.

La DEAE est lavée selon le protocole suivant :

3 lavages à l'eau distillée

1 lavage à la soude 0,1 N

3 lavages à l'eau distillée

1 lavage à l'acide chlorhydrique 0,1 N

3 lavages à l'eau distillée.

Pour la gel filtration sur séphadex G 200, on utilise deux colonnes 30 x 2,5 cm montées en série.

Avant ou après les chromatographies ou les gels filtrations, les solutions de lipoprotéines sont dosées par la réaction de FOLIN modifiée selon LOWRY (15).

c) Immuns sérums.

Nous avons utilisé trois immuns-sérums de lapin : anti-sérum total de rat, anti-béta-lipoprotéines de rat, anti-alpha-lipoprotéines de rat.

Les immuns-sérums de lapin anti-béta-lipoprotéines et anti-alpha-lipoprotéines de rat sont préparées au laboratoire, par injection à un lapin de 500 gamma de lipoprotéines pures tous les trois jours pendant 1 mois. L'immun sérum peut être purifié par chromatographie sur DEAE cellulose.

C - Procédé de séparation et de purification des lipoprotéines du rat.

Le sang est prélevé à la carotide sur l'animal anesthésié à l'éther, grâce à un catheter hépariné.

1) Béta-lipoprotéines.

a) Séparation des bêta-lipoprotéines par précipitation.

Le mélange de sérums est dilué dans 1 volume de chlorure de magnésium à 5%, dans du tampon véronal 0,3 M, pH 8,6.

Ce mélange est ensuite centrifugé à 14.000 t/mn à +5°C pendant 10 minutes. Le culot est éliminé.

On ajoute au surnageant un volume de sulfate de dextrane 2% dans le tampon véronal, égal à la quantité de chlorure de magnésium utilisée précédemment. On laisse précipiter une nuit à +4°C.

On centrifuge à 14.000 t/mn à +5°C pendant 15 minutes.

Les bêta-lipoprotéines se trouvent alors dans le précipité, tandis que les alpha-lipoprotéines sont dans le surnageant.

b) Purification des bêta-lipoprotéines.

- Lavages :

On lave le précipité avec la solution précipitante, puis on centrifuge. On lave une seconde fois dans 1 volume de solution précipitante ; pour 1 volume de tampon véronal 0,15 M, pH 8,6. On centrifuge. On dissoud le précipité dans le tampon véronal 0,3 M, pH 7,3.

Afin d'éliminer l'excès de chlorure de magnésium, il faut dialyser la solution de bêta-lipoprotéines une première fois dans du chlorure de sodium à 0,9%, puis pendant 40 heures à +4°C dans du tampon phosphate 0,025 M, pH 6,5 avec agitateur magnétique.

- Chromatographie :

La colonne de DEAE étant conditionnée par le tampon phosphate 0,025 M, on dépose la solution de bêta-lipoprotéines dialysée sur la surface de DEAE ; lorsqu'elle est absorbée, on fait passer successivement du tampon phosphate 0,025 M puis 0,5 M, pH 6,5.

On recueille des fractions de 4 ml dont l'absorption est lue au spectrophotomètre à 280 m $\mu$

Les bêta-lipoprotéines blanches ou légèrement jaunâtres



sont éluées dans le tampon 0,5 M. Cette fraction 0,5 M est concentrée grâce à une dialyse sous dépression contre du chlorure de sodium 0,9%. Cette solution finale de bêta-lipoprotéines concentrée est conservée à +4°C (les températures inférieures au 0°C endommagent la lipoprotéine).

2) Alpha-lipoprotéine.

a) Séparation des alpha-lipoprotéines par ultracentrifugation.

Le surnageant recueilli après précipitation des bêta-lipoprotéines, contenant les alpha-lipoprotéines, est dialysé dans la solution d'ultracentrifugation de densité 1,21 et de pH 7,3 pendant 24 heures à +4°C avec agitation magnétique.

Au cours de cette dialyse une concentration a lieu, ce qui réduit à peu près à la moitié le volume initial et fait précipiter le sulfate de dextrane.

On centrifuge à 14.000 t/mn à +4°C, puis on élimine le culot de sulfate de dextrane.

On dialyse le surnageant de nouveau dans la solution d'ultracentrifugation pendant 24 heures.

On centrifuge à 65.000 t/mn à +4°C pendant 10 heures, puis on prélève la couche supérieure claire qui contient les alpha-lipoprotéines.

b) Purification de l'alpha-lipoprotéine.

- Dialyses :

La couche d'alpha-lipoprotéine est dialysée pendant 48 heures à +4°C dans du chlorure de sodium 0,9%.

Une seconde dialyse est faite dans du tampon 0,05 M, pH 6,5 pendant 24 heures.

- Chromatographie :

La colonne de DEAE étant conditionnée par le tampon phosphate 0,05 M, on dépose la solution d'alpha-lipoprotéines dialysée sur la surface de la DEAE ; lorsqu'elle est absorbée on fait passer successivement du tampon phosphate 0,05 M puis 0,2 M, pH 6,5.

On recueille des fractions de 4 ml dont l'absorption est lue au spectrophotomètre à 280 m. Les alpha-lipoprotéines jaunes sont éluées dans le tampon 0,2 M

- Gel filtration :

La fraction 0,2 M est concentrée par dialyse sous dépression contre du chlorure de sodium 0,9%, elle est passée sur deux colonnes de Spéhadex G 200 montées en série.

On recueille des fractions de 4 ml dont la courbe est directement enregistrée au spectrophotomètre.

Le premier pic contient l'alpha-lipoprotéine. Cette fraction dont on a éliminé les premiers tubes contenant un peu de bêta-lipoprotéines est concentrée grâce à une dialyse sous dépression contre du chlorure de sodium 0,9%. Cette solution finale d'alpha-lipoprotéines concentrées est conservée à -20°C.

D - Résultats.

1) Béta-lipoprotéines.

Lors de la chromatographie, la fraction éluée par le tampon 0,025 M contient des gamma-globulines.

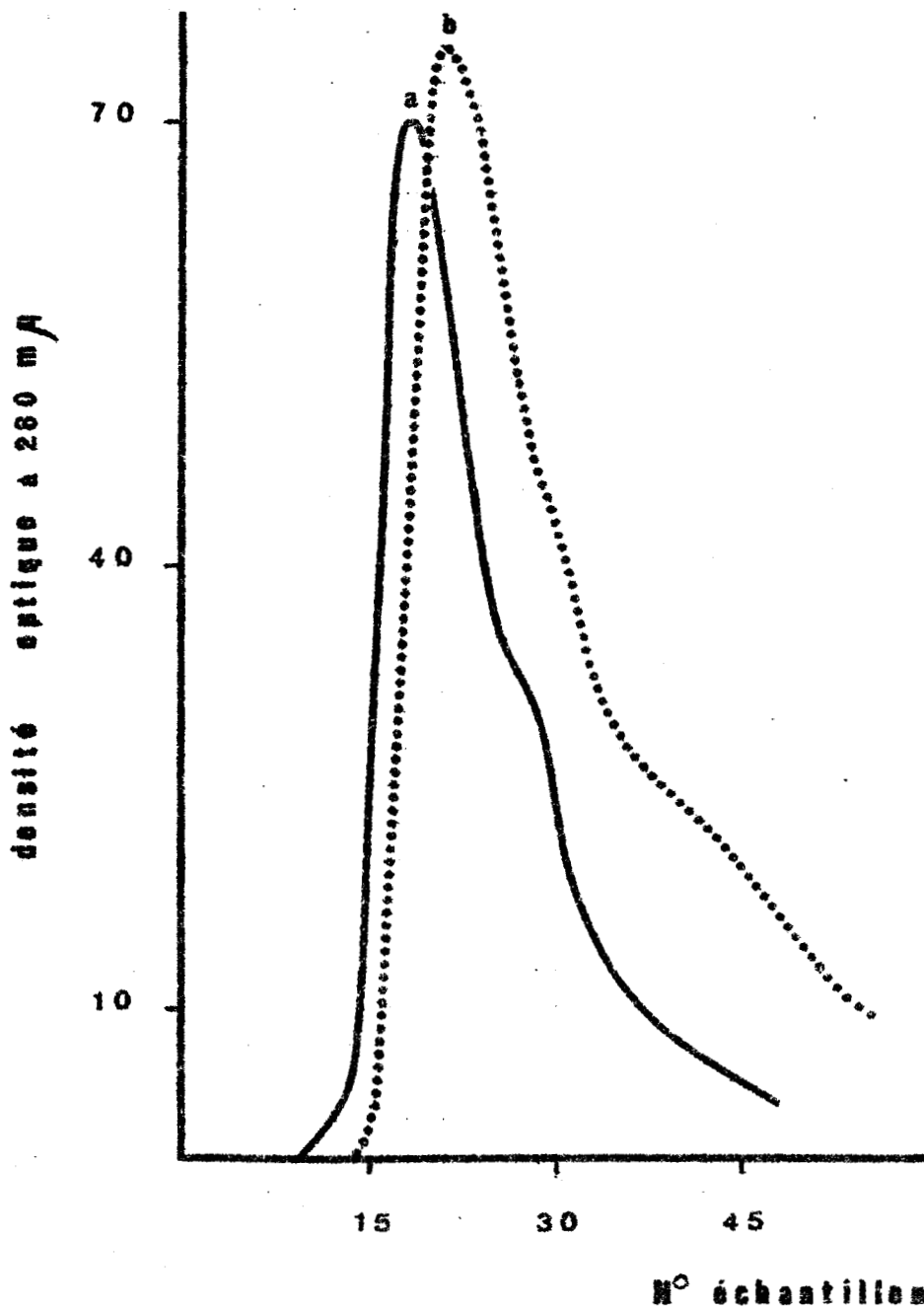
La fraction recueillie à 0,5 M, pH 6,5 renferme les béta-lipoprotéines avec des traces de gamma-globulines. Si l'on veut éliminer ces traces de gamma-globulines, on peut faire suivre la chromatographie sur DEAE cellulose d'une gel filtration sur Séphadex G 200, ce qui permet d'obtenir une solution de béta-lipoprotéines d'un haut degré de pureté, contenant peut-être des traces infimes de gamma-M-globulines. Les résultats sont reproductibles (fig. 3).

Les béta-lipoprotéines paraissent pures à l'immuno-électrophorèse sur agarose (photo. n°11) (16), à l'immuno-précipitation par double diffusion sur agarose (photo. n°12) (17), et à l'électrophorèse sur agarose (photo. n°13) (18).

Les solutions de béta-lipoprotéines ont une concentration de l'ordre de 2 mg/ml et ne contiennent plus de sulfate de dextrane.

La migration électrophorétique est normale, sans aucune précipitation au niveau du réservoir de départ, ce qui n'est pas le cas lorsque les béta-lipoprotéines sont instables ou dénaturées.

**Fig. 3 : PURIFICATION DE LA BETA-LIPOPORTEINE DE RAT**



Chromatographies sur DEAE-cellulose de la beta-lipoprotéine provenant de deux

mélanges de sérum de rat.

2) Alpha-lipoprotéines.

Lors de la chromatographie, la fraction éluée par le tampon 0,05 M contient les gamma-globulines.

La fraction recueillie à 0,2 M, pH 6,5 renferme les alpha-lipoprotéines avec une grande quantité d'albumine, des traces de bêta-lipoprotéines et de globulines. Les résultats sont reproductibles (fig. 4).

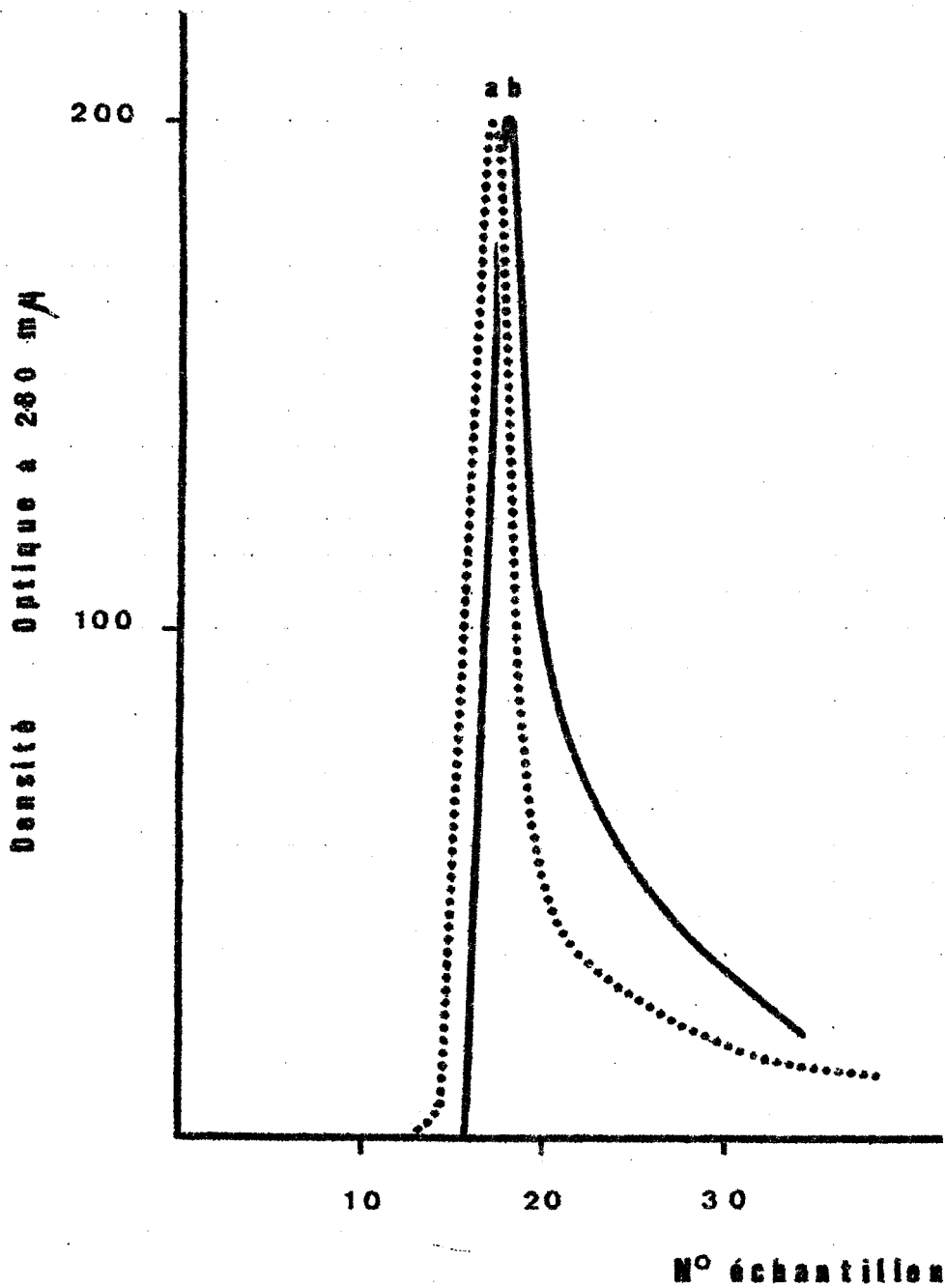
Il est nécessaire pour éliminer ces impuretés de faire suivre la chromatographie d'une gel filtration sur Séphadex G 200.

Nous obtenons deux pics (fig. 5). Le premier pic contenant l'alpha-lipoprotéine, présente un épaulement de bêta-lipoprotéines qu'il faut éliminer. Le deuxième pic contient l'albumine, il est bien séparé du pic d'alpha-lipoprotéines.

Les alpha-lipoprotéines paraissent pures à l'immuno-électrophorèse (photo. n°14), à l'immuno-précipitation par double diffusion sur agarose (photo. n°15) et à l'électrophorèse sur agarose (photo. n°13).

Ces solutions d'alpha-lipoprotéines ont une concentration de l'ordre de 6 mg/ml. La migration est normale, on observe parfois dans la fraction d'alpha-lipoprotéines une légère tache correspondant à une trace de bêta-lipoprotéines que l'on peut aisément écarter lors d'une seconde gel filtration.

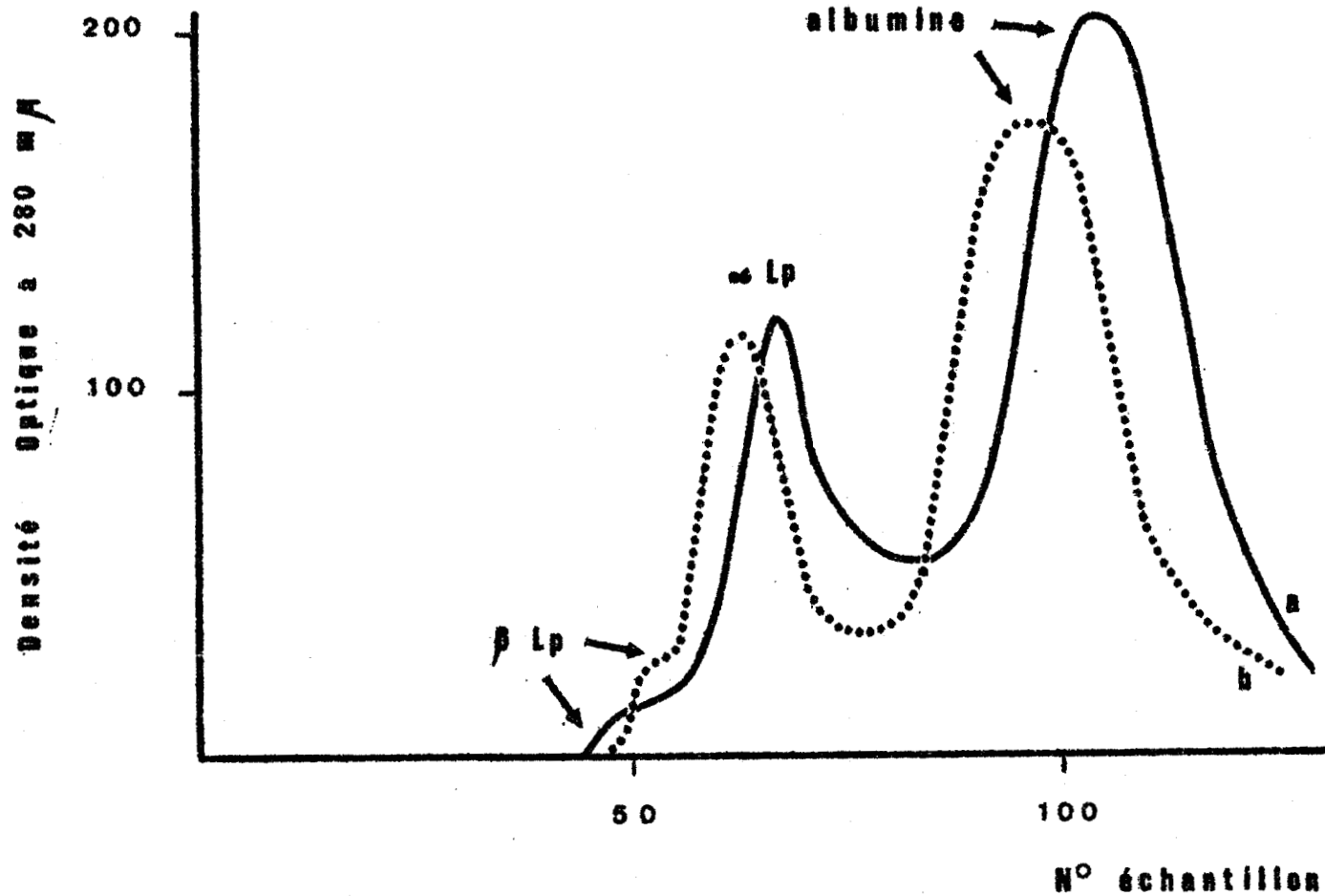
ig. 4 : PURIFICATION DE L'ALPHA-LIPOPORTEINE DE RAT



chromatographies sur DEAE-cellulose de l'alpha-lipoprotéine provenant de deux élanges de sérum a et b, éluée avec un tampon 0,2 M, pH 6,5.



Fig. 5 : PURIFICATION DE L'ALPHA-LIPOPROTEINE DE RAT



Dernière étape de la préparation de l'alpha-lipoprotéine de rat. Filtration sur Séphadex G 200 de la fraction éluée de la DEAE-cellulose avec un tampon 0,2 M, pH 6,5.





LEGENDE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie n° 11 :

Immuno-électrophorèse d'une préparation de bêta-lipoprotéines. En (a) : bêta-lipoprotéines obtenues après chromatographie sur DEAE ; en (b) : gamma-globulines séparées de la bêta-lipoprotéine ; en (c) : bêta-lipoprotéines après filtration sur gel de Séphadex ; en (y) : sérum de lapin anti-alpha-lipoprotéines de rat ; en (z) : sérum de lapin anti-bêta-lipoprotéines de rat. Coloration à l'amido-Schwartz.

Photographie n° 12 :

Immuno-précipitation par double diffusion sur agarose d'une préparation de bêta-lipoprotéines. En (a) : bêta-lipoprotéines obtenues après chromatographie sur DEAE ; en (y) : sérum de lapin anti-alpha-lipoprotéines de rat ; en (z) : sérum de lapin anti-bêta-lipoprotéines de rat. Coloration à l'amido-Schwartz.

Photographie n° 13 :

Electrophorèse sur agarose d'une préparation d'alpha et de bêta-lipoprotéines. En (d) et (e) : alpha-lipoprotéine provenant de deux pools de sérums différents, après gel filtration sur Séphadex ; en (a) et (c) : bêta-lipoprotéines provenant de deux pools de sérums différents, après chromatographie sur DEAE.

Photographie n° 14 :

Immuno-électrophorèse d'une préparation d'alpha-lipo-

protéines. En (d) et (e) : alpha-lipoprotéines provenant de deux pools de sérums après gel filtration sur Séphadex ; en (y) : sérum de lapin anti-alpha-lipoprotéines de rat ; en (z) : sérum de lapin anti-béata-lipoprotéines de rat.

Photographie n° 15 :

Immuno-précipitation par double diffusion sur agarose d'une préparation d'alpha-lipoprotéines. En (d) : alpha-lipoprotéines provenant de deux pools de sérums après gel filtration sur Séphadex ; en (y) : sérum de lapin anti-alpha-lipoprotéines de rat ; en (z) : sérum de lapin anti-béata-lipoprotéines de rat.

**E - Discussion.**

Cette technique diffère de celle qui est appliquée aux lipoprotéines de l'homme (14) par de nombreux points et plus particulièrement par :

a) La précipitation des bêta-lipoprotéines.

Chez l'homme, cette précipitation a lieu à pH acide (5,5) et le polysaccharide employé avec le chlorure de magnésium est l'héparine.

Chez le rat, l'héparine est employée avec le chlorure de magnésium ne permet pas une bonne précipitation des bêta-lipoprotéines, on observe seulement une légère floculation avec tendance à la flottation. Au contraire, avec le sulfate de dextrane de P.M 2.000 000, on obtient une très bonne précipitation à +4°C. En outre, chez le rat, des précipitations successives avec des mélanges sulfate de dextrane-chlorure de magnésium de pH variant entre 5 et 9 ont montré que plus le pH était alcalin plus la quantité de bêta-lipoprotéines précipitées était importante. Pour des raisons physiologiques, la solution précipitante à pH 8,6 a été choisie de préférence à pH 9.

b) L'ultracentrifugation.

La première des deux dialyses qui précède l'ultracentrifugation à  $D : 1,21$ , à  $65.000 \text{ t/mn}$  entraîne la précipitation du sulfate de dextrane restant après l'extraction des bêta-lipoprotéines. Contrairement au sérum humain, après ultracentrifugation, on n'observe pas de phase intermédiaire entre la couche supérieure prélevée et la partie inférieure.

c) Les chromatographies.

Chez l'homme, lors de la chromatographie sur DEAE, la bêta et l'alpha lipoprotéines sortent respectivement à des tampons  $0,15 \text{ M}$  et  $0,2 \text{ M}$ , tandis que chez le rat, la bêta sort à  $0,5 \text{ M}$ , l'alpha-lipoprotéine sortant quant à elle à un tampon  $0,2 \text{ M}$ .

On sait que chez le rat, il y a plus d'alpha que de bêta lipoprotéines. Le présent travail montre que les lipoprotéines du rat ont des caractéristiques physico-chimiques différentes de celles de l'homme. En outre, chez l'homme, la quantité de bêta-lipoprotéines est très nettement supérieure à celle des alpha-lipoprotéines.

La bonne qualité des lipoprotéines obtenues est prouvée non seulement par les propriétés de migration électrophorétique mais aussi par l'emploi que nous avons pu en faire en physio-

logie : étude de la demi-vie des bêta et des alpha lipoprotéines marquées in vitro ou in vivo au cholestérol 14 C-4.

## CHAPITRE II

### MARQUAGE ET DISTRIBUTION SANGUINE

#### DES LIPOPROTEINES ; DEMI-VIE

##### A - Introduction

La vitesse de renouvellement des protéines et des lipides plasmatiques a été étudiée à maintes reprises par des techniques isotopiques.

Plusieurs techniques sont utilisables pour estimer le renouvellement de ces molécules ; on peut administrer un précurseur permettant de suivre la radioactivité spécifique de chaque fraction au cours du temps, on peut aussi injecter une fraction marquée et étudier sa disparition (72). Cette deuxième méthode permet une interprétation plus aisée, mais on doit tenir compte des recyclages possibles de molécules ou de fragments de molécules.

La durée de vie des lipides des lipoprotéines varie beaucoup d'un lipide à l'autre ; chez l'homme, les acides gras libres ont une demi-vie très courte de quelques minutes (113), les triglycérides ont une demi-vie de quelques heures (114), quant aux phospholipides, leur demi-vie est de l'ordre

de trois jours (115, 116, 117, 118).

Le cas du cholestérol est plus complexe en raison des échanges rapides qui ont lieu avec les tissus (119, 120, 121), la demi-vie est d'une à dix semaines.

L'étude de la durée de vie des lipoprotéines proprement dite, a été moins poussée que celle de ses composants lipidiques, c'est-à-dire les acides gras, triglycérides, phospholipides et cholestérol. La plupart des chercheurs qui ont étudié la demi-vie des lipoprotéines ont incorporé préférentiellement, *in vitro* des isotopes de l'iode ou du soufre dans la partie protéique de la molécule (122, 123, 124, 125, 72, 126, 127, 129).

- Pour certains auteurs, la durée de vie de l'apoprotéine des bêta et des pré-bêta-lipoprotéines semble dépendre de leur densité.

Dans une série d'expériences où les bêta et les pré-bêta-lipoprotéines étaient marquées dans leur partie protéique par de l'I<sup>131</sup>, la demi-vie de l'apoprotéine variait de quelques heures pour les pré-bêta-lipoprotéines de densité 0,98 (123,124), à trois ou quatre jours pour les bêta-lipoprotéines de densité 1,03 (123, 93). Ces résultats sont confirmés par des expériences utilisant du S<sup>35</sup> (125).

- Pour d'autres auteurs, la demi-vie de l'apoprotéine des

béta-lipoprotéines sans distinction est de l'ordre de trois jours (122).

Quant à l'alpha-lipoprotéine, si pour certains auteurs sa demi-vie est d'un peu plus de quatre jours (122, 129, 93, 67) elle est d'une à deux semaines pour d'autres (126, 127).

La même expérience faite sur l'homme, le chien et la souris, a montré que la demi-vie des alpha-lipoprotéines marquées dans la partie protéique à l'I<sup>131</sup> variait d'une espèce à l'autre ; de quatre à cinq jours pour l'homme, de trois à quatre jours chez le chien, à douze heures chez la souris (67). Enfin dans le cas particulier d'absence congénitale de béta-lipoprotéines chez l'enfant, la demi-vie des béta et des alpha-lipoprotéines est égale, de l'ordre de 30 heures (128).

Moins nombreux sont les auteurs qui, pour des recherches similaires, ont cherché à marquer la partie lipidique des lipoprotéines in vitro avec un isotope du carbone par exemple (130, 131). Le marquage de la partie lipidique des lipoprotéines, et plus particulièrement du cholestérol ou des phospholipides, donne une demi-vie des béta-lipoprotéines de quelques heures (130) comme lors du marquage de la partie protéique (123, 124). Si on en juge d'après les expériences faites à partir du cholestérol ou des phospholipides, la partie lipidique des lipoprotéines présente un métabolisme "plus dynamique" que la partie protéique (131).



A notre connaissance, aujourd'hui, aucune publication n'est parue sur le marquage "in vivo" de la partie lipidique liée à la partie protéique de la molécule de lipoprotéine.

Nous avons étudié le marquage "in vivo" de l'alpha et de la bêta-lipoprotéines de rat afin de connaître la demi-vie de ces lipoprotéines marquées après injection intraveineuse chez le rat

(251).

B - Matériel et Méthodes.

1) Marquage des lipoprotéines sériques in vitro

a) Marquage de la bêta-lipoprotéine sérique avec le cholestérol 14 C-4.

Pour marquer une solution de 10 ml de bêta-lipoprotéines, ayant une concentration de 1 mg/ml, nous avons procédé de la façon suivante : mélanger 450 mg de célite et 45 microcuries de cholestérol 14 C-4 en solution dans 3 ml de toluène ; évaporer à 50°C. Quand la célite est refroidie, ajouter les 10 ml de la solution de bêta-lipoprotéines sériques et agiter doucement pendant trois heures à +4°C ; après plusieurs centrifugations, on sépare le surnageant et on fait les mesures suivantes :

- dosage protéine : 0,84 mg/ml
- radioactivité : 400 000 c.p.m./ml

soit une radioactivité de 476 000 coups par minute et par milligramme de protéines.

b) Marquage de l'alpha-lipoprotéine sérique avec le cholestérol 14 C-4.

Pour marquer une solution de 15 ml d'alpha-lipoprotéines, ayant une concentration de 1 mg/ml, nous avons procédé de la façon suivante : mélanger 2,5 g de célite et 10 ml de benzène

dans lesquels on a dissous 124 microcuries de cholestérol 14 C-4 ; évaporer à 50°C. Quand la célite est refroidie, ajouter les 15 ml de la solution d'alpha-lipoprotéines sériques, et agiter très doucement une heure toutes les trois heures, pendant une journée. Après plusieurs centrifugations, on sépare le surnageant et on fait les mesures suivantes :

- dosage protéine : 0,79 mg/ml

- radioactivité : 200 000 c.p.m./ml

soit une radioactivité de 253 000 coups par minute et par milligramme de protéines.

## 2) Marquage des lipoprotéines sériques in vivo

### a) Marquage de la bêta-lipoprotéine sérique avec le cholestérol 14 C-4

Les animaux sont nourris pendant 1 mois au régime ordinaire de laboratoire auquel on ajoute 200 g de saindoux contenant 0,5 millicuries de cholestérol 14 C-4 pour 10 kg d'aliment (radioactivité spécifique :  $12,5 \cdot 10^6$  c.p.m./g de cholestérol).

La teneur en cholestérol est de 0,07 g pour 100 g de régime. Les bêta-lipoprotéines sériques extraites et purifiées ont une radioactivité spécifique de 53.000 coups par minute et par milligramme de cholestérol. En employant cette technique, on ne peut marquer de façon satisfaisante les alpha-lipoprotéines sériques (900 c.p.m./mg de cholestérol).

b) Marquage de la bêta-lipoprotéine sérique avec l'acétate de sodium  $^{14}\text{C}$ -4 (C.E.A.), dont la pureté chimique a été contrôlée par titration acidimétrique et par chromatographie en phase gazeuse. La pureté radio-chimique a été contrôlée par radio-chromatographie en couche mince et par radio-chromatographie en phase vapeur. L'activité spécifique est de 90 mCi pour 82 mg.

Les animaux reçoivent 0,15 mCi d'acétate  $^{14}\text{C}$ -4 par voie intraveineuse dans la saphène. Vingt-quatre heures après cette injection, le sang est prélevé par cathétérisme de l'artère carotide.

Les bêta-lipoprotéines sériques extraites et purifiées ont une radioactivité de 4 500 c.p.m./ml, soit 45 000 coups par minute et par gramme de protéines.

c) Marquage de l'alpha-lipoprotéine sérique avec la  
L-Leucine  $^{14}\text{C}$ -4

Nous employons de la L-Leucine  $^{14}\text{C}$  en solution chlorhydrique 0,01 N provenant, comme le cholestérol  $^{14}\text{C}$ -4, du Commissariat à l'Energie Atomique (SACLAY).

Les animaux ont reçu tout d'abord 10 microcuries de L-Leucine  $^{14}\text{C}$  par voie intra-péritonéale ; quinze jours après, ils reçoivent 30 microcuries. Le lendemain, deux heures et demie avant le

sacrifice, chaque rat reçoit 80 microcuries de Leucine marquée. Les alpha-lipoprotéines sériques, extraites et purifiées ont une radioactivité de 52 000 c.p.m./ml, soit 3 250 000 coups par minute et par gramme de protéines.

d) Marquage de l'alpha-lipoprotéine sérique avec l'acétate de sodium 14-C-U

Les animaux reçoivent 0,15 mCi d'acétate 14 C-U par voie intraveineuse dans la saphène. Vingt-quatre heures après cette injection, le sang est prélevé par cathétérisme de l'artère carotide. Les alpha-lipoprotéines sériques extraites et purifiées ont une radioactivité de 25.000 c.p.m./ml, soit 30.000 coups par minute et par gramme de protéines.

3) Conduite à tenir

Nous avons injecté aux rats, par voie intraveineuse, 0,5 ml de la lipoprotéine sérique du rat, dont nous voulions mesurer la durée de vie.

Neuf rats ont reçu ainsi une injection de bêta-lipoprotéine sérique marquée in vitro, et 6 rats ont reçu de la bêta-lipoprotéine sérique marquée in vivo.

Douze rats ont reçu dans la saphène une injection d'alpha-lipoprotéine sérique marquée in vitro et 2 rats ont reçu de l'alpha-lipoprotéine sérique marquée in vivo.

Les échantillons sanguins (0,5 ml) sont prélevés aux temps suivants, après l'injection de la lipoprotéine :

- pour l'alpha-lipoprotéine : 5,25 minutes, et 5, 7, 8, 10, 13, 15, 17, 24, 48, 72, 80, 96, 114, 168, 192 heures.

- pour la bêta-lipoprotéine : 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 300 minutes.

Chacun des rats ne subira pas plus de six prélèvements durant la durée de l'expérimentation.

Chaque prélèvement de 0,5 ml de sang fait l'objet d'une extraction des lipides par le mélange méthylal/méthanol : 80/20. L'extrait lipidique est desséché dans un flacon de comptage. On ajoute 10 ml de liquide scintillant (0,5 g P.O.P.O.P. ; 5 g P.P.O ; 20 ml liquide fluor ; 1 litre de toluène), on compte dans un compteur à scintillation liquide Nucléar Chicago.

L'extraction des lipides n'est effectuée que si l'on a incorporé un isotope dans la partie lipidique de la molécule de lipoprotéine (cholestérol) ; dans les autres cas, il s'agit de la radioactivité sanguine totale.

C - Epuration des lipoprotéines sériques injectées dans le sang

1) Béta-lipoprotéines

Dans le tableau II, nous avons exprimé : le pourcentage de radioactivité des lipides sanguins à différents temps après l'injection de béta-lipoprotéine sérique, par rapport à la radioactivité des lipides sanguins lors du premier prélèvement à 15 minutes après l'injection de la lipoprotéine marquée. (Ce point de 15 minutes a donc pour chaque animal la valeur 100). Par ailleurs nous avons mesuré les teneurs en cholestérol correspondant aux différents prélèvements.

Nous remarquons que la décroissance radioactive est plus lente après l'injection des béta-lipoprotéines marquées "in vivo", qu'après celle des béta-lipoprotéines marquées "in vitro".

Les valeurs du tableau II représentées sur coordonnées semi-logarithmiques nous font découvrir pour chacune des béta-lipoprotéines une courbe composée de deux pentes (fig.6). La demi-vie de la première pente est de 22 minutes pour les béta-lipoprotéines marquées "in vitro". La seconde pente a une demi-vie de 545 minutes pour la béta-lipoprotéine marquée "in vivo" au cholestérol C-14, 450 minutes pour la béta-lipoprotéine marquée "in vivo" à l'acétate C-14, et de 139 minutes pour la béta-lipoprotéine marquée "in vitro". L'injection de béta-lipoprotéine n'agit pas de façon sensible sur les taux de cholestérol comme le montre le tableau II.

TABLEAU II

EPURATION DES BETA-LIPOPROTEINES

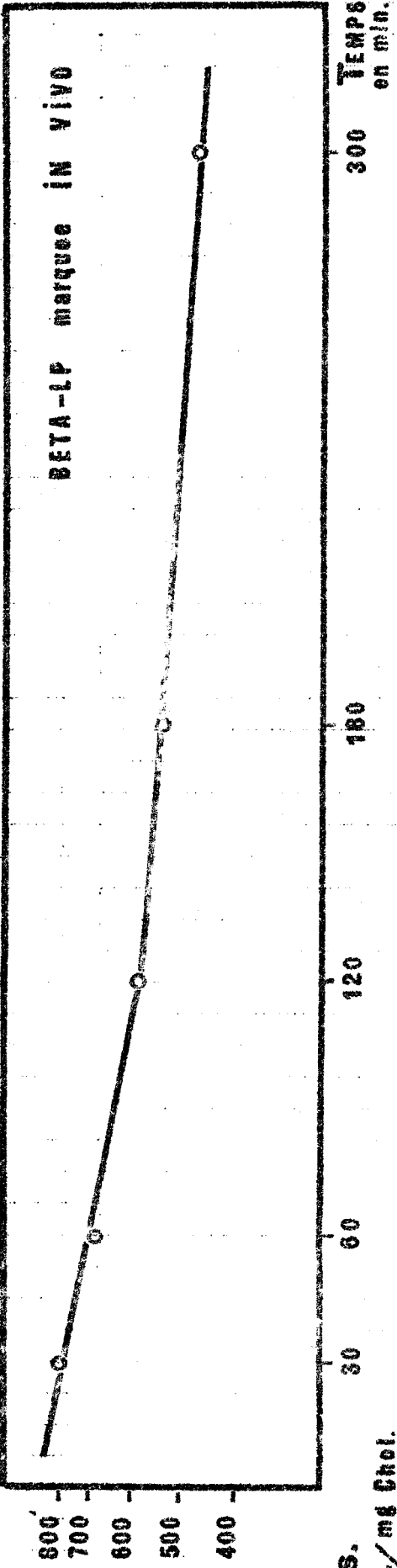
	30 mn	45 mn	60 mn	75 mn	90 mn	120 mn	150 mn	180 mn	300 mn
Radio-activité en %	71,7	57,2	51,2	40,5	37,9	34,7	26,8		
Injection de beta-Lp: au temps	± 2,58	± 2,81	± 2,61	± 1,49	± 1,47	± 1,95	± 1,24		
marquée 15 mn "in vitro"									
(9 rats)									
Cholestérol mg/ml de sang	0,74	0,81	0,88			0,88	0,77		
Injection de beta-Lp: marquée "in vivo"									
- avec le cholestérol: (6 rats)	79,5	69,7				59,0	53,8	47,0	
au temps	± 1,06	± 2,43				± 2,46	± 2,37		
- avec l'acétate: (1 rat)	78,8	67,3				61,7		46,1	



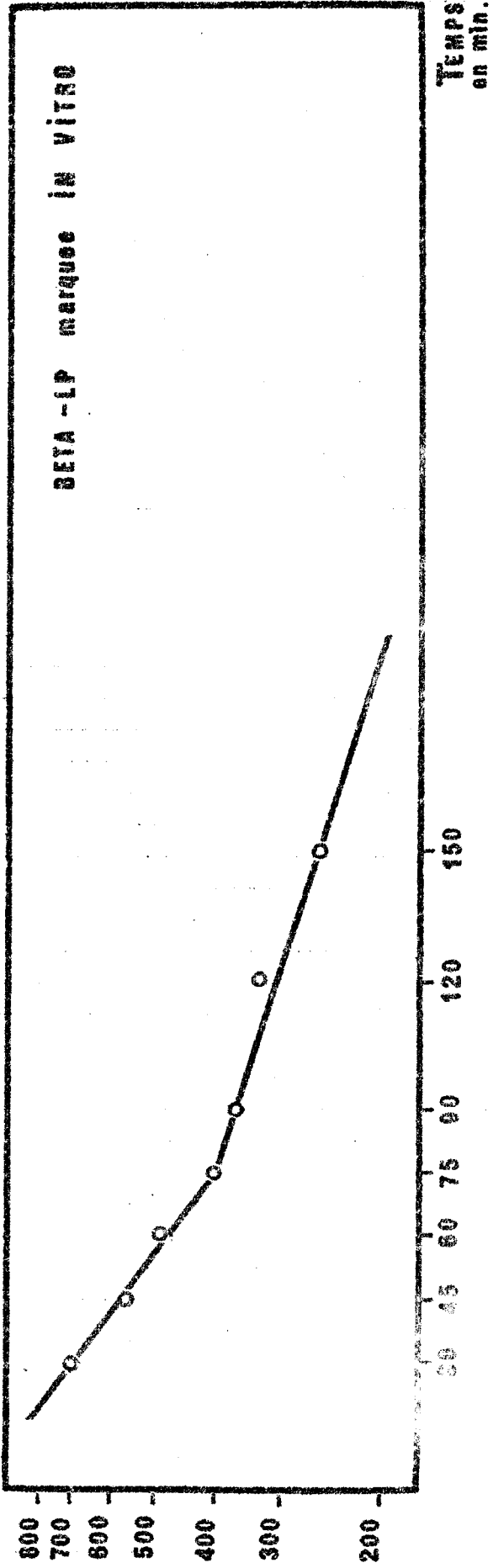


**Fig. 6 : EPURATION DES BETA-LIPOPROTEINES**

a.s.  
i.m./mg Cholesterol



a.s.  
i.m./mg Chol.



Evolution en fonction du temps, de la radio-activité sanguine après injection de beta-lipoprotéines marquées in vivo ou in vitro (Coordonnées semi-logarithmiques).



## 2) Alpha-lipoprotéines

Il était important de savoir si le cholestérol marqué introduit dans l'organisme avec l'alpha-lipoprotéine était ensuite transféré dans d'autres lipoprotéines sanguines. Pour cela, nous avons mesuré la radioactivité dans les alpha et les bêta-lipoprotéines sanguines des rats receveurs, 15 minutes et 20 heures après l'injection de l'alpha-lipoprotéine marquée "in vitro" au cholestérol C-14.

Le tableau III nous indique que 15 minutes après l'injection dans le sang d'alpha-lipoprotéine marquée in vitro au cholestérol C-14, nous retrouvons encore 90 p. 100 de la radioactivité dans l'alpha-lipoprotéine ; mais au bout de 20 heures, 64 p. 100 de la radioactivité sanguine se retrouve dans les bêta-lipoprotéines ainsi que dans les globulines.

Au contraire, en ce qui concerne l'alpha-lipoprotéine marquée "in vivo" avec de l'acétate C-14 (tableau X), on constate qu'après l'injection de cette lipoprotéine marquée, les taux de radioactivité dans les différentes molécules sériques restent inchangés au cours des onze jours qui suivent l'injection de l'alpha-lipoprotéine et qui correspondent à la demi-vie de cette lipoprotéine.

Onze jours après l'injection de l'alpha-lipoprotéine marquée "in vivo" à l'acétate C-14, on retrouve 76,7 p.100 de la radioactivité sérique dans les alpha-lipoprotéines ; 6,6 p.100 dans les bêta-

TABLEAU III

REPARTITION de la RADIO-ACTIVITE (R. A.) du CHOLESTEROL SANGUIN

15 MINUTES et 20 HEURES après l'INJECTION d'ALPHA-LIPOPROTEINE MARQUEE "IN VITRO"

AU CHOLESTEROL C<sup>14</sup>

	Alpha-lipoprotéine	Beta-lipoprotéine + globulines	Reste	
	Pourcentage de la R. A. totale	Pourcentage de la R. A. totale	de la R. A. totale	
	c.p.m. considéré	c.p.m. considéré	c.p.m. considéré	
Temps	1 620	161	19	1,1
de				
prélèvements	3 120	5 800	117	1,3
h				



TABEAU X

REPARTITION de la RADIO-ACTIVITE SERIQUE

7 HEURES, 3 JOURS et 11 JOURS après l'INJECTION d'ALPHA-LIPOPROTEINES

MARQUEES IN VIVO à l'ACETATE C<sup>14</sup>

	Alpha- lipoprotéines	Beta- lipoprotéines	Globulines	Albumine
7 h	76,7 %	5,3 %	13,3 %	4,7 %
3 jours	70,0 %	5,0 %	20,0 %	5,0 %
11 jours	76,7 %	6,6 %	16,7 %	0,0 %



lipoprotéines et 16,7 p.100 dans les globulines.

Sept heures et trois jours après l'injection d'alpha-lipoprotéine, les taux de radioactivités sériques sont très voisins de ceux observés au bout de onze jours avec 4 à 5 p.100 de radioactivité dans l'albumine.

Dans le tableau IV, nous avons exprimé la radioactivité des lipides contenus dans 1 ml de sang prélevé à différents temps après l'injection d'alpha-lipoprotéines marquées in vitro par le cholestérol 14 C-4. Dans le tableau V, nous avons exprimé la radioactivité d'1ml de sérum prélevé à différents temps après l'injection d'alpha-lipoprotéines marquées in vivo à la Leucine C-14. Les deux tableaux sont différents notamment dans la première phase succédant à l'injection d'alpha-lipoprotéine.

Dans le cas d'une injection d'alpha-lipoprotéine marquée in vitro dans sa partie lipidique, la courbe d'épuration de l'alpha-lipoprotéine est sujette à plusieurs fluctuations (tableau IV). La radioactivité qui est déjà faible 5 minutes après l'injection, continue cependant à décroître jusqu'à 25 minutes. A partir de ce moment, la radioactivité des lipides sanguins croît assez rapidement, pour arriver à 13 heures à son maximum. A ce moment là, la radioactivité est quatre fois plus grande qu'à 5 minutes. Par la suite, la radioactivité décroît assez rapidement jusqu'à 80 heures où elle redevient à peu près égale à ce qu'elle était cinq minutes après l'injection d'alpha-lipoprotéines. De 80 heures à 200 heures, la décroissance radioactive continue à se mani-

fester, mais d'une façon beaucoup plus lente.

La courbe d'épuration de l'alpha-lipoprotéine marquée "in vivo" dans sa partie protéique, est caractérisée uniquement par un phénomène de décroissance radioactive (tableau V). Cette décroissance de la radioactivité des lipides sanguins, très accentuée de 5 minutes à 48 heures après l'injection de l'alpha-lipoprotéine marquée, devient beaucoup plus progressive de 48 heures à 200 heures.

Ces deux courbes d'épuration concernant l'alpha-lipoprotéine marquée "in vivo" et "in vitro" après la treizième heure, représentées sur coordonnées semi-logarithmiques, nous montrent pour chacune des alpha-lipoprotéines, une courbe composée de deux pentes (fig. 7 et 7 bis). La demi-vie de la première pente est de 20 heures pour les alpha-lipoprotéines marquées "in vitro" et de 33 heures pour les alpha-lipoprotéines marquées "in vivo". La seconde pente a une demi-vie de 255 heures pour l'alpha-lipoprotéine marquée "in vitro", et de 260 heures pour l'alpha-lipoprotéine marquée "in vivo", soit onze jours environ.

TABLEAU IV

EXPIRATION de l'ALPHA-LIPOPROTEINE

Marquage in vitro au cholestérol C<sup>14</sup>

TEMPS de PRELEVEMENT après l'INJECTION d'ALPHA-LIPOPROTEINE

	5 mn	7 h	10 h	13 h	15 h	17 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h	168 h	192 h
Radio-actifs	576	439	1 127	1 364	1 530	1 485	1 370	1 254	801	535	382	350	325
d.p.m./mg chol.	±40,1	±18,1	±102,3	±81,6	±80,7	±59,2	±17,6	±9,3	±17,6	±20,8	±5,5		
(12 rats)													

° Moyenne

°° Intervalle de confiance



TABLEAU V

EPURATION de l'ALPHA-LIPOPROTEINE

Marquage in vivo à la leucine

		TEMPS DE PRELEVEMENT après l'INJECTION d'ALPHA-LIPOPROTEINE									
		5 min	25 min	5 h	8 h	24 h	48 h	80 h	144 h	168 h	192 h
Radio-											
activité											
c.p.m./	160	170	160	150	120	88	74	68	62	58	
ml sang											
(2 rats)											

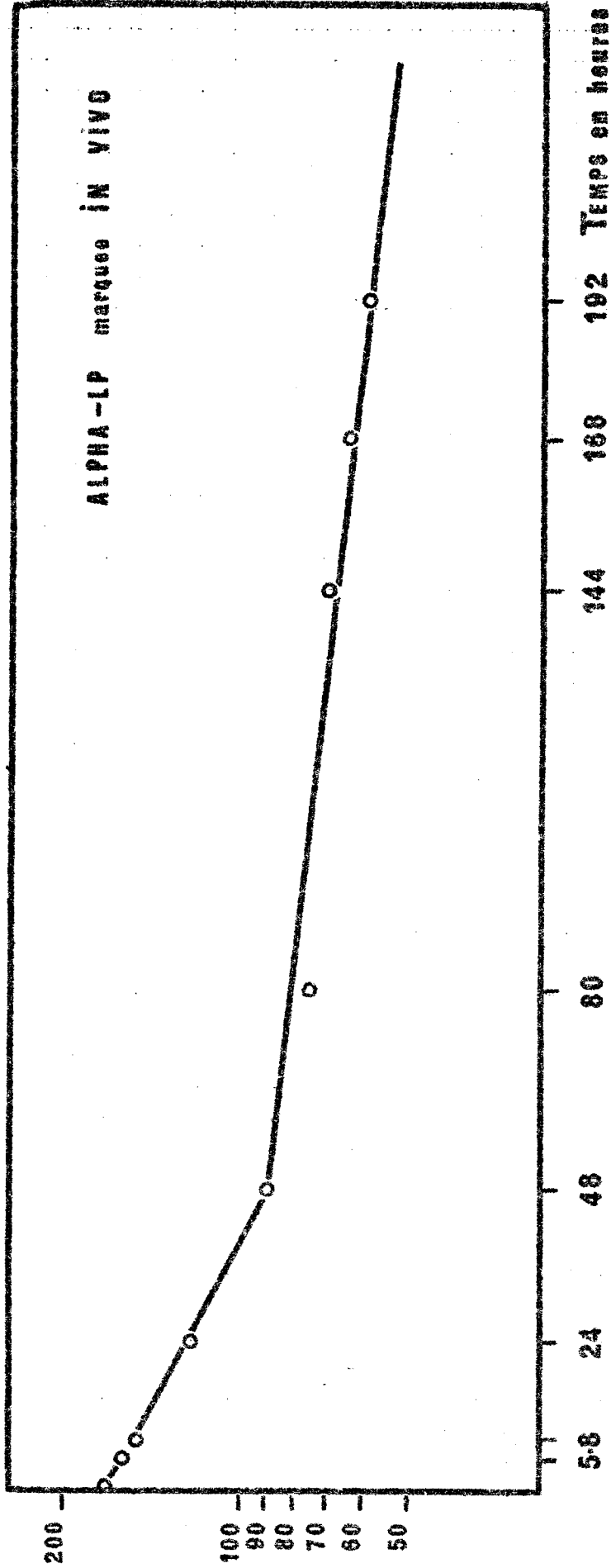




**Fig. 7 : EPURATION DES ALPHA-LIPOPROTEINES MARQUEES IN VIVO**

r.a.

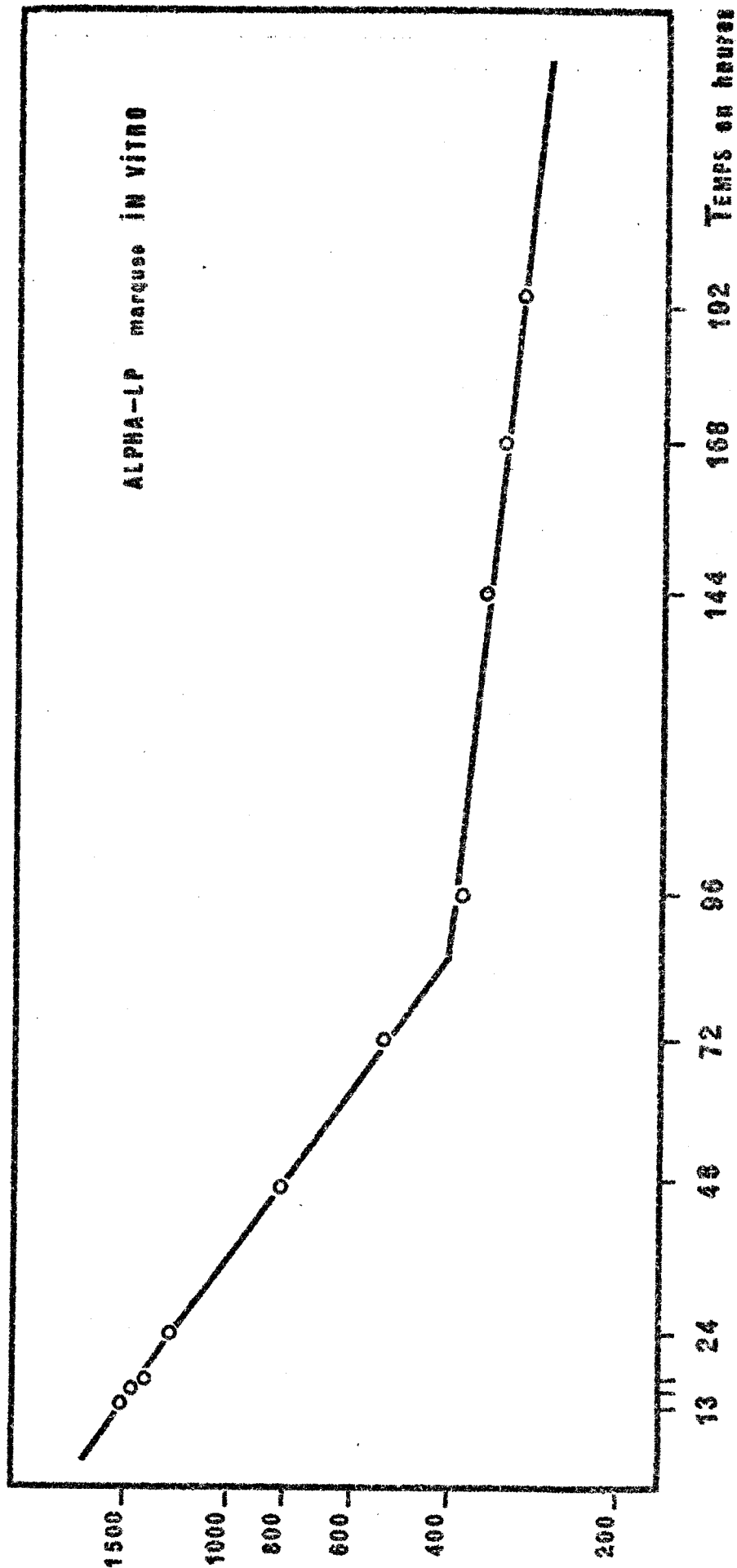
c.p.m./ml. sang



Evolution en fonction du temps de la radio-activité sanguine après injection d'alpha-lipoprotéines marquées in vivo (Coordonnées semi-logarithmiques).

**Fig. 7 bis : EPURATION DES ALPHA-LIPOPROTEINES MARQUEES IN VITRO**

**r.a.s.  
d.p.m./mg. Cholestesterol**



Evolution en fonction du temps de la radio-activité sanguine après injection d'alpha-lipoprotéines marquées in vitro (Coordonnées semi-logarithmiques).

D - Discussion

1) Bé̃ta-lipoproté̃ines :

L'étude de la demi-vie des bé̃ta-lipoproté̃ines marquées au cholestérol 14 C-4 met particulièrement l'accent sur l'importance des conditions de l'expérience en biologie et sur les conséquences que ces conditions peuvent avoir sur les résultats.

Nous sommes ici devant deux expériences dont l'approche a été faite de façon identique : même race de rats, même âge, etc.. et surtout une technique de séparation et de purification de la lipoproté̃ine étudiée qui est exactement la même d'une expérience à l'autre. Le fait que la bé̃ta-lipoproté̃ine isolée soit marquée "in vivo" ou "in vitro" dans sa partie lipidique suffit pour que la durée de vie de la bé̃ta-lipoproté̃ine soit sensiblement modifiée. Les expériences faites sur la durée de vie des bé̃ta-lipoproté̃ines "in vivo" nous donnent des demi-vies nettement supérieures à celles des bé̃ta-lipoproté̃ines marquées "in vitro" : un peu plus de 2 heures "in vitro", de 7 à 9 heures "in vivo" pour la demi-vie des bé̃ta-lipoproté̃ines, calculée sur la deuxième pente de la courbe d'épuration. La première pente de la courbe d'épuration des bé̃ta-lipoproté̃ines peut être la conséquence de plusieurs facteurs : elle peut correspondre à l'épuration accélérée d'une sous classe de bé̃ta-lipoproté̃ines

physiologique ou abimée, ou encore à la disparition de cholestérol non lié aux bêta-lipoprotéines, qui pourrait être accroché par exemple, à certaines impuretés.

On peut penser que les lipoprotéines marquées "in vitro" peuvent être plus ou moins altérées étant donné la longueur de la manipulation, mais ceci n'est pas prouvé par les analyses faites ici. Par ailleurs, il est de fait que les techniques de marquage "in vitro" sont nettement moins onéreuses ; on ne peut les rejeter à priori.

## 2) Alpha-lipoprotéines :

La première partie de la courbe d'épuration des alpha-lipoprotéines marquées in vitro a une allure complexe, comme le montre le tableau IV. Il faut dissocier la courbe en plusieurs tronçons :

- la décroissance radioactive de 0 à 25 minutes après l'injection correspond probablement à la fixation très rapide par le système réticulo-endothélial d'une majeure partie des alpha-lipoprotéines injectées.

- Nous pensons que l'augmentation de la radioactivité de 25 minutes à 13 heures correspond à une remise en circulation progressive du cholestérol  $^{14}C-4$  ainsi fixé, étant entendu que le noyau marqué de cette molécule ne peut être détruit

dans l'organisme.

- Cette remise en circulation du cholestérol 14 C-4 se fait en partie sous la forme d'alpha-lipoprotéines sériques, mais beaucoup plus sous la forme de bêta-lipoprotéines, qui 20 heures après l'injection de l'alpha-lipoprotéine, contiennent 60 p.100 de la radioactivité sanguine. Les connaissances actuelles dans la physiologie des lipoprotéines ne nous permettent pas d'exclure un mécanisme d'échange intra-vasculaire du cholestérol, entre les alpha et les bêta-lipoprotéines, cependant nous pouvons admettre que le cholestérol est fixé par le système réticulo-endothélial principalement au niveau des cellules de Kupffer, puis de là transporté dans les hépatocytes voisins et incorporé à ce niveau dans les lipoprotéines fabriquées dans les microsomes et les corps de Golgi. On peut remarquer ici la rapidité de ce processus.

Nous sommes donc là en présence d'une étape de synthèse des lipoprotéines. Cette phrase pourrait constituer un handicap dans l'étude ultérieure des facteurs qui agissent sur l'épuration des lipoprotéines sériques ; en réalité l'examen des courbes de radioactivité sanguine après la vingtième heure, nous montre que cette radioactivité décroît suivant deux pentes.

- La première qui est la plus rapide a une demi-vie de l'ordre de vingt heures et correspond probablement à l'épuration des

bêta-lipoprotéines.

- La deuxième pente, qui est beaucoup plus lente que la précédente, a une demi-vie légèrement inférieure à onze jours. Ce chiffre correspond bien aux données fournies par d'autres auteurs, il est identique à ceux obtenus en marquant la partie protéique de la molécule d'alpha-lipoprotéine.

Pour vérifier les résultats décrits ci-dessus, en évitant les causes d'erreurs dues aux transferts de cholestérol, il était indispensable de marquer la partie protéique de l'alpha-lipoprotéine, afin d'obtenir une courbe d'épuration moins sujette aux critiques.

Nous avons fait ce marquage avec de la leucine injectée par voie intra-péritonéale dans l'animal ; c'est donc un marquage "in vivo" des alpha-lipoprotéines. Ces lipoprotéines marquées in vivo sont injectées à l'animal et on constate :

- une première pente (demi-vie : 30 heures) correspondant probablement à l'épuration, soit d'une sous classe d'alpha-lipoprotéines, soit d'une impureté, ou peut être des deux.

- la deuxième pente, celle qui a une demi-vie de 260 heures (un peu moins de onze jours) correspond à l'épuration de l'alpha-lipoprotéine proprement dite.

La comparaison des résultats concernant l'épuration des alpha-lipoprotéines marquées in vivo ou in vitro nous permet de constater que la partie primitive, est très différente d'un marquage à l'autre ; mais la deuxième pente, celle qui semble bien représenter l'épuration de l'alpha-lipoprotéine proprement dite, est équivalente, quel que soit le marquage utilisé, puisque les demi-vies sont très voisines pour ne pas dire égales ; presque onze jours avec les lipoprotéines marquées "in vivo" ou "in vitro".

CHAPITRE III

ROLE DU SYSTEME RETICULO-ENDOTHELIAL  
SUR LE METABOLISME DES LIPIDES CIRCULANTS

I - ROLE D'AGENTS MODIFICATEURS DE L'ACTIVITE DU SYSTEME  
RETICULO-ENDOTHELIAL SUR LE RENOUVELLEMENT DU CHOLESTEROL.

A - Introduction

Dès 1881, RUTIMEYER (307) démontre qu'après une injection de sels de mercure dans l'organisme, on retrouve une partie de ces particules dans les cellules hépatiques, les cellules de Kupffer et dans la bile. Ces résultats sont confirmés en 1916 par MOLLENDORFF (297), puis en 1932 par WEATHERFORD (298) d'après des travaux portant sur l'injection de substances colloïdales.

C'est en 1924 (299) que le terme système réticulo-endothélial est introduit pour la première fois par ASCHOFF et en 1947 (300), la conception de blocage du système réticulo-endothélial avait déjà suscité l'attention de plusieurs chercheurs.

Actuellement, l'activité du système réticulo-endothélial



est déterminée dans la plupart des cas par une des méthodes suivantes (132) :

- Le "carbon clearance test" basé sur le fait que la défense non spécifique du corps est due essentiellement à l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial. Ce test est défini par une valeur "K" représentant le taux d'élimination du carbone dans le sang par les cellules réticulo-endothéliales (133, 134) ; il s'agit donc de l'estimation de l'activité des cellules réticulo-endothéliales "fixées".

- Le "cotton pellet granuloma assay" basé sur la réponse inflammatoire aux implants de coton (135, 136), où l'on mesure l'activité des cellules réticulo-endothéliales "libres". Cette technique consiste en l'implantation sous la peau de boulettes de coton de poids connu, puis à leur exérèse au cinquième jour ; la différence entre le poids initial et final de la boulette de coton séchée donne le poids sec de granulome (132).

Ces techniques ont permis de tester certaines substances, de classer les produits agissant sur le système réticulo-endothélial en agents stimulants ou bloquants du système réticulo-endothélial.

a) Agents stimulants du système réticulo-endothélial.

Un adjuvant, le Freund (*Mycobacterium butyricum*) (210, 211, 212, 213, 214, 215, 217, 218, 219, 220, 222, 223, 224, 225) ; des oestrogènes tels que le 17-bêta-oestradiol, l'oestrone, l'oestriol, l'éthinyl oestradiol, l'oestradiol monobenzoate (137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148) ; les agents infectieux comme le *staphylococcus albus* (166), le B.C.G. *mycobacterium bovis*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, d'une façon générale toutes les endotoxines (226, 227, 228) ; certains lipides (168, 169, 170, 171, 172, 173, 174) et plus particulièrement les lécithines (167), lysolécithine et phosphatide peptide ; l'huile d'olive et certains triglycérides (trioléine, tricaprine, tripalmitine, tristéarine, 2-oléodistéarine) (175, 176, 177) ; la lignine (179, 180), le trianisylchloroéthylène (175), les extraits d'amidon, la chlorophylle (175). Toutes ces substances injectées chez l'animal permettent une augmentation du poids de granulome sec dans l'implant de coton, et une diminution de la valeur K, correspondant à l'accélération du phénomène d'élimination du carbone dans le sang due à l'activation du système réticulo-endothélial.

b) Agents dépressifs du système réticulo-endothélial.

Le carbone colloïdal (186, 187, 188, 190, 191, 192,

193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209) ; le calcium (181, 182, 183, 184, 185) ; les esters alcools (éthyl palmitate, éthyl stéarate, éthyl oléate, cholestérol oléate) (175, 178) ; les corticoïdes, la prednisone, l'hydrocortisone, la cortisone à haute dose (133, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161), signalons que la cortisone à très petite dose a un effet légèrement stimulant (133, 151, 162, 163) ; la testostérone à haute dose à un effet dépressif sur le système réticulo-endothélial, alors que son action est nulle à petite dose (164, 165). Avec ces produits, on observe moins de granulomes dans les implants de coton chez les animaux traités, l'élimination du carbone est ralentie par rapport aux témoins.

Parmi toutes ces substances nous en avons sélectionné quelques unes, actives sur le système réticulo-endothélial dans un sens ou dans l'autre.

Nous avons étudié l'incidence qu'elles pouvaient avoir sur le renouvellement du cholestérol et sur celui des lipoprotéines.

La première expérience que nous décrivons ici, consiste à réaliser chez le rat un état d'équilibre isotopique (248, 249) par administration quotidienne d'une dose constante de cholestérol 14 C-4 dans l'alimentation. Lorsque la radioacti-

tivité spécifique du cholestérol sérique est constante, nous administrons aux animaux un agent modificateur de l'activité du système réticulo-endothélial. Nous avons suivi l'évolution de la radioactivité spécifique du cholestérol sérique soit en poursuivant l'apport alimentaire de cholestérol radioactif, soit en interrompant cet apport. (314).

B - Matériel et méthodes

a) Incorporation du cholestérol 14 C-4 dans l'organisme.

Les rats sont des mâles de race Sprague-Dawley élevés dans notre laboratoire. Ils pèsent environ 300 grammes au début de l'expérience.

Ces animaux sont nourris au régime ordinaire de laboratoire contenant 15 microcuries de cholestérol 14-C pour 25 kilogrammes d'aliment complet (radioactivité spécifique :  $10^6$  d.p.m./g de cholestérol). La teneur du régime en cholestérol est de 0,07 g pour 100 grammes d'aliment. Les rats sont nourris à ce régime pendant cinq semaines, période à partir de laquelle la radioactivité du cholestérol sérique est stationnaire.

b) Injections et prélèvements.

- Les injections et prélèvements sont effectués sous anesthésie générale à l'éther.

- Le carbone colloïdal est injecté par voie intraveineuse dans la saphène. On injecte 2 ml de carbone colloïdal à la fois. La préparation de 50 ml de carbone colloïdal se fait de la façon suivante : faire évaporer à sec 10 ml d'encre

de chine. Laver deux fois avec de l'eau distillée et évaporer, reprendre le carbone sec dans 50 ml de chlorure de sodium 9 p 1000.

- L'adjuvant complet de Freund est injecté par voie intra-musculaire dans la face postérieure de la cuisse, à raison de 0,5 ml par injection. Le Freund est composé de 5 mg de mycobactérium butyricum dans 1,5 ml d'Arlacel A (mannide-monoléate) et 8,5 ml de Bayol F (huile de paraffine).

- Les prélèvements de 1,0 ml de sang se font dans la veine jugulaire, à travers le muscle pectoral (308).

c) Mesure de la radioactivité spécifique du cholestérol sanguin.

Les lipides totaux du sang sont extraits par le mélange méthylal/méthanol : 80/20 ; la radioactivité de ces lipides après l'évaporation du méthylal/méthanol est mesurée dans un compteur à scintillation liquide Nuclear Chicago, après addition de 10 ml de liquide scintillant. La solution de liquide scintillant est composée de 1 litre de toluène Merck, avec 0,5 g de phényloxazolyl benzène (P.O.P.O.P), 5 g de diphényl oxazole (P.P.O) et 20 ml de Liquifluor. Le cholestérol est dosé suivant la méthode de Assous et Girard, au perchlorure de fer (309).

d) Méthodes statistiques (315).

Nous avons employé le test t de Student pour la méthode de comparaison de deux moyennes (petits échantillons).

e) Conduite des expériences.

Trente rats sont mis au régime marqué pendant cinq semaines ; à ce stade correspondant à l'équilibre isotopique, l'expérience se divise en deux parties :

- Expérience I : Quinze rats poursuivent le régime marqué et sont divisés en trois lots : un lot témoin (5 rats) ; un lot Freund (5 rats) et un lot de carbone (5 rats).

- Expérience II : Après cinq semaines de nourriture marquée, les quinze autres rats sont mis au régime de laboratoire ordinaire, non radioactif, et sont divisés en trois lots : un lot témoin (5 rats) ; un lot Freund (5 rats) et un lot carbone (5 rats).

Au bout de la cinquième semaine de régime radioactif, au moment où les rats de l'expérience II sont mis au régime ordinaire, les deux lots "Freund" et les deux lots "carbone" de l'expérience I et II reçoivent respectivement leur première injection de Freund (0,5 ml) et de carbone colloïdal (2 ml).

Ces injections se renouvelleront tous les trois jours, pendant dix huit jours. Les prélèvements sanguins des lots témoins, Freund et carbone de l'expérience I et II ont lieu les premier, quatrième, septième, douzième et dix huitième jours après la première série d'injections de Freund et de carbone.



C - Résultats

1) Etude de l'incorporation des particules de carbone dans le système réticulo-endothélial .

Les particules de carbone colloïdal injectées par voie intraveineuse dans l'organisme se trouvent très rapidement incorporées dans les cellules du système réticulo-endothélial.

L'animal que nous étudions ici a reçu cinq injections de 2 ml de carbone colloïdal. L'autopsie de cet animal après son sacrifice nous révèle très visiblement que le foie, la rate, les ganglions lymphatiques, le poumon et les surrénales sont remplis de carbone. L'étude macroscopique montre que ces particules de carbone sont incorporées dans ces organes à l'intérieur des cellules.

La photographie n°1 représente une vue d'ensemble de l'animal après son sacrifice.

La photographie n°2 nous montre que le foie, la rate et les ganglions lymphatiques sont d'une couleur noire aussi foncée que l'encre de chine. Ces trois organes sont les foyers principaux du système réticulo-endothélial. La surrénale grise est plus foncée que chez les témoins ; le rein a une couleur normale.

La photographie n°3 nous montre que les poumons sont tachetés de petits points noirs correspondant à des agrégats de particules de carbone visibles sans grossissement ; le coeur a une couleur normale.

Les photographies qui suivent représentant des coupes de foie, rate, ganglions lymphatiques, poumons, surrénales et reins. Ces organes ont été fixés au liquide de Bouin et inclus dans la paraffine. Nous avons procédé à des coupes de cinq microns sur microtome Sartorius, qui ont été colorées par Hémalum éosine safran.

La photographie n°4 au microscope (x 45) nous montre dans le foie une répartition uniforme et très intense de particules de carbone. Sous ce faible grossissement les coupes de rate et de ganglions lymphatiques ont un aspect très voisin.

La photographie n°5 (x 720) représente une coupe de foie. Il s'agit d'un infiltrat massif de carbone au niveau des cellules de Kupffer. Nous voyons sous ce fort grossissement que les particules de carbone forment de nombreux agrégats qui prennent des proportions très importantes.

La photographie n°6 (x 720) représente une coupe de rate. Nous observons un infiltrat massif de particules de carbone, au niveau de la pulpe rouge. Ces nombreuses par-

ticules intracytoplasmiques sont phagocytées par les cellules de la paroi des capillaires.

La photographie n°7 (x 720) représente une coupe de ganglions lymphatiques. Nous remarquons que l'infiltrat important de particules de carbone est intracellulaire. Comme pour le foie et la rate, la concentration est tellement importante que la structure cellulaire en est masquée.

La photographie n°8 (x 720) représente une coupe de poumon. Les foyers de carbone sont situés dans les veinules pulmonaires, dans les monocytes sanguins et dans les espaces extracellulaires des cellules de la paroi alvéolaire.

La photographie n°9 (x 720) représente une coupe de surrénale. De petits foyers de particules de carbone sont visibles uniquement dans la cortico-surrénale, ces particules se trouvent dans les cellules conjonctives entre les cellules corticales.

La photographie n°10 (x 720) représente une coupe de rein. Quelques particules de carbone se trouvent dans les macrophages sanguins entre les tubes contournés du rein, d'une façon intracytoplasmique au niveau du glomérule. Aucune particule ne se trouve dans le tube rénal, confirmant les résultats biologiques, à savoir que le rat garde la totalité du carbone injecté dans le sang.

Les coupes de myocarde, intestin, aorte, ne révèlent pas la moindre trace de ces particules de carbone.

## 2) Expérience I

Les animaux sont soumis à un régime marqué, d'une façon continue durant toute la durée de l'expérience (tableau I).

Le traitement par les agents modificateurs du système réticulo-endothélial n'a lieu que lorsque la radioactivité spécifique sérique est stable.

Avant le début du traitement les animaux non traités des lots "Freund" et "Carbone" peuvent être considérés comme des témoins

Les animaux qui ont reçu une seule injection de Freund (agent stimulant l'activité du système réticulo-endothélial) présentent trente heures après, une diminution de la radioactivité spécifique du cholestérol sanguin qui est de l'ordre de 20 p.100. Cette diminution qui n'est pas statistiquement significative ne peut être accentuée par la simple augmentation de la dose ou de la fréquence des injections.

Les rats qui ont reçu une seule injection de carbone (agent bloquant du système réticulo-endothélial) nous montrent que la radioactivité spécifique du cholestérol sanguin est

TABEAU I

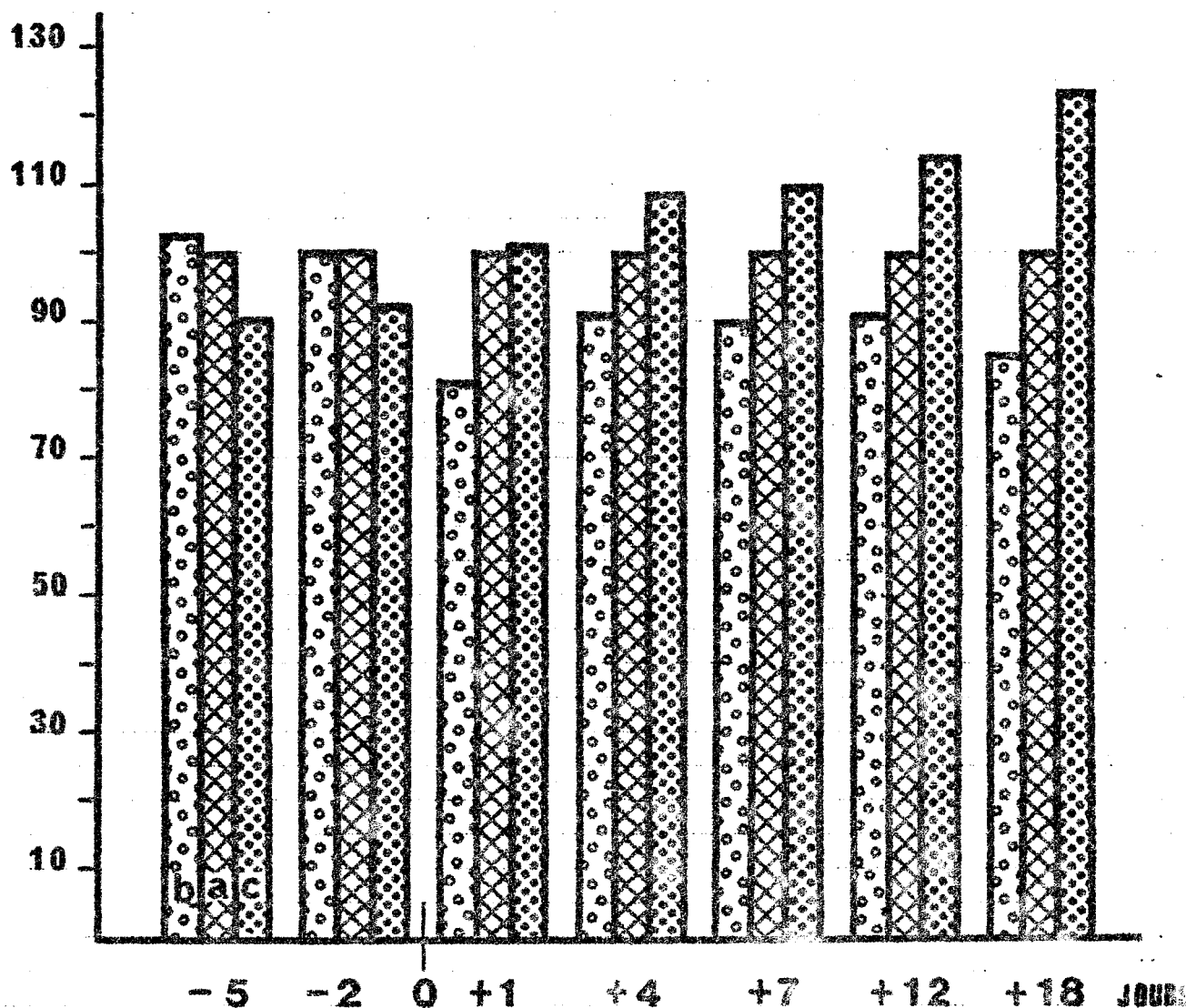
EXPERIENCE I : Radio-activité spécifique (R.A.S.) du cholestérol sérique chez des rats  
nourris au régime marqué et traités au Freund ou au carbone

	Non traités	Jours après le début du traitement			
		1	4	7	12
Freund					
R.A.S. du sang	4 498	3 627	4 047	3 893	3 956
cpm/mg cholestérol	± 205	± 226	± 448	± 334	± 218
(5 rats)					
Cholestérol sérique (mg/ml)	1,15	1,35	1,05	1,10	1,20
	± 0,03	± 0,03	± 0,08	± 0,09	± 0,06
Témoins					
R.A.S. du sang	4 498	4 441	4 369	4 307	4 347
cpm/mg cholestérol	± 205	± 525	± 458	± 409	± 330
(5 rats)					
Cholestérol sérique (mg/ml)	1,15	1,20	1,05	1,15	1,10
	± 0,03	± 0,09	± 0,03	± 0,12	± 0,06
Carbone					
R.A.S. du sang	4 498	4 511	4 708	4 707	4 952
cpm/mg cholestérol	± 205	± 870	± 320	± 441	± 186
(5 rats)					
Cholestérol sérique (mg/ml)	1,15	1,39	1,00	1,05	1,10
	± 0,03	± 0,19	± 0,06	± 0,07	± 0,06
Comparaison des R.A.S. test t (Student) = Freund/carbone		0,98	1,20	1,53	3,47
					P < 0,01; P = 0,001



**Fig. 1 : RÔLE DE DEUX AGENTS MODIFICATEURS DE L'ACTIVITÉ DU SYSTÈME RÉTICULO-  
 ENDOTHELIAL SUR LA RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DU CHOLESTÉROL SÉRIQUE CHEZ  
 DES RATS NOURRIS AU RÉGIME MARQUE**

r.a.s.



Chaque histogramme représente le pourcentage de la R.A.S. du cholestérol sanguin des rats traités au Freund (b) ou au carbone (c) par rapport à la R.A.S. des témoins (a) ramenée à 100. Le temps 0 correspond à la première injection de Freund ou de carbone.



identique à celle des témoins. Néanmoins, dès la seconde injection de carbone, la radioactivité spécifique augmente de façon progressive, pour être à dix huit jours supérieure de 23 p.100 à celle des témoins ; cette augmentation est statistiquement significative. Ces différences sont mises en valeur dans la figure 1 qui représente à différents temps la radioactivité spécifique du cholestérol sanguin des rats traités par un agent modificateur de l'activité du système réticulo-endothélial, par rapport à la radioactivité spécifique des témoins.

Les différences de radioactivité entre les lots carbone et Freund sont très significatives à partir du douzième jour.

Les différences entre le lot Freund et le lot témoin ne sont pas significatives, elles atteignent pourtant 20 p.100 dès le premier jour (le nombre d'échantillons est petit).

Les différences entre le lot carbone et le lot témoin sont seulement significatives pour le dix huitième jour de prélèvement ( $p = 0,05$ ).

### 3) Expérience II

Les animaux sont mis au régime non radioactif au moment de la première injection d'agent modificateur du système

réticulo-endothélial.

Le tableau I bis nous montre que, chez les témoins, une interruption de l'apport en cholestérol 14 C-4 pendant trente heures, a pour conséquence une diminution de la radioactivité spécifique du sang de 50 p.100 ; cette diminution atteindra 90 p.100 au bout de dix huit jours.

Les animaux traités au Freund (agent stimulant l'activité du système réticulo-endothélial) présentent dès le premier jour une radioactivité spécifique du cholestérol sanguin qui est de 20 p.100 inférieure à celle des témoins. Cette différence n'est pas significative.

Par contre au bout de dix huit jours, la décroissance radioactive est la même, qu'il s'agisse de témoins ou de rats traités au Freund.

Les animaux traités au carbone (agent bloquant l'activité du système réticulo-endothélial) présentent, un jour après cette injection, une radioactivité spécifique sanguine identique à celle des témoins. Au bout de douze jours, la radioactivité spécifique du cholestérol sanguin est supérieure de 45 p.100 à celle des témoins. Cette différence atteindra 77 p.100 au bout de dix huit jours. Ces différences statistiquement très significatives sont mises en valeur dans la figure 2.

Les différences de radioactivité spécifique entre les



lots Freund et Carbone sont significatives dès le quatrième jour, hautement significatives au douzième jour.

Les différences entre le lot Freund et le lot témoin ne sont pas significatives. Elles atteignent pourtant 20 p.100 dès le premier jour (le nombre d'échantillons est petit)

Les différences entre le lot carbone et le lot témoin sont hautement significatives aux douzième et dix huitième jours de prélèvement (p 0,01).

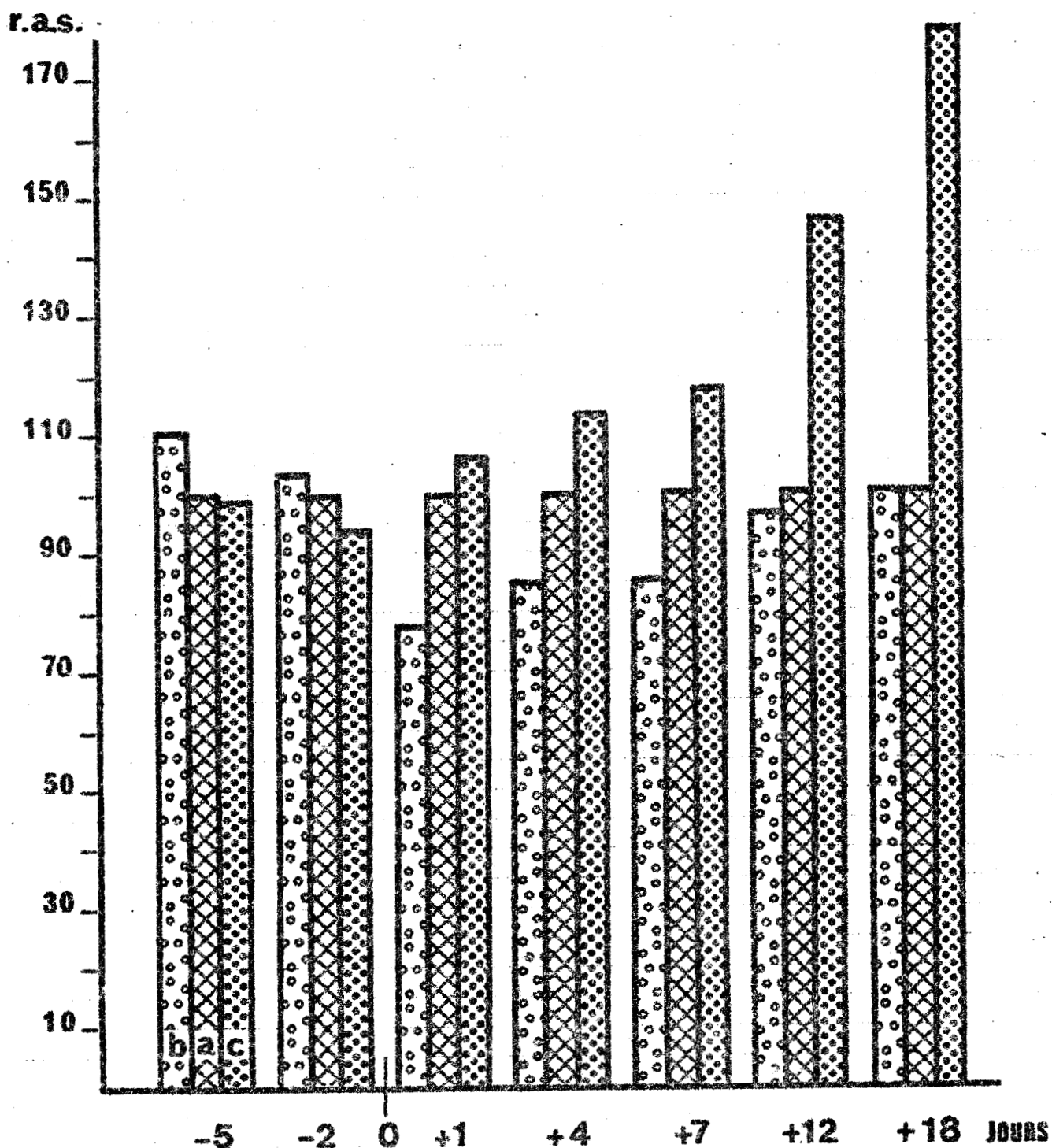
TABLEAU I bis

EXPERIENCE II : Radio-activité spécifique (R.A.S.) du cholestérol sérique des rats  
 traités au Freund ou au carbone après arrêt du régime marqué

	Non traités	1	4	7	12	18	
	Jours après le début du traitement						
Freund	R.A.S. du sang cpm/mg cholestérol	4 977 ± 150	2 108 ± 193	2 043 ± 130	1 430 ± 128	834 ± 54	527 ± 46
(5 rats)	Cholestérol sérique (mg/ml)	1,05 ± 0,03	1,50 ± 0,06	1,15 ± 0,16	1,25 ± 0,16	1,40 ± 0,16	1,35 ± 0,17
Témoins	R.A.S. du sang cpm/mg cholestérol	4 977 ± 150	2 634 ± 318	2 387 ± 185	1 662 ± 169	866 ± 94	524 ± 64
(5 rats)	Cholestérol sérique (mg/ml)	1,05 ± 0,03	1,00 ± 0,04	0,95 ± 0,04	0,90 ± 0,04	1,20 ± 0,09	1,15 ± 0,05
Carbone	R.A.S. du sang cpm/mg cholestérol	4 977 ± 150	2 739 ± 336	2 690 ± 248	1 961 ± 12	1 268 ± 21	931 ± 100
(5 rats)	Cholestérol sérique (mg/ml)	1,05 ± 0,03	1,10 ± 0,10	0,95 ± 0,04	1,00 ± 0,04	1,05 ± 0,04	1,05 ± 0,06
Comparaison des R.A.S. test t (Student) =							3,67
Freund/carbone							7,49
							$P < 0,05$ ; $P < 0,02$ ; $P < 0,01$ ; $P < 0,01$



**Fig. 2 : RÔLE DE DEUX AGENTS MODIFICATEURS DE L'ACTIVITÉ DU SYSTÈME RÉTICULO-  
 ENDOTHELIAL SUR LA RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DU CHOLESTÉROL SÉRIQUE CHEZ  
 DES RATS APRES ARRÊT DU RÉGIME MARQUE**



Chaque histogramme représente le pourcentage de la R.A.S. du cholestérol sanguin des rats traités au Freund (b) ou au carbone (c) par rapport à la R.A.S. des témoins (a) ramenée à 100. Le temps 0 correspond à la première injection de Freund ou de carbone.

D - Discussion

Rôle de deux agents modificateurs de l'activité du système réticulo-endothélial sur la radioactivité spécifique du cholestérol sérique.

Les expériences ci-dessus montrent chez des rats normaux, nourris à un régime de laboratoire ordinaire apportant du cholestérol radioactif, que la stimulation et la dépression du système réticulo-endothélial déterminent des modifications de la radioactivité spécifique du cholestérol sérique : augmentation progressive de la radioactivité spécifique du cholestérol sérique lorsque le système réticulo-endothélial est bloqué par le carbone ; diminution de cette radioactivité lorsque le système réticulo-endothélial est stimulé par le Freund.

On sait que le carbone a une action purement mécanique saturant les cellules réticulo-endothéliales et gênant de ce fait leur activité phagocytaire. Ce phénomène est confirmé par la progression de la radioactivité au fur et à mesure que l'on accentue la saturation des cellules réticulo-endothéliales. Il est difficile d'imaginer un autre mécanisme que celui du blocage du système réticulo-endothélial pour expliquer l'augmentation de la radioactivité du cholestérol. Il ne

peut s'agir ni d'une augmentation de l'apport de cholestérol radioactif chez cet animal dont le régime n'a pas varié, ni d'une baisse de la synthèse hépatique du cholestérol comme pourrait le suggérer la diminution de la pente de radioactivité après arrêt du régime marqué ; en effet une action directe du carbone sur les hépatocytes est exclue comme l'ont montré les études histologiques, puisque le carbone reste fixé dans les cellules de Kupffer.

Inversement, on imagine mal par quel mécanisme autre que celui de la stimulation des cellules réticulo-endothéliales l'adjuvant de Freund pourrait accentuer le renouvellement du cholestérol sérique. On est donc amené à suggérer que, dans les conditions expérimentales réalisées ici, le système réticulo-endothélial intervient dans le métabolisme des lipoprotéines sériques au stade de leur fixation et de leur utilisation par les tissus.

Plusieurs études ont déjà montré que des cellules réticulo-endothéliales pouvaient capter les lipides ou la partie lipidique des lipoprotéines. On sait d'autre part que les cellules de Kupffer captent le cholestérol alimentaire dans le sang. Il est donc probable que les lipides sanguins et les lipoprotéines soient captés par certains éléments du système réticulo-endothélial.

Nos résultats montrent que dans ces conditions expérimentales, une modification de l'activité du système réticulo-endothélial retentit sur le renouvellement du cholestérol sérique. On peut formuler l'hypothèse que le système réticulo-endothélial intervient dans le renouvellement des lipoprotéines

## II - ROLE DES AGENTS MODIFICATEURS DE L'ACTIVITE DU SYSTEME RETICULO-ENDOTHELIAL SUR L'EPURATION DES LIPOPROTEINES SERIQUES.

### A - Introduction

Nous avons émis l'hypothèse suivante : le système réticulo-endothélial joue un rôle sur l'épuration des lipoprotéines sériques.

Nous avons choisi une méthode de travail indirecte pour aborder ce problème. En effet, nous avons fait varier l'activité du système réticulo-endothélial et étudié l'incidence que ces changements pouvaient avoir sur l'épuration des lipoprotéines sériques.

Rappelons par rapport au système réticulo-endothélial particulièrement quel est le rôle des quatre substances que nous avons injectées à nos animaux. D'une part, trois agents bloquant l'activité du système réticulo-endothélial : la cortisone, la testostérone, le carbone colloïdal ; d'autre part, le Freund, stimulant du système réticulo-endothélial. Classer ces quatre substances en "stimulant" et "bloquant" de l'activité du système réticulo-endothélial serait un peu trop simple. L'unique stimulant, le Freund, est une substance qui ne semble pas avoir d'autre action

concernant cette étude, que celle d'activer les phénomènes d'élimination des substances véhiculées dans le sang. Pour les trois substances bloquantes de l'activité du système réticulo-endothélial, il en est tout autrement ; nous avons, d'une part ; deux hormones : la cortisone et la testostérone, qui ralentissent les phénomènes d'élimination des substances véhiculées par le sang en bloquant le système réticulo-endothélial, et ceci d'une façon très complexe en agissant sur les cellules macrophages, de telle façon que l'activité phagocytaire de ces cellules est mise en sommeil. Ces substances ont un rôle hormonal bien connu qui agit sur de nombreux secteurs de l'organisme. Dans le cadre de cette expérience, il ne faudra jamais perdre de vue que ces deux hormones ont une action stimulante sur la synthèse lipoprotéique, notamment sur celle des bêta-lipoprotéines. A côté de ces deux hormones, nous utilisons le carbone colloïdal qui est aussi un agent bloquant du système réticulo-endothélial, mais qui semble uniquement agir par un phénomène mécanique, car s'il empêche les cellules macrophages du système réticulo-endothélial de phagocyter certaines molécules, c'est par une action directe en étant lui-même phagocyté, il gêne alors l'entrée d'autres molécules dans ces cellules.



## B - Béta-lipoprotéines

### a) Conduite des expériences.

Les rats utilisés sont des mâles de 300 g de race Sprague-Dawley.

Expérience N°1 : Béta-lipoprotéine marquée in vitro au cholestérol C-14

L'expérience est faite sur 12 rats répartis en 3 lots :

- 5 rats forment le lot témoin;
- 5 rats constituent le lot carbone. Ces animaux reçoivent 2 ml de carbone colloïdal par voie intraveineuse dans la saphène pendant quatre jours consécutifs, juste avant l'injection de la béta-lipoprotéine sérique marquée in vitro au cholestérol C-14.
- 2 rats seulement sont utilisés pour le lot Freund. Ces animaux reçoivent 0,5 ml de Freund par voie intramusculaire dans la face postérieure de la cuisse, pendant les quatre jours consécutifs, juste avant l'injection de la béta-lipoprotéine.

Expérience N°2 : Béta-lipoprotéine marquée in vivo à l'acétate C-14

L'expérience est faite sur 3 rats répartis de la façon suivante :

- 1 rat témoin,
- 1 rat traité au carbone;
- 1 rat traité au Freund.

Les traitements au carbone et au Freund sont effectués pendant les 4 jours avant l'injection de béta-lipoprotéine marquée in

vivo à l'acétate C-14

La quantité de radioactivité injectée sous forme de bêta-lipoprotéine peut varier d'un animal à l'autre. Pour cette raison, nous exprimerons nos résultats en pourcentage de la radioactivité à 15 minutes.

Les prélèvements de 0,5 ml de sang se font dans la veine jugulaire, à travers le muscle pectoral (308), 15, 30, 45, 60, 90, 120 et 150 minutes après l'injection de la bêta-lipoprotéine marquée in vitro au cholestérol 14-C. Chaque rat ne subira pas plus de 6 prélèvements durant la durée de l'expérimentation.

b) Mesure de la radioactivité des lipides sanguins.

Les lipides totaux des 0,5 ml de sang sont extraits par le mélange méthylal/méthanol : 80/20 ; la radioactivité de ces lipides après évaporation du méthylal/méthanol est mesurée dans un compteur à scintillation liquide : Nucléar Chicago. Le liquide scintillant est constitué, dans 1 litre de toluène Marck, de 0,5 g de phényl-oxazolyl-benzène (P.O.P.O.P), de 5 g de diphényl-oxalole (P.P.O.) est de 20 ml de Liquifluor.

c) Composition du carbone colloïdal et du Freund.

- carbone colloïdal : faire évaporer 10 ml d'encre de chine ; laver deux fois avec de l'eau distillée et évaporer. Reprendre le carbone dans 50 mg de chlorure de sodium 9 p.1000

- Freund : 1,5 ml d'Arlacel A (mannide-monoléate)
- 8,5 ml Bayol F (huile de paraffine)
- 5 mg mycobactérium butyricum.

d) Méthode statistique (315).

Nous avons employé le test "t" de Student, pour la méthode de comparaison de deux moyennes (petits échantillons).

2) Résultats :

La figure 8 représente le pourcentage de radioactivité des lipides sanguins à différents stades après l'injection de la bêta-lipoprotéine marquée in vitro par rapport à la radioactivité des lipides sanguins lors du premier prélèvement 15 minutes après l'injection de la lipoprotéine.

La figure 8 nous révèle que la courbe d'épuration des animaux traités au Freund présente une pente plus accentuée que celle des témoins. En effet, la représentation semi-logarithmique donne une demi-vie pour la bêta-lipoprotéine des animaux traités au Freund de 105 minutes, alors que celle des témoins est de 125 minutes. Nous n'avons pas utilisé suffisamment d'animaux pour démontrer que cette différence est significative. Cette même figure nous montre que contrairement au Freund, l'épuration des bêta-lipoprotéines est plus lente

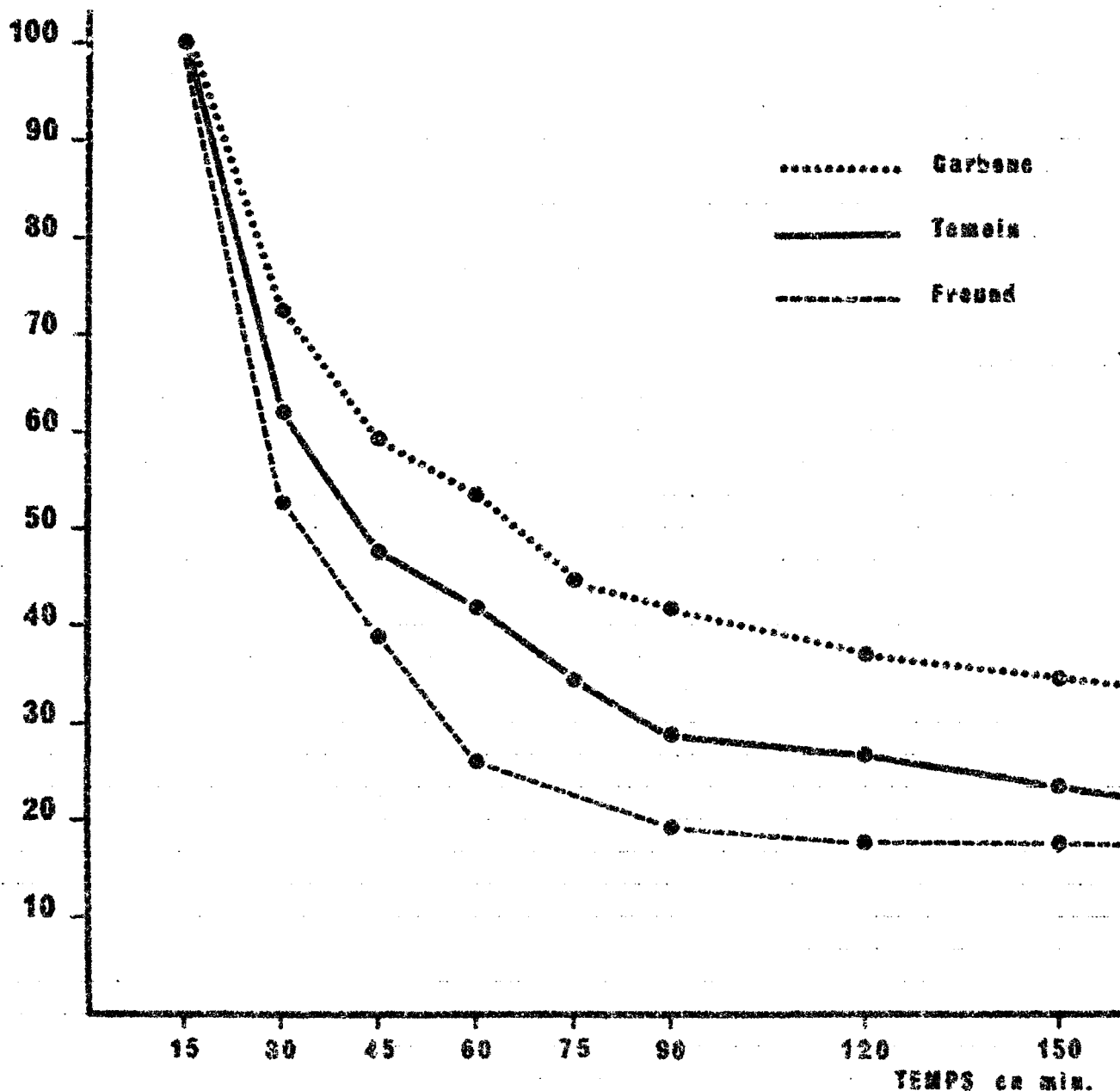
chez les animaux traités au carbone que chez les animaux témoins, puisque la demi-vie des bêta-lipoprotéines chez les animaux traités au carbone est de 180 minutes. Les différences sont significatives pour les prélèvements effectués 60, 75 et 90 minutes après l'injection des bêta-lipoprotéines ( $p < 0,05$ ).

La figure 11 représente le pourcentage de radioactivité des lipides sanguins à différents stades après l'injection de bêta-lipoprotéine marquée in vivo avec de l'acétate C-14, par rapport à la radioactivité du sang lors du premier prélèvement 15 minutes après l'injection de la lipoprotéine.

La figure 11 montre que la courbe d'épuration de la bêta-lipoprotéine des animaux traités au Freund présente une pente plus accentuée que celle des témoins. En effet, la représentation semi-logarithmique nous permet de calculer une demi-vie de 320 minutes, alors que celle des témoins est de 450 minutes. Cette même figure nous montre que contrairement au Freund, l'épuration des bêta-lipoprotéines est plus lente chez les animaux traités au carbone que chez les animaux témoins, puisque la demi-vie des bêta-lipoprotéines chez les animaux traités au carbone est de 530 minutes.

**Fig. 8 : RÔLE DES AGENTS MODIFICATEURS DE L'ACTIVITÉ DU SYSTÈME RÉTICULO-  
ENDOTHELIAL SUR L'ÉPURATION DES BÉTA-LIPOPROTÉINES MARQUÉES IN VITRO**

% r.a. à 15 min.

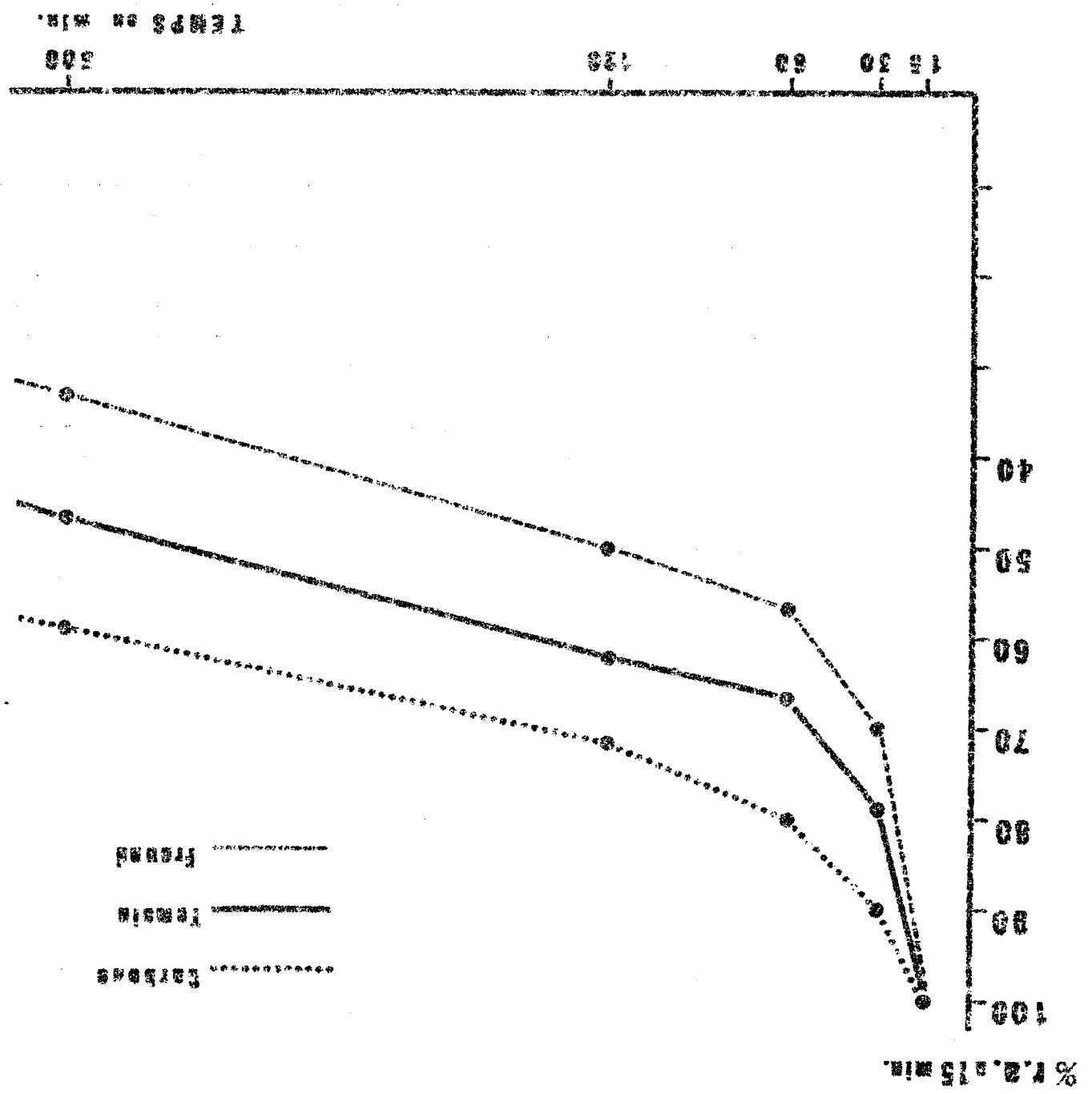


Evolution en fonction du temps de la radio-activité sanguine après injection de bêta-lipoprotéines marquées in vitro, chez des rats témoins, ou traités au carbone ou au Freund. (Les points sont exprimés en pourcentage par rapport à la radio-activité 15 minutes après l'injection.)



(Les points sont exprimés en pourcentage par rapport à la radio-activité à 15 minutes après l'injection.)

Evolution en fonction du temps de la radio-activité sanguine après injection de bêta-lipoprotéines marquées in vivo, chez des rats témoins, ou traités au carbone ou au ferrod.



ENDOTHELIAL SUR L'ÉVOLUTION DES BÊTA-LIPOPROTÉINES MARQUÉES IN VIVO

Fig. 11 : RÔLE DES AGENTS MODIFICATEURS DE L'ACTIVITÉ DU SYSTÈME ENDOTHELIAL

### Discussion

En ce qui concerne le rôle des agents modificateurs de l'activité du système réticulo-endothélial sur l'épuration des bêta-lipoprotéines, les résultats amènent les mêmes conclusions, que cette bêta-lipoprotéine soit marquée in vivo à l'acétate C-14 ou in vitro au cholestérol C-14.

En effet chez les sujets traités au Freund, c'est-à-dire dont l'activité du système réticulo-endothélial a été stimulé, les bêta-lipoprotéines sanguines auront une durée de vie diminuée par rapport à celle des témoins.

Enfin, en ce qui concerne les animaux traités au carbone dont l'activité du système réticulo-endothélial a été bloqué, les bêta-lipoprotéines sanguines auront une durée de vie nettement supérieure à celle des témoins.

Le système réticulo-endothélial "activé" phagocyte donc beaucoup plus rapidement les bêta-lipoprotéines injectées dont la teneur dans le sang circulant diminue . Par contre, si le système réticulo-endothélial est "bloqué", les bêta-lipoprotéines restent plus longtemps en circulation dans le sang.

Le système réticulo-endothélial joue donc un rôle sur l'épuration des bêta-lipoprotéines dans les conditions expérimentales que nous avons ici réalisées.

C - Alpha-Lipoprotéines

1) Conduite de l'expérience :

Pour réaliser cette expérience, nous utilisons cinq lots d'animaux que nous classons ainsi :

- Lot "Témoins" : 12 rats sont utilisés comme témoins.
- Lot "Cortisone" : 10 rats reçoivent pendant les six jours qui précèdent l'injection d'alpha-lipoprotéine, 25 mg de cortisone en intramusculaire.
- Lot "Testostérone" : 10 rats reçoivent pendant les six jours qui précèdent l'injection d'alpha-lipoprotéine, 25 mg de testostérone en intramusculaire.
- Lot "Carbone" : 10 rats reçoivent huit jours avant l'injection de l'alpha-lipoprotéine, à intervalles réguliers (un jour sur deux), 2 ml de carbone colloïdal en intraveineuse.
- Lot "Freund" : 10 rats reçoivent pendant les six jours qui précèdent l'injection d'alpha-lipoprotéine, 0,5 ml de Freund chaque matin.

Les quatre traitements se poursuivent pendant les quatre jours qui succèdent à l'injection d'alpha-lipoprotéine. Au temps 0, chacun des rats reçoit soigneusement la même quantité d'alpha-lipoprotéine marquée par voie intra-veineuse dans la





saphène. L'injection qui dure une dizaine de secondes apporte à chaque rat 0,5 ml d'alpha-lipoprotéine, c'est-à-dire 50 000 coups par minute. Les prélèvements à la jugulaire de 0,5 ml de sang sont échelonnés de 5 minutes à 96 heures après cette injection. Chaque rat ne subira pas plus de 6 prélèvements durant la durée de l'expérimentation. Les lipides sanguins sont extraits ; leur radioactivité est mesurée.

## 2) Résultats et discussion :

Notre projet initial était d'obtenir une solution d'alpha-lipoprotéines marquées suffisamment pure et stable, qui soit physiologique. Nous voulions alors mesurer la demi-vie de cette protéine injectée chez le rat, et juger les effets de différents agents modificateurs de l'activité du système réticulo-endothélial sur cette durée de vie.

En fait, nous avons été confrontés au cours de cette étude, à une série de problèmes expérimentaux qui sont liés à la difficulté d'obtenir des alpha-lipoprotéines marquées qui soient parfaitement physiologiques. L'analyse des tableaux IV et V qui montrent la radioactivité du sang pendant les quatre jours suivant l'injection d'alpha-lipoprotéines marquées in vivo ou in vitro, rend bien compte des différences qui existent entre les deux modes de marquage. Il semblerait que contrairement au marquage in vivo de l'alpha-lipoprotéine, le

marquage in vitro dénature partiellement certaines molécules d'alpha-lipoprotéines.

La figure 9 nous montre l'action des agents modificateurs de l'activité du système réticulo-endothélial sur l'évolution de la radioactivité sanguine après injection d'alpha-lipoprotéines marquées in vitro. Les histogrammes représentent le nombre de coups par minute et par mg de cholestérol à différents temps après l'injection de l'alpha-lipoprotéine. Dans la courbe de radioactivité sanguine, on peut distinguer trois parties :

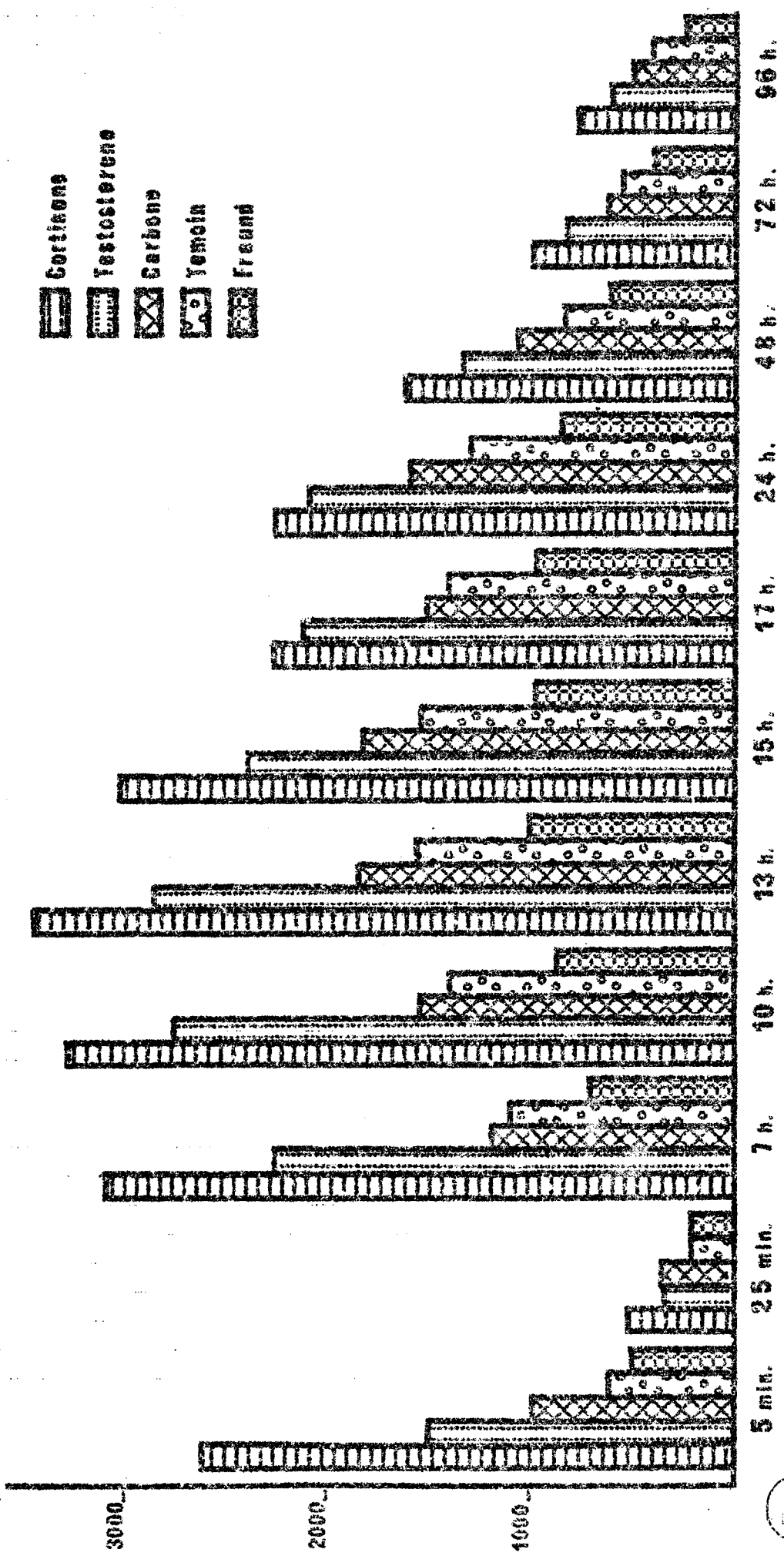
a) Fixation.

La première partie de la courbe de radioactivité sanguine correspond à une mise hors circulation d'une grande partie du cholestérol radioactif. Cette étape dure 25 minutes environ, au cours desquelles la presque totalité de la radioactivité disparaît du sang. On peut considérer que cette phase correspond à la fixation des lipoprotéines injectées par le système réticulo-endothélial, du fait même qu'il s'agit de lipoprotéines qui sont peut-être partiellement dénaturées au cours du marquage in vitro (on n'observe pas cette phase après une injection d'alpha-lipoprotéines marquées in vivo).

L'hypothèse d'une fixation par le système réticulo-

Fig. 9 : ACTION DES AGENTS MODIFICATEURS DE L'ACTIVITE DU SYSTEME RETICULO-ENDOTHELIAL SUR LA RADIO-ACTIVITE SANGUINE APRES INJECTION D'ALPHA-LIPOPROTEINE MARQUEE

r.a.s.  
d.p.m./mg Cholesterol



BUS  
L. 1116

Chaque histogramme représente l'évolution en fonction du temps de la radio-activité sanguine après injection d'alpha-lipoprotéine marquée in vitro, chez des rats témoins ou traités à la cortisone, à la testostérone, au carbone ou au Freund.

endothélial est encore renforcée par les résultats obtenus chez les animaux qui ont été traités par un agent modificateur de l'activité du système réticulo-endothélial : la décroissance de la radioactivité apparaît ralentie chez les animaux qui ont reçu un bloquant du système réticulo-endothélial (cortisone surtout, testostérone, carbone) ; au contraire, le Freund, stimulant le système réticulo-endothélial semble augmenter la fixation des lipoprotéines.

#### b) Libération

La seconde partie de la courbe de radioactivité sanguine située entre 25 minutes et treize heures après l'injection de l'alpha-lipoprotéine, correspond à une phase de libération de radioactivité dans la circulation sanguine. Nous avons montré (tableau III) que vingt heures après l'injection d'alpha-lipoprotéines, plus de 60 p.100 de la radioactivité injectée siégeait dans les bêta-lipoprotéines. Durant cette première période, nous sommes donc devant un processus d'incorporation du cholestérol radioactif injecté avec les alpha-lipoprotéines dans les bêta-lipoprotéines.

Certains auteurs ont suggéré que le matériel lipidique (cholestérol d'origine exogène notamment) utilisé par les hépatocytes pour la synthèse des lipoprotéines, transite par les cellules de Kuppfer avant de pénétrer dans la cellule hépatique.

Cette deuxième phase d'augmentation de la radioactivité des lipoprotéines est d'interprétation difficile et nécessite des recherches particulières.

#### c) Epuration

A partir de la treizième heure, la courbe de radioactivité correspond essentiellement à l'épuration proprement dite des bêta-et des alpha-lipoprotéines marquées. Les durées de vie dans les cinq lots entre treize et cent heures sont identiques ; figure 10.

Les demi-vies sont de 40 heures (lots : "témoins", "testostérone", "Freund") et de 45 heures (lots : "cortisone", et carbone").

Les alpha-lipoprotéines étant épurées pratiquement à la même vitesse, qu'elles soient soumises à l'action bloquante ou stimulante du système réticulo-endothélial, il semble donc

d'autant plus qu'il s'agit d'un mélange d'alpha et de bêta-lipoprotéines, que la technique de marquage in vitro employée ici, ne convienne pas pour cette étude.

C'est en effet un "pool" d'alpha et de bêta-lipoprotéines que nous étudions après la libération d'une partie du cholestérol de l'alpha-lipoprotéine injectée et sa captation par les bêta-lipoprotéines. L'expérience est donc très criticable.

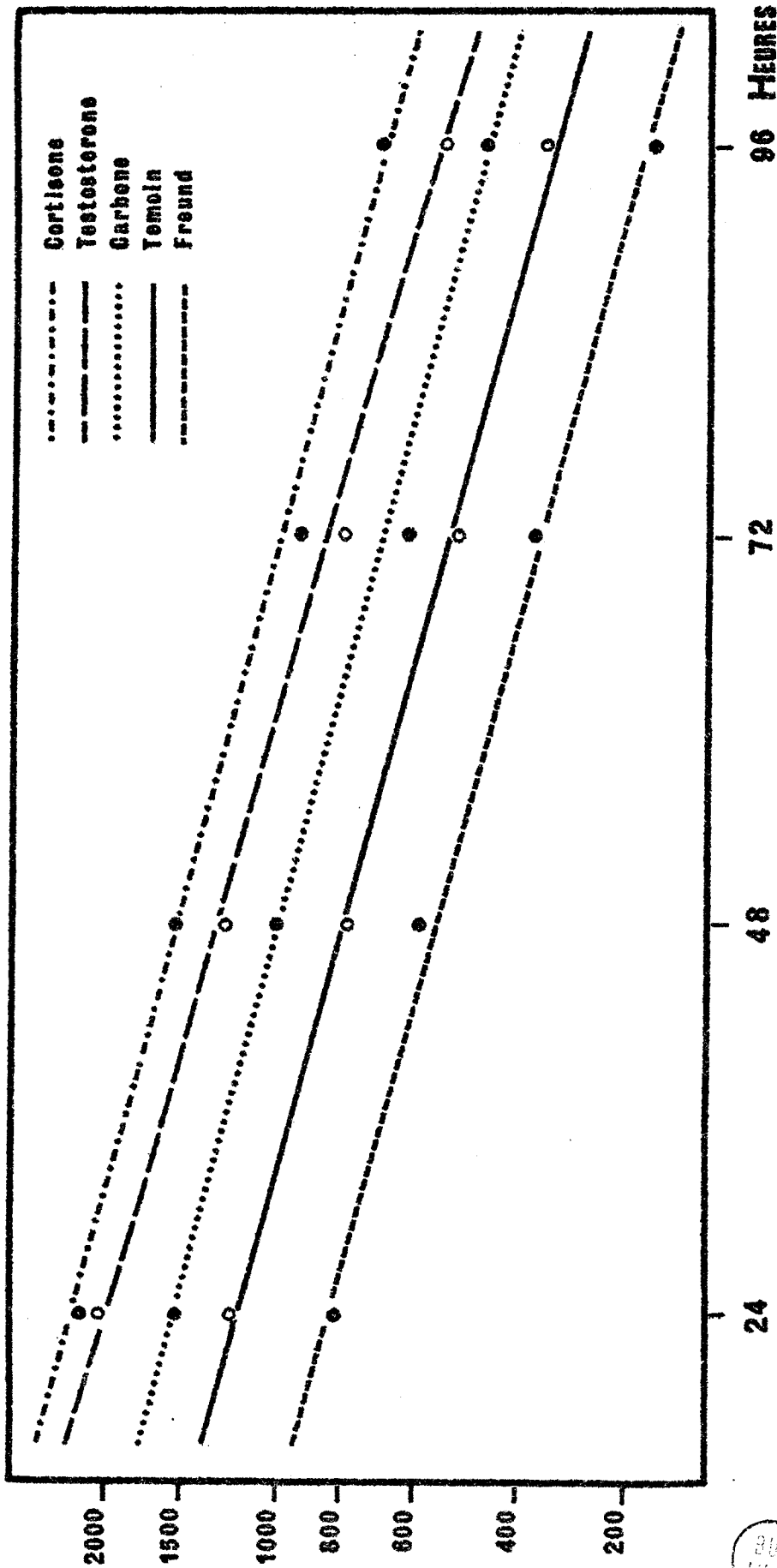
- Nous ne pouvons pas dans ces conditions expérimentale, préciser le rôle éventuel du système réticulo-endothélial sur l'épuration des alpha-lipoprotéines.

FIG. 10 : ROLE DES AGENTS MODIFICATEURS DE L'ACTIVITE DU SYSTEME RETICULO-ENDOTHELIAL SUR L'EPURATION

DES ALPHA-LIPOPORTEINES

r.a.s.

d.p.m. / mg Cholesterol



Évolution en fonction du temps de la radio-activité sanguine après injection d'alpha-lipoprotéines marquées in vitro, chez des rats témoins, ou traités à la cortisone, à la testostérone, au carbone ou au Freund. (Coordonnées semi-logarithmiques).

IV - ROLE DU TISSU CONJONCTIF SUR LA FIXATION DU  
CHOLESTEROL SERIQUE.

A - Introduction

L'aorte de rat ne fournissant que des quantités minimales de tissu conjonctif, certains chercheurs ont été amenés à trouver le moyen de reproduire ce tissu dans une zone de l'organisme plus accessible.

C'est seulement en 1951 que GRINDLAY et WAUGH (229) ont proposé pour la première fois la technique des implants sous-cutanés d'éponges en polyvinyle ; BOUCEK et NOBLE de 1955 à 1959 reprenaient la méthode et la développaient (230, 231, 241, 242). Dans les chambres microporeuses de ces éponges se développe une quantité importante de tissu granulomateux, avec fibroblastes et substance fondamentale. Ce tissu granulomateux est morphologiquement identique au tissu sous lequel il s'est développé.

A partir de 1966, JACOTOT et BEAUMONT (232) montrent qu'il



existe certaines relations positives et significatives entre l'aorte et le tissu éponge, relations confirmées par la similitude morphologique des tissus conjonctifs de l'artère et de l'éponge (233, 231).

Il existe d'autres procédés que les implants d'éponges en polyvinyle, utilisant par exemple la prolifération conjonctive qui succède à l'introduction sous-cutanée de certaines algues (234, 235, 236, 237), ou bien celle qui accompagne la cicatrisation des plaies sous-cutanées et tendineuses (238, 239, 240). La technique des éponges représente de nombreux intérêts : une réalisation aisée, une précision et une reproductibilité d'autant meilleure que l'éponge fournit une quantité de tissu suffisante pour faire de nombreuses analyses.

Le problème que nous avons à résoudre est d'apprécier l'activité des cellules conjonctives dans la fixation et la libération des lipides sanguins ; nous avons étudié plus particulièrement la fixation du cholestérol C-14 dans le tissu conjonctif, en sachant d'une part que la synthèse locale du cholestérol est négligeable (la majeure partie du cholestérol qui apparaît dans le tissu conjonctif provient des lipoprotéines sanguines) (243, 244, 245) et d'autre part que chez l'animal, les tissus ne peuvent dégrader le noyau stérol. La résolution de ce problème nécessite la réalisation d'un état d'équilibre relatif par administration quotidienne de cholestérol C-14 dans l'alimentation (250, 254).

Nous savons depuis les expériences de MORRIS et CHAIKOFF (246, 247) : d'une part que le cholestérol radioactif administré quotidiennement au rat entraîne une augmentation de la radioactivité spécifique du cholestérol sérique pendant 20 jours environ, la radioactivité spécifique atteignant ensuite un plateau dont le niveau dépend de la radioactivité du régime ingéré ; d'autre part que le cholestérol radioactif peut être retrouvé dans différents tissus, y compris le tissu conjonctif.

Nous avons étudié les échanges du cholestérol des lipoprotéines entre le sang et le tissu conjonctif de l'aorte, de la peau, et de l'implant d'éponge (250, 254).

## B - Matériel et Méthodes

### a) Incorporation du cholestérol C-14 dans l'organisme.

Les rats Sprague-Dawley (300 g) sont nourris au régime ordinaire de laboratoire auquel on ajoute 200 g de saindoux et 0,5 mCi de cholestérol 4 C-14 pour 10 kg d'aliment (radioactivité spécifique :  $12,5 \cdot 10^6$  cpm/g de cholestérol). La teneur du régime en cholestérol est de 0,07 p 100.

Certains rats reçoivent le premier jour de la mise au régime marqué, par intubation gastrique, une dose de 10  $\mu$ Ci de cholestérol 4 C-14 dissous dans 1 ml d'huile d'olive ; cette technique a été utilisée pour obtenir un plateau de radioactivité spécifique plus élevé (tableau VI).

### b) Extractions et dosages.

Trois tissus ont été étudiés : l'aorte (intima + média), la peau de la région abdominale et le tissu conjonctif des éponges. L'une des deux éponges implantées à chaque animal a été prélevée au dix huitième jour du régime marqué. La deuxième éponge, l'aorte ainsi que le fragment de peau ont été prélevés au vingt cinquième jour de régime.

Les lipides de ces tissus sont extraits après broyage suivant la technique de FOLCH (310) ; l'extrait lipidique est dissous par le chloroforme, une partie aliquote sert à mesurer le cho-

lestérol suivant la technique de Grigaut (311) d'après la réaction de Lieberman-Burchard. Le cholestérol libre et estérifié des éponges a été dosé par chromatographie sur couche mince de silicagel.

c) Implantations.

La technique d'obtention du tissu conjonctif est celle des implants sous-cutanés d'éponges en polyvinyle, dans lesquels se développe du tissu granulomateux. Les éponges en polyvinyle chirurgical (etheron-Robbins instr. Co) sont découpées en petits parallélépipèdes de 20 mm x 8 mm x 4 mm de côté ; ils pèsent environ 20 mg. Chaque éponge est lavée au sérum physiologique, séchée à l'air ambiant pendant trente six heures puis stérilisée en chaleur humide à 150°C. Au moment de l'implantation, les éponges sont humidifiées par du chlorure de sodium 9 p 100. Sous anesthésie générale (injection au nébubarbital en intrapéritonéale et éther au masque), on réalise une incision verticale médiane d'un peu moins de deux centimètres sur la peau de la région dorso-lombaire. Les deux éponges sont placées à plat dans le tissu sous-cutané à droite et à gauche de l'incision à un centimètre l'une de l'autre, séparées par un point de catgut entre les plans aponévrotiques superficiels et profonds. On évite soigneusement la formation d'hématomes, l'implantation a lieu la veille de la mise au régime marqué.

C - Résultats

1) Radioactivité spécifique du cholestérol sérique

Tableau VI

Cage I :

Les animaux qui ont reçu uniquement du cholestérol marqué dans l'alimentation, présentent une augmentation de la radioactivité du sérum qui est très importante pendant les cinq premiers jours pour devenir plus progressive jusqu'au dix huitième jour où la radioactivité spécifique atteint un plateau.

Cage II :

Chez les animaux qui sont au même régime mais qui ont reçu en plus 10  $\mu$ Ci de cholestérol C-14 par intubation gastrique, on constate tout de suite une très forte augmentation de la radioactivité spécifique dans les premiers vingt quatre heures, une légère diminution ensuite jusqu'au cinquième jour, puis une augmentation progressive jusqu'au dix huitième jour, stade où la radioactivité spécifique atteint un plateau. Chez ces animaux dans les temps considérés, le plateau est plus élevé chez les animaux qui sont uniquement au régime marqué, grâce à l'apport gastrique de cholestérol C-14. Les différences sont significatives. En ce qui concerne le délai d'apparition du plateau, il est le même dans les deux cas ( 18 jours )

TABLEAU VI

TENEUR du CHOLESTEROL SERIQUE chez des ANIMAUX au REGIME MARQUE

Durée de régime	30 h	52 h	5 jours	8 jours	11 jours	14 jours	18 jours	25 jours
<b>Cage I (5 rats)</b>								
Cholestérol sérique (en mg/100 ml)	-	107 ± 4,6	95 ± 5,6	109 ± 6,3	97 ± 6,8	95 ± 6,9	94 ± 4,8	88 ± 5,0
R.A.S. en c.p.m./mg de cholestérol	-	4 700 ± 466	15 200 ± 760	17 700 ± 1 614	20 680 ± 2 351	21 800 ± 2 527	26 000 ± 2 293	24 800 ± 2 076
<b>Cage II (5 rats)</b>								
Cholestérol sérique (en mg/100 ml)	110 ± 5,1	-	112 ± 1,8	107 ± 5,2	98 ± 3,5	107 ± 11,7	100 ± 4,7	92 ± 5,7
R.A.S. en c.p.m./mg de cholestérol	29 120 ± 3 589	-	22 160 ± 2 256	24 720 ± 2 559	28 600 ± 1 915	29 400 ± 1 782	31 260 ± 852	31 020 ± 863
Différence de R.A.S. (Cage I - Cage II)	-	-	$P < 0,02$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,02$

\*Degré de signification.



TABEAU VII

RADIO-ACTIVITE SPECIFIQUE (R.A.S.) et TENEUR en CHOLESTEROL

des SOLUTIONS d'ALPHA et de BETA-LIPOPROTEINES

	Durée du régime marqué en jours	Nombre d'animaux (mélange de sérum)	Teneur en cholestérol de la solution de Lp (mg/100 ml)	Teneur en protéines de la solution de Lp (mg/100 ml)	R.A.S. en cpr/mg de cholestérol
Alpha-lipoprotéines	25	20	25	670	360
Beta-lipoprotéines	25	20	168	128	51 000



TABLAU VIII

RADIO-ACTIVITE SPECIFIQUE (R.A.S.) du CHOLESTEROL des EPONGES en FONCTION du TEMPS

(Comparaison avec le sérum et les beta-lipoprotéines)

Durée du régime marqué (en jours)	Nombre d'animaux	Teneur en cholestérol total (mg p. 100)	R.A.S. du cholestérol de l'éponge (cpm/mg)	R.A.S. du cholestérol total du sérum (cpm/mg)	R.A.S. du cholestérol des beta-Lp (cpm/mg)
<u>Cage I</u>					
18	3	290	35 200	26 000	--
25	3	300	40 800	25 000	51 000
<u>Cage II</u>					
18	5	310	39 300	31 000	--
25	5	250	46 000	31 000	51 000





mais il peut être repoussé jusqu'au trentième jour.

2) Radioactivité spécifique du cholestérol dans l'alpha et les bêta-lipoprotéines - tableau VII.

Les résultats montrent que la radioactivité spécifique et la teneur en cholestérol de la solution d'alpha-lipoprotéines sont très faibles (900 cpm/mg de cholestérol). La radioactivité des bêta-lipoprotéines est beaucoup plus forte (51.000 cpm/mg de cholestérol). Ces chiffres concernent les lipoprotéines du sang de vingt rats, séparées et purifiées suivant la technique que nous avons mise au point (Chapitre I).

3) Radioactivité spécifique du cholestérol des éponges tableau VIII.

On constate que la radioactivité spécifique du cholestérol du tissu conjonctif des éponges est supérieure à la radioactivité spécifique du cholestérol sérique tout en étant inférieure à la radioactivité spécifique des bêta-lipoprotéines sériques. Dix huit jours après l'implantation des éponges, la radioactivité spécifique du tissu conjonctif représente 70 à 80 p 100 de la radioactivité spécifique des bêta-lipoprotéines sériques pour atteindre 80 à 90 p 100 au vingt cinquième jour. L'augmentation de la radioactivité spécifique du tissu éponge

entre le dix huitième et le vingt cinquième jours est de l'ordre de 15 p.100 ; la différence est significative. On peut noter que des tissus que nous avons étudié, c'est l'éponge qui a la teneur en cholestérol la plus élevée. Grâce à ces éponges, nous avons étudié les transferts de cholestérol entre le sang et le tissu conjonctif d'après un modèle expérimental (306) constitué par un système à deux compartiments ouverts, le compartiment sanguin et le compartiment tissu éponge entre lesquels se produisent les échanges de cholestérol. Le flux d'entrée du cholestérol dans le tissu conjonctif est de 0,4 mg de cholestérol par gramme de tissu conjonctif et par jour. Le flux de sortie est de 0,31 mg, soit une différence de 0,14 mg de cholestérol par jour pour 1 gramme de tissu conjonctif. Ces résultats sont en accord avec ceux qui sont donnés par le travail cité (306).

D'autre part la répartition du cholestérol dans les éponges, dosé par chromatographie sur silicagel, nous montre que pour les onze éponges étudiées, 90 p.100 de la radioactivité du cholestérol total se trouve sous forme de cholestérol libre et 10 p.100 sous forme estérifiée.

4) Radioactivité spécifique du cholestérol dans la  
peau et l'aorte - tableau IX

Au vingt cinquième jour de régime marqué, la radioactivité spécifique de l'aorte est très élevée puisqu'elle re-

présente entre 70 et 90 p.100 de la radioactivité spécifique du sérum. La radioactivité spécifique de la peau à ce même stade représente 53 à 58 p 100 de la radioactivité sérique. Cependant par rapport à la radioactivité spécifique des bêta-lipoprotéines sériques, le pourcentage s'abaisse respectivement à 40 p.100 pour l'aorte et 30 p.100 pour la peau.

TABLEAU IX

RADIO-ACTIVITE SPECIFIQUE (R.A.S.) et TENEUR en CHOLESTEROL

du SERUM, de l'AORTE et de la PEAU

	Durée du régime msxqué (en jours)	Nombre de rats	Teneur en cholestérol total (mg p. 100g)	R.A.S. en cpm/mg de cholestérol total
<u>Case I</u>				
Sérum	25	5	98	24 800
Aorte	25	5	120	21 500
Peau	25	5	235	14 000
<u>Case II</u>				
Sérum	25	5	91	31 000
Aorte	25	5	180	21 800
Peau	25	5	230	16 500



## D - Discussion

La question auxquelle nous essayons de répondre dans ce chapitre est de savoir si le tissu conjonctif joue un rôle dans l'épuration des lipoprotéines.

Nous avons été amené tout d'abord à préciser quels étaient le ou les transporteurs du cholestérol en sachant d'une façon générale que ce sont les lipoprotéines qui véhiculent ce cholestérol du sang vers le tissu conjonctif.

On sait que le cholestérol C-14 introduit dans l'alimentation des animaux peut être retrouvé dans les chylomicrons (312) dans les lipoprotéines (243, 313), et circuler de cette façon dans l'organisme.

En étudiant le tableau VII une des premières constatations que nous pouvons faire est que le cholestérol alimentaire n'entre qu'en très petite quantité dans la composition des alpha-lipoprotéines sériques ; par contre ce cholestérol exogène constitue la source principale du cholestérol des bêta-lipoprotéines.

A partir de cette première constatation, nous avons étudié l'apport dans le tissu conjonctif du cholestérol C-14 véhiculé principalement par les bêta-lipoprotéines. Chez le rat la quantité de cholestérol dans les bêta-lipoprotéines est supérieure à celle des alpha-lipoprotéines bien que la pro-

portion d'alpha-lipoprotéines dans le sang soit beaucoup plus importante (deux et demi à quatre fois plus d'alpha-lipoprotéines que de bêta-lipoprotéines dans le sérum de rat suivant nos expériences). Le fait que les alpha-lipoprotéines soient très peu marquées n'est pas uniquement dû à la faible teneur en cholestérol comme le montrent les deux rapports suivants :

$$\frac{\text{Radioactivité spécifique du cholestérol des bêta-lipoprotéines}}{\text{Radioactivité spécifique du cholestérol des alpha-lipoprotéines}}$$

134

$$\frac{\text{Teneur en cholestérol des bêta-lipoprotéines}}{\text{Teneur en cholestérol des alpha-lipoprotéines}} = \underline{4,3}$$

Le renouvellement du cholestérol des lipoprotéines par le cholestérol exogène (alimentaire) est donc trente et une fois plus grand dans les bêta-lipoprotéines que dans les alpha-lipoprotéines. Le corollaire indique que la majorité du cholestérol des alpha-lipoprotéines est du cholestérol endogène. Ces deux notions, nouvelles, semblent très importantes. Il serait bien sûr très intéressant de pouvoir évaluer l'apport dans le tissu conjonctif de certaines molécules véhiculées par les alpha-lipoprotéines et notamment les phospholipides.

Il était indispensable de préciser ce rôle des bêta-lipoprotéines transporteurs du cholestérol pour aborder les résultats concernant le tissu conjonctif. Les résultats sur la fixation du cholestérol montrent que le tissu conjonctif doit

utiliser préférentiellement le cholestérol des bêta-lipoprotéines : en effet, on remarque que la radioactivité spécifique du tissu conjonctif des éponges est nettement plus forte que celle du sérum (de l'ordre de 40 p 100). Nous en déduisons que l'incorporation du cholestérol dans le tissu conjonctif qui est très grande dans le granulome de l'éponge (306) se fait essentiellement au dépend des bêta-lipoprotéines, car d'où viendrait ce surplus de cholestérol sinon des bêta-lipoprotéines qui ont une radioactivité spécifique supérieure de 10 à 30 p 100 à celle du tissu conjonctif suivant l'âge de l'éponge ? Il faut bien sûr envisager un apport en cholestérol endogène dans le tissu conjonctif par les alpha-lipoprotéines, mais la quantité ainsi fournie doit être assez faible.

La concentration du cholestérol dans les éponges est environ trois fois plus grande que dans le sang. Notons ainsi que la radioactivité spécifique du tissu conjonctif continue à croître jusqu'au vingt cinquième jour, alors que la radioactivité spécifique du sérum est en plateau à partir du dix huitième jour.

En ce qui concerne la peau et l'aorte, leur radioactivité spécifique est inférieure à celle des bêta-lipoprotéines et à celle du tissu conjonctif de l'éponge. Néanmoins, elle est suffisamment importante pour laisser penser que dans ces

deux tissus et tout spécialement dans l'aorte, ce sont également les bêta-lipoprotéines qui fournissent les lipides et notamment le cholestérol des cellules ; ceci nous indique bien que le tissu conjonctif a un rôle actif dans l'épuration des bêta-lipoprotéines, sans que nous ayons réussi à mettre en évidence l'action qu'il pourrait avoir vis à vis des alpha-lipoprotéines.





### CONCLUSIONS GENERALES

L'athérosclérose est une maladie pluricausale. Toute recherche concernant ce problème doit tenir compte de cette notion fondamentale.

De nombreux travaux sont effectués actuellement pour tenter de résoudre certaines questions concernant l'athérosclérose et ceci dans différentes spécialités, que ce soit la médecine ou la biologie, la physiologie, l'histologie ou la biochimie. Il serait vain de penser résoudre globalement tous les problèmes que pose l'athérosclérose dans le cadre d'une recherche trop spécialisée, mais nous avons tenté dans un domaine assez précis d'apporter quelques éléments à la compréhension du mécanisme de cette maladie.

La façon de concevoir notre sujet, qu'il s'agisse de l'hypothèse de travail, des recherches proprement dites ou de la conclusion, repose sur une notion essentielle : l'athérosclérose groupe deux catégories de lésions associées : premièrement, un dépôt de lipides, constitué principalement de cholestérol.

térol véhiculé par les lipoprotéines, deuxièmement, des modifications de la structure conjonctivo-élastique de la paroi artérielle.

Notre sujet d'étude : - épuration des lipoprotéines ; rôle du système réticulo-endothélial et du tissu conjonctif -, intéresse particulièrement les phénomènes concernant le premier type de lésions, c'est-à-dire les dépôts de lipides dans l'artère, que l'on ne peut pas dissocier du deuxième type de lésions se rapportant à la structure conjonctivo-élastique de cette même artère.

On sait maintenant que les lipides présents au sein des parois artérielles intéressées par le processus athéroscléreux sont des lipides sanguins, normalement véhiculés par les lipoprotéines sériques. Nous savons d'autre part qu'il y a normalement un transfert important de lipoprotéines transportant du cholestérol entre le sang et l'artère. On conçoit qu'une perturbation importante de ce transfert entraînerait une accumulation du cholestérol dans l'artère.

Nous avons étudié le transporteur, c'est-à-dire les lipoprotéines, et l'une des substances véhiculées : le cholestérol. Nous avons cherché à préciser quelle pouvait être l'action du système réticulo-endothélial et du tissu conjonctif

sur ces lipoprotéines.

- Rôle du système réticulo-endothélial sur l'épuration des lipoprotéines sériques :

Nous connaissons déjà la présence de lipides dans les cellules macrophages des lésions athéromateuses. Nous savions par différents auteurs, d'une part que les cellules réticulo-endothéliales jouaient un rôle très important dans la synthèse, l'hydrolyse et l'estérification du cholestérol, et d'autre part qu'il était possible de provoquer des lésions athéromateuses expérimentalement en bloquant le système réticulo-endothélial et de stopper la progression de la maladie en stimulant ce dernier.

Aujourd'hui, nos expériences nous permettent de dire qu'en stimulant ou en bloquant le système réticulo-endothélial, c'est-à-dire en jouant sur l'activité des cellules réticulo-endothéliales, nous pouvons faire varier dans un sens ou dans l'autre la quantité et la vitesse d'épuration de certaines catégories de lipoprotéines.

En stimulant l'activité phagocytaire du système réticulo-endothélial, nous pouvons accélérer l'épuration des bêta-lipo-

protéines sanguines. Le blocage des macrophages du système réticulo-endothélial a pour conséquence un ralentissement très sensible de l'épuration de ces bêta-lipoprotéines. Nous avons montré aussi, que ce blocage a un effet sur le cholestérol d'origine alimentaire en ralentissant son épuration sanguine. D'une façon inverse, la stimulation du système réticulo-endothélial semble activer les phénomènes d'épuration du cholestérol sanguin. Nous montrons d'autre part que le cholestérol d'origine alimentaire se retrouve dans le sang sous forme de bêta-lipoprotéines, et que le système réticulo-endothélial ne peut pas avoir d'action sur l'épuration du cholestérol sanguin, sans avoir une action sur l'épuration des bêta-lipoprotéines, puisque ce sont ces bêta-lipoprotéines qui véhiculent ce cholestérol dans le sang.

Par ailleurs, les résultats fournis ici ne permettent pas de dire que les modifications de l'activité du système réticulo-endothélial entraînent un changement dans l'épuration des alpha-lipoprotéines, lesquelles jouent un rôle peu important dans le métabolisme du cholestérol d'origine alimentaire. D'après nos expériences, si l'on considère que les cellules du système réticulo-endothélial jouent un rôle sur la vitesse et la quantité des bêta-lipoprotéines épurées, l'on conçoit aisément que tout mécanisme qui aboutirait à un dérèglement des cellules réticulo-endothéliales en modifiant l'ac-

tivité phagocytaire du système réticulo-endothélial, pourrait être une des causes d'apparition des lésions athéromateuses. On pourrait assister alors à des modifications, soit au niveau de la lipémie, soit directement au niveau de la formation de la paroi artérielle (endothélium, macrophage).

- Rôle du tissu conjonctif sur l'épuration des lipoprotéines sériques :

Nous savons que la paroi des grosses et moyennes artères est constituée en grande partie de tissu conjonctif, et que les cellules de la paroi artérielle sont aptes à métaboliser les lipoprotéines. D'autre part, l'altération du tissu conjonctif sous-intimal est perceptible dans le premier stade de l'athérosclérose. Nos expériences montrent que ce sont principalement les bêta-lipoprotéines qui fournissent le cholestérol au tissu conjonctif de l'aorte et de la peau notamment. Cette notion est intéressante dans la compréhension des mécanismes qui régissent l'athérosclérose, étant donné l'importance des modifications des structures conjonctivo-élastiques de la paroi artérielle et l'importance des dépôts de cholestérol sur cette même paroi.

Si l'on admet que le tissu conjonctif joue un rôle dans l'épuration des bêta-lipoprotéines, et qu'un dérèglement de l'activité des cellules conjonctives peut influencer dans un sens ou dans l'autre la capacité de ces cellules à capter ou à stocker certains lipides, et plus particulièrement le cholestérol des bêta-lipoprotéines, on conçoit alors qu'un tel dérèglement pourrait être un facteur important dans la naissance des plaques d'athérome, ainsi que dans les modifications de la partie conjonctivo-élastique de l'artère.

Au terme de ce travail, on peut concevoir que le rôle du système réticulo-endothélial et du tissu conjonctif sur le métabolisme des lipoprotéines se fait dans deux directions :

- d'une part, un certain nombre de cellules disséminées dans l'organisme et plus particulièrement les cellules de Kupffer du foie, et les cellules endothéliales pulmonaires, influent sur le niveau de la lipémie en fixant plus ou moins les lipoprotéines sériques, essentiellement les bêta-lipoprotéines.

- d'autre part, des cellules d'origine mésenchymateuses situées dans les parois des grosses et moyennes artères, qui regroupent cellules intimaux, fibroblastes et peut-être myocytes et macrophages, interviennent dans le transfert permanent

des lipoprotéines à travers la paroi artérielle, leur dérèglement, primitif ou secondaire, peut alors être la cause d'une accumulation de cholestérol dans la paroi artérielle, un des éléments de la lésion d'athérosclérose.





1 - MACHEBOEUF, M.M.A. -

Recherches sur les phospho-amino-lipides et les stérides du sérum et du plasma sanguin. Entraînement des phospho-lipides, des stérols et des stérides par les diverses fractions au cours du fractionnement des protéides du sérum.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1929, 11, 208

2 - COHN, E.S. ; GURD, F.R.N. ; SURGENOR, D.M. ; BARNES, B.A. ;  
BROWN, R.K. ; DEROUAUX, G. ; CYLLEBORN, S.M. ; KAHNT, F.W. ;  
LEVER, W.F. ; LIU, C.H. ; MITTELHAN, S. ; MOUTON, R.F. ;  
SCHMID, K. ; UROMA, E. -

J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 465

3 - DE LALLA, O. ; GOFMAN, J. -

Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins.  
Methods of Biochem. Anal., 1954, 1, 359

4 - HAVEL, R.J. ; EDER, H.A. ; BRAGTON, J.H. -

The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.  
J. Clin. Invest., 1955, 34, 1345

5 - RADDING, C.M. ; STRINBERG, D. -

Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices.  
J. Clin. Invest., 1960, 39, 1560

6 - FREEMAN, N.K. ; LINDGREN, F.T. ; NICHOLS, A.V. -

The chemistry of serum lipoproteins.  
Prog. Chem. Fats lipids., 1963, 6, 213

- 7 - LINDGREN, F.T. ; NICHOLS, A.V. ; WILLS, R.D. -  
Fatty acid distribution in serum lipids and serum lipoproteins.  
Am. J. Clin. Nutr., 1961, 9, 13
- 8 - LINDGREN, F.T. ; NICHOLS, A.V. ; FREEMAN, N.K. ; WILLS, R.D. ;  
WING, L. ; GULLBERG, J.E. -  
Analysis of low density lipoproteins by preparative ultracentrifugation and refractometry.  
J. Lipid. Res., 1964, 5, 68
- 9 - EWING, A.M. ; FREEMAN, N.K. ; LINDGREN, F.T. -  
Advan. Lipid Res., 1965, 3, 25
- 10 - BURSTEIN, M. ; SAMAILLE, J. -  
Sur la clarification du sérum lipémique par l'héparine in vivo.  
Compt. Rend. Acad. Sci., 1955, 241, 664
- 11 - BURSTEIN, M. ; SAMAILLE, J. -  
Sur un dosage du cholestérol lié aux alpha et aux bêta-lipoprotéines du sérum.  
Clin. Chim. Acta, 1960, 5, 609
- 12 - KRITCHEVSKY, D. ; TEPPER, S.A. ; ALAUPOVIC, P. ; FURMAN, R.H. -  
Cholesterol content of human serum lipoproteins obtained by dextran sulfate precipitation and by preparative ultracentrifugation.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1963, 112, 259

- 13 - FREDRICKSON, D.S. ; LEVY, R.I. ; LEES, R.S. -  
Fat transport in lipoproteins an integrated approach  
to mechanisms and disorders.  
New Engl. J. Med., 1967, 276, 32
- 14 - POULIN, M.F. ; VILAIN, C. ; BEAUMONT J.L. -  
Une méthode de purification des bêta-lipoprotéines  
sériques.  
Ann. Biol. Clin., 1967, 25, 645
- 15 - BEAUMONT, J.L. ; LEMORT, N. -  
Purification de l'alpha-1-lipoprotéine.  
Ann. Biol. Clin., 1969, 27, 237
- 16 - LOWRY, O.H. ; ROSENEROUGH, N.S. ; FARR, A.L. ; WANDALL, R.J. -  
Protein measurent with the folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265
- 17 - GRABAR, P. ; WILLIAMS, C.A. -  
Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges  
de substances antigéniques.  
Biochem. Biophys. Acta, 1955, 17, 67
- 18 - OUCHTERLONY, O. -  
Antigen-antibody reactions in gels.  
Acta Path. Microbiol. Scand., 1953, 32, 231
- 19 - NOBLE, R.P. -  
Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in  
agarose gel.  
J. Lipid. Res., 1968, 9, 693

- 20 - LENEGRÉ, J. ; DE BRUX, J. ; HIMBERT, J. ; BEAUMONT, J.L. -  
Avant projet d'un rapport sur l'athérosclérose.  
Arch. Mal. Coeur vaisseaux, suppl. Rev. Athéroscl.,  
1959, 1, 3
- 21 - SCHOENHEIMER, R. -  
Zur chemie der gesunden und der atherosklerotischen  
aorta. Über der quantitativen verhältnisse des chole-  
sterin und der cholesterin ester.  
J. Physiol. Chem., 1926, 160, 67
- 22 - PAGE, I.H. -  
in : The chemistry of lipids and atherosclerosis  
by : C. THOMAS, Springfield., 1958, 3
- 23 - OLIVER, M.F. ; BOYDS, G.S. -  
The plasma lipids in coronary artery disease  
Brit. Heart J., 1953, 15, 387
- 24 - GOFMAN, J.W. ; LINDGREN, F. ; ELLIOTT, H. ; MANTZ, W. ;  
HEWITT, J. ; STRISOWER, B. ; HERRING, V. ; LYON, T.P. -  
The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis.  
Science., 1950, 111, 166
- 25 - GOFMAN, J.W. ; KANING, H. ; JONES, H.B. ; LAUFFER, M. ;  
LOWRY, E. ; LEVINE, E. ; MANN, G. ; MOORE, P. ; OLMSHEAD, F. ;  
YAEGER, F. -  
Evaluation of serum lipoprotein and cholesterol mea-  
surements as predictions of clinical complications of  
atherosclerosis. Report of cooperatives study of lipo-  
proteins and atherosclerosis.  
Circulation., 1956, 14, 691

- 26 - LEMAIRE, A. ; COTTET, J. ; SULLY-LEDERMAN. -  
Le syndrome biochimique de l'athérosclérose  
humaine.  
Presse Méd., 1965, 64, 1129
- 27 - ALBRINK, G.C. ; MANN, E.B. -  
Serum triglycerides in coronary artery disease  
Arch. Int. Med., 1959, 103, 4
- 28 - KATZ, L.N. ; STAMLER, J. -  
in : experimental atherosclerosis  
by : C. THOMAS, Springfield., 1963
- 29 - BEAUMONT, J.L. -  
Les troubles du métabolisme des lipides dans  
l'athérosclérose coronarienne.  
Acta Clin. Belgica., 1961, 16, 233
- 30 - JAN, F. ; GROSGOGEAT, Y. -  
Tabac et coronaires.  
Vie Méd., 1971, 25, 3019
- 31 - JAN, F. ; FANCHERS, J.C. -  
Rôle du tabac dans les artériopathies oblitéran-  
tes des membres inférieurs.  
Livret du Méd., 1970, 2, 125
- 32 - SWYNGHEDAUW, B. ; BEAUMONT, J.L. -  
Diabète et hypertriglycémie dans l'athéros-  
clérose humaine.  
Arch. Mal. Coeur et Vais., 1968, 1, 26

33 - BEAUMONT, J.L. -

Hyperlipidemia with circulating anti-beta-lipoprotein, auto-antibody in man, auto-immune hyperlipidemia its possible role in atherosclerosis.  
Progress in Bioch. Pharmac., 1968, 4, 110

34 - SCHWARTZ, D. ; LELLOUCH, J. ; ANGUERA, G. ; BEAUMONT, J.L.  
LENEGRE, J. -

Tobacco and other factors in the etiology of ischemic heart disease in man. Results of a retrospective survey.

J. of Chronic diseases, 1966, 19, 35

35 - GROSGOGÉAT, Y. ; ANGUERA, G. ; LELLOUCH, J. ; NICOTOT, B.  
BEAUMONT, J.L. -

L'intoxication chronique par la nicotine chez le lapin nourri au cholestérol. Effets sur la paroi aortique et la lipidémie.

J. Atheroscl. Res., 5, 291, 1965

36 - THANNHAUSER, S.J. -

in : Lipidoses

by : Grune, Shallon, V. 1, 3e ed. N.Y., 1958, 112

37 - ADELSBERG, L. -

Inborn errors of lipid metabolism : clinical, genetic and chemical aspects.

Arch. Path., 1955, 60, 481

38 - BEAUMONT, J.L. ; BEAUMONT, V. ; GELIN, J. ; LENEGRÉ, J. -

Les tumeurs des tendons : Intéret clinique des xanthomes.

Presse Méd., 1963, 71, 707

- 39 - BIGGS, M.W. ; KRITCHEVSKY, D. -  
Observations with radioactive hydrogen in experi-  
mental atherosclerosis.  
Circulation, 1951, 4, 34
- 40 - DAY, A.J. -  
Lipid metabolism by macrophages and its relation-  
ship to atherosclerosis.  
Advances Lipid Res., 1967, 5, 185
- 41 - CHRISTENSEN, S. -  
Transfer of labelled cholesterol across the aor-  
tic intimal surface of normal and cholesterol fed  
cockerels.  
J. Atheroscl. Res., 1964, 4, 151
- 42 - DAYTON, S. -  
Turnover of cholesterol in the artery walls of  
normal chicken.  
Circulation Res., 1959, 7, 468
- 43 - DUNCAN, L.E. ; BUCK, K. -  
Passage of labeled cholesterol into the aortic  
wall of the dog with normal serum proteins.  
Circulation Res., 1959, 7, 765
- 44 - DUNCAN, L.E. ; BUCK, K. -  
Quantitative analysis of the development of ex-  
perimental atherosclerosis in the dog.  
Circulation Res., 1960, 8, 1023



- 45 - FELT, V. ; ROHLING, S. ; HLADOVEC, J. ; VOHNOUT, S. -  
Transfer rate of serum cholesterol into the rabbit  
aortic wall in various phases of atherosclerosis and  
after application of cortisone or thyroxine.  
J. Atheroscl. Res., 1963, 3, 301
- 46 - FIELD, H. ; SWELL, L. ; SCHOOLS, P.E. ; TREADWELL, C.R. -  
Dynamic aspects of cholesterol metabolism in different  
areas of the aorta and other tissues in man and their  
relation ship to atherosclerosis.  
Circulation, 1960, 22, 547
- 47 - NEWMAN, H.A.T. ; ZILVERSMIT, D.B. -  
Quantitative aspects of cholesterol flux in rabbit  
atheromatous lesions.  
J. Biol. Chem., 1962, 237, 2078
- 48 - AZARNOFF, D.L. -  
Species differences in cholesterol biosynthesis by  
arterial tissue.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1958, 98, 680
- 49 - LOFLAND, H.B. ; CLARKSON, T.B. ; ARTOM, C. -  
Lipid synthesis in aorta preparations from atheroscle-  
rosis susceptible or resistant pigeons.  
Arch. Biochem. Biophys., 1960, 88, 105
- 50 - NEWMAN, H.A.I. ; Mc CANDLESS, E.L. ; ZILVERSMIT, D.B. -  
The synthesis of C 14 lipids in rabbit atheromatous  
lesions.  
J. Biol. Chem., 1961, 236, 1264

- 51 - SIPERSTEIN, M.D. ; CHAIKOFF, I.L. ; CHERNIK, S.S. -  
Significance of endogenous cholesterol in arteriosclerosis : synthesis in arterial tissue.  
Science, 1951, 113, 747
- 52 - WHEREAT, A.F. -  
Lipid biosynthesis in aortic intima from normal and cholesterol fed rabbits.  
J. Atheroscl. Res., 1964, 4, 272
- 53 - BEAUMONT, J.L. -  
Lipides et athérosclérose.  
Extrait de la revue Française d'Etudes Cliniques et Biologiques, 1964, 10, 1031
- 54 - MACHEBOEUF, M.M.A. -  
Recherches sur les lipides, les stérols et les lipoprotéides du sérum et du plasma sanguin.  
Thèse de Science, Paris, 1929
- 55 - FURMAN, R.H. ; ALAUPOVIC, P. ; HOWARD, R.P. -  
Prog. Biochem. Pharmacol., 1967, 2, 215
- 56 - FISHER, W.R. ; GURIN, S. -  
Structure of lipoproteins : covalently bound fatty acids.  
Science, 1964, 143, 362

- 57 - COOK, W.H. ; GURIN, S. -  
Composition and properties of soluble lipoproteins in  
relation to structure.  
Can. J. Biochem. Physiol., 1962, 40, 1273
- 58 - SKIPSKI, V.P. ; BARCLAY, M. ; BARCLAY, R.K. ; FETZER, V.A. ;  
GOOD, J.J. ; ARCHIBALD, F.M. -  
Lipid composition of human serum lipoproteins.  
Biochem. J., 1967, 104, 340
- 59 - ALAUPOVIC, P. ; SANBAR, S.S. ; FURMAN, R.H. ; SULLIVAN, M.L. ;  
WALRAVEN, S.L. -  
Biochemistry, 1966, 5, 4044
- 60 - GLOMSET, J.A. ; JANSSEN, E.T. ; KENNEDY, R. ; DOBBINS, J. -  
Role of plasma lecithin : cholesterol acyl-transferase  
in the metabolism of high density lipoproteins.  
J. Lipid. Res., 1966, 7, 639
- 61 - SHORE, B. -  
C- and N- terminal amino-acids of human serum lipopro-  
teins.  
Archiv. Biochem. Biophys., 1957, 71, 1
- 62 - SCANU, A. -  
Factors affecting lipoprotein metabolism.  
Advan. Lipid Res., 1965, 3, 63
- 63 - SCANU, A.-  
Biochemistry, 1966, 5, 446

- 64 - SHORE, V. ; SHORE, B. -  
Some physical and chemical studies on the protein moiety of a high-density lipoprotein fraction of human serum.  
Biochemistry, 1967, 6, 1962
- 65 - NICHOLS, A.V. -  
Human serum lipoproteins and their interrelationships.  
Advan. Biol. Med. Phys., 1967, 11, 110
- 66 - AYRAULT-JARRIER, M. ; LEVY, G. ; POLONOVSKI, J. -  
Etude des alpha-lipoprotéines sériques humaines par immuno-électrophorèse.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 703
- 67 - SCANU, A. ; HUGUES, W.L. -  
Further characterization of the human serum D. 1,063-1,21, alpha<sub>1</sub>-lipoprotein.  
J. Clin. Invest., 1962, 41, 1681
- 68 - SHORE, B. ; SHORE, V. -  
Electrophoretic mobilitis of high density lipoproteins of human serum.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1959, 1, 228
- 69 - AYRAULT-JARRIER, M. ; LEVY, G. ; WALD, R. ; POLONOVSKI, J. -  
Séparation par ultracentrifugation des alpha-lipoprotéines du sérum humain normal.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 349

- 70 - BARCLAY, M. ; BARCLAY, R.K. ; TEREBUS-KKISH, O. ; SHAH, E.B. ; SKIPSKI, V.P. -

Disclorure and characterization of new high density lipoproteins in human serum.

Clin. Chim. Acta, 1963, 8, 721

- 71 - LINGREN, F.T. -

New high density lipoproteins in human serum ?

Clin. Chim. Acta, 1964, 9, 402

- 72 - POLONOVSKI, J. -

Role des protéines plasmatiques dans le transport des lipides.

Ann. Biol. Clin., 1967, 25, 3, 329

- 73 - AYRAULT-JARRIER, M. ; MARTINET, F. ; POLONOVSKI, J. -

Action des détergents sur une alpha-lipoprotéine sérique humaine. II- Etude de l'extractibilité des lipides.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 369

- 74 - BOBBITT, J.L. ; LEVY, R.S. -

Biochemistry, 1965, 4, 1282

- 75 - GOODMAN, D.S. ; SHIRATORI, T. -

Fatty acid composition of human plasma lipoprotein fractions.

J. Lipid Res., 1964, 5, 307

- 76 - YOKOYAMA, M. ; ZILVERSMIT, D.B. -  
Particle size and composition of dog lymph chylomicrons.  
J. Lipid. Res., 1965, 6, 241
- 77 - LEVY, R.S. ; LYNCH, A.C. ; Mc GEE, E.D. ; MEHL, J.W. -  
Amino-acid composition of the proteins from chylomicrons and human serum lipoproteins.  
J. Lipid Res., 1967, 8, 453
- 78 - SHORE, V. ; SHORE, B. -  
Some physical and chemical studies on two polypeptide components of high-density lipoproteins of human serum.  
Biochemistry, 1968, 7, 3396
- 79 - HATCH, F. ; LEES, R.S. -  
Plasma lipoprotein analysis.  
Advan. Lipid Res., 1968, 6
- 80 - RODBELL, M. -  
N-terminal amino-acid and lipid composition of lipoproteins from chyle and plasma.  
Science, 1958, 127, 701
- 81 - GUSTAFSON, A. ; ALAUPOVIC, P. ; FURMAN, R.H. -  
Studies on composition and structure of serum lipoproteins : separation and characterization of phospholipid protein residues obtained by partial delipidization of very low density lipoproteins of human serum.  
Biochemistry, 1966, 3, 632

- 82 -- USTAFSON, A. ; ALBUPOVIC, P. ; FURMAN, R.E. -  
Studies of the composition and structure of serum lipoproteins : physical-chemical characterization of phospholipid protein residues obtained from very low density human serum lipoproteins.  
Biochem. Biophys. Acta., 1961, 54, 267
- 83 - SEARCY, E.L. ; BERGQUIST, L.M. -  
Methods of lipoproteins analysis  
In lipoprotein chemistry in health and disease,  
1962, 8, 77.
- 84 - DERVICHIAN, D.G. -  
Sur la nature des liaisons possibles entre les lipides et les protéines du sérum.  
In the Blood Lipids and the Clearing factor  
3ème Conférence Internationale sur les problèmes de la Biochimie des Lipides. 26 au 28 juillet 1956  
Bruxelles.
- 85 - CHEVALLIER, F. ; MATHE, D. -  
Destinée du cholestérol des chylomicrons chez le rat. III- Mouvements du cholestérol  $1-C-14$  entre les chylomicrons et la lymphe ou le sérum in vivo.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 505
- 86 - MINARI, O. ; ZILVERSMIT, D.E. -  
Behavior of dog lymph chylomicron lipid constituents during incubation with serum.  
J. Lipid. Res., 1963, 4, 4341

- 87 - NICHOLS, A.V. ; SMITH, L. ; REHNBORG, C.S. ; FRANCIS, D. -  
Lipid transfer by high density lipoproteins of human  
serum in vitro.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964, 17, 512
- 88 - HAVEL, R.J. ; FELTS, J.M. ; VAN DUYN, C.M. -  
Formation and fate of endogenous triglycerides in  
blood plasma of rabbits.  
J. Lipid Res., 1962, 3, 297
- 89 - HAFT, D.E. ; WHITE, A. ; ROHEIM, P.S. ; WALCOTT, E. ;  
MARESCAL, L. ; EDER, H.A. -  
Relationship between synthesis of cholesterol and  
plasma lipoproteins in the isolated perfused rat  
liver.  
Fed. Proc., 1959, 18, 240
- 90 - HAFT, D.E. ; ROHEIM, P.S. ; WHITE, A. ; EDER, H.A. -  
Plasma lipoprotein metabolism in perfused rat livers.  
J. Clin. Invest., 1962, 41, 842
- 91 - ROBINSON, D.S. ; FRENCH, J.E. -  
Pharmacol. Rev., 1960, 12, 241
- 92 - LINDGREN, F.T. ; FREEMAN, N.K. ; NICHOLS, A.V. ; GOFMAN, J.W.  
The blood lipids and the clearing factor.  
In third international Conference on biochemistry ;  
Problems of lipids, 1956



- 93 - GITLIN, D. ; CORNWELL, D.G. ; NAKASATO, D. ; ONCLEY, J.L. ;  
HUGHES, W.L. ; JANEWAY, C.A. -  
Studies on the metabolism of plasma proteins in the  
nephrotic syndrome. II- The lipoproteins.  
J. Clin. Invest., 1958, 37, 172
- 94 - FREDRICKSON, D.S. ; GORDON, R.S. -  
Transport of fatty acids.  
Physiol. Rev., 1958, 38, 585
- 95 - LINDGREN, F.T. ; NICHOLS, A.V. ; HAYES, T.L. ; FREEMAN, N.K. ;  
GOFMAN, J.W. -  
Structure and homogeneity of the low density serum  
lipoproteins.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 72, 826
- 96 - HAVEL, R.J. ; GOLDFIEN, A. -  
Role of liver and of extrahepatic tissues in trans-  
port and metabolism of fatty acids and triglycerides  
in dog.  
J. Lipid Res., 1961, 2, 389
- 97 - NESTEL, P.J. -  
Metabolism of linoleate and palmitate in patients  
with hypertriglyceridemia and heart disease.  
Metabolism, 1965, 14, 1
- 98 - NESTEL, P.J. ; STEINBERG, D. -  
Fate of palmitate and of linoleate perfused through  
the isolated rat liver at high concentration.  
J. Lipid. Res., 1963, 4, 461

- 99 - HEIMBERG, M. ; FIZETTE, N.B. ; KLAUSER, H. -  
J. Amer. Oil Chem. Soc., 1963, 40, 26
- 100 - STEIN, Y. ; SHAPIRO, B. -  
Assimilation and dissimulation of fatty acids by  
the rat liver.  
Amer. J. Physiol., 1959, 196, 1238
- 101 - ROBINSON, D.S. ; SEAKINS, A. -  
Development in rat of fatty livers associated with  
reduced plasma lipoprotein synthesis.  
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 62, 163
- 102 - HEIMBERG, M. ; WEINSTEIN, I. ; DISHMON, G. ; DUNKERLEY, A. -  
The action of carbon tetrachloride on the transport  
and metabolism of triglycerides and fatty acids by  
the isolated perfused rat liver and its relation-  
ship to the etiology of fatty liver.  
J. Biol. Chem., 1962, 137, 3623
- 103 - STEIN, Y. ; SHAPIRO, B. -  
Uptake and metabolism of triglycerides by the rat  
liver.  
J. Lipid. Res., 1960, 1, 326
- 104 - STRISOWER, E.H. -  
Thèse Univ. of California, 1951

- 105 - BAKER, N. ; SCHOTZ, M.L. -  
Use of multicomportmental models to measure rates  
of triglyceride metabolism in rats.  
J. Lipid Res., 1964, 5, 188
- 106 - JONES, M.B. ; BIGGS, M. ; CRAHAM, D.M. ; ROSENTHAL, D. ;  
GOFMAN, J. ; KRITCHEWSKI, D. -  
Studies of the dynamic transfer of isotopically  
labeled constituents of serum lipoproteins.  
Circulation, 1951, 4, 475
- 107 - EDER, H.A. ; BRAGTON, J.F. ; BOYLE, E. -  
The in vitro exchange of phospholipid phosphorus  
between lipoproteins.  
Circulation, 1954, 10, 603
- 108 - KUNKEL, M.G. ; BEARN, A.G. -  
Phospholipid studies of different serum.  
Proc. Soc. Exp. Biol., 1954, 86, 887
- 109 - HAGERMAN, J.S. ; GOULD, R.G. -  
The in vitro interchange of cholesterol between  
plasma and red cells.  
Proc. Soc. Exp. Biol., 1951, 78, 329
- 110 - FREDRIKSON, D.S. ; Mc COLLESTER, D.L. ; HAVEL, R.J. ;  
ONO, K. -  
In Chemistry of lipids as related to atherosclerosis  
C.C. THOMAS, Springfield, 1958, 205

- 111 - ROBBELL, M. ; FREDRIKSON, D.S. -  
Nature and function of chylomicrons proteins.  
Fed. Proc., 1958, 17. 298
- 112 - AUBERTIN, J. ; JENSEN, R. ; PLANQUET, P. ; TAYEAU, F. -  
Clarification d'une suspension de cholestérol par  
le sérum sanguin. Comportement du cholestérol fixe  
aux protéines.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 81
- 113 - CORDON, R.S. ; CHERKES, A. -  
Unesterified fatty acid in human blood plasma.  
From the laboratory of metabolism, National Heart  
Institute (Bethesda), 1955
- 114 - FARQUHAR, J.W. ; GROSS, R.C. ; WAGNER, R.M. ; REAVE, G.M. -  
Validation of an incompletely coupled two-compartment  
non recycling catenary model for turnover of  
liver and plasma triglyceride in man.  
J. Lipid Res., 1965, 6, 119
- 115 - MOSER, H.W. ; EMERSON, K. -  
Estimation of the phospholipid phosphorous turnover  
time in man : studies in normal individuals, in  
patients with the nephrotic syndrome and  
types of hyperlipemia.  
J. Clin. Invest., 1955, 35, 1286

- 116 - ZILVERSMIT, D.B. ; VAN HANDEL, E. -  
The origin of bile lecithin and the use of bile to determine plasma lecithin turnover rates.  
Arch. Biochim., 1958, 73, 224
- 117 - Mc CANDLESS, E.L. ; ZILVERSMIT, D.B. -  
The effect of cholesterol on the turnover of lecithin, cephalin and sphingomyelin in the rabbit.  
Arch. Biochim., 1956, 62, 402
- 118 - ZILVERSMIT, D.B. ; ENTENMAN, C. ; CHAROFF, I.L. -  
The measurement of turnover of the various phospholipids in liver and plasma of the dog and its application to the mechanism of action of choline.  
J. Biol. Chem., 1942, 176, 193
- 119 - GIDEZ, L.I. ; SHREE VE, W.W. ; EDER, H.A. -  
Incorporation of mevalonic acid and 3-C<sup>14</sup> into cholesterol in man.  
Fed. Proc., 1958, 17, 228
- 120 - GOULD, R.G. -  
In : hormones and atherosclerosis.  
by G. PINCUS, New-York, Academic Press., 1959
- 121 - HELLMAN, L. ; ROSENFELD, R.S. ; EIDINGOFF, M.L. ;  
FUKUSHIMA, D.K. ; GALLACHER, T.F. ; WANG, S.I. ;  
ADLERSBERG, D. -  
Isotopic studies of plasma cholesterol of endogenous and exogenous origins.  
J. Clin. Invest., 1955, 34, 48

- 122 - AVIGAN, J. ; EDER, H.A. ; STEINBERG, D. -  
Metabolism of the protein Morety of rabbit serum  
lipoprotein.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 95, 429
- 123 - GITLIN, D. ; CORNNELL, D.G. ; NAKASATO, D. ; ONCLEY, J.L. ;  
HUGHES, W.L. ; JANEWAY, C.A. -  
Studies on the metabolism of plasma proteins in  
the nephrotic syndrome. II- the lipoproteins.  
J. Clin. Invest., 1958, 37, 172
- 124 - ONCLEY, J.L. -  
Plasma lipoproteins.  
In : Chemistry of lipids as related to atheroscle-  
rosis (C. THOMAS), 1958, 114
- 125 - VOLWILER, W. ; GOLD WOR THY, P.D. ; Mac MARTIN, M.P. ;  
WOOD, P.A. ; MACKAY, I.R. ; FREMONT-SMITH, K. -  
Biosynthetic determination with radioactive sulfur  
of turnover rates of various plasma protein in  
normal and arrhotic man.  
J. Clin. Invest., 1955, 34, 1126
- 126 - EDER, H.A. ; STEINBERG, D. -  
The metabolism of plasma lipoproteins.  
J. Clin. Invest., 1955, 34, 932
- 127 - GITLIN, D. ; CORNNEL, D.G. -  
Plasma lipoprotein metabolism in normal individuals  
and in children with the nephrotic syndrome.  
J. Clin. Invest., 1956, 35, 706

- 128 - FREZAL, J. ; REY, J. ; POLONOVSKI, J. ; LEVY, G. ;  
LAMY, M. -

L'absence congénitale de bêta-lipoprotéines :  
Etude de l'absorption des graisses après exsang-  
uino-transfusion. Mesure de la demi-vie des  
bêta-lipoprotéines injectées.

Rev. Franç. d'Et. Clin. Biol., 1961, 6, 677

- 129 - SEARCY, R.L. ; BERGQUIST, L.M. -

Metabolism of lipid-bearing proteins.

in : lipoprotein chemistry in health and disease,  
1962, 7, 7

- 130 - HAGERMAN, J.A.S. ; GOULD, R.G. -

The in vitro interchange of cholesterol between  
plasma and red cells.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1951, 78, 329

- 131 - WHEREAT, A.F. ; STAPLE, E. -

The preparation of serum lipoproteins labeled  
with radioactive cholesterol.

Arch. Biochem. Biophys., 1960, 90, 224

- 132 - NICOL, T. ; QUANTOCK, D.C. ; VERNON-ROBERTS, B. -

The effects of steroid hormones on local and gene-  
ral reticuloendothelial activity : relation of  
steroid structure to function.

In : the reticuloendothelial system and atheros-  
clerosis

by : Di LUZO, N.R. and PAOLETTI, R. ; New-York,  
Phenum Press., 1967

- 133 - NICOL, T. ; VERNON-ROBERTS, B. ; QUANTOCK, D.C. -  
The influence of various hormones on the reticulo-  
endothelial system : endocrine control of body  
defence.  
J. Endocrinol., 1965, 33, 365
- 134 - VERNON-ROBERTS, B. -  
Hormone researches on the reticulo-endothelial  
system.  
Ph D Thesis, University of London, 1965
- 135 - MEIER, R. ; SCHUELER, W. ; DESAULLES, P. -  
Zur Frage des Mechanismus der Hemmung des Binde-  
webswachstums durch cortisone.  
Experientia, 1950, 6, 469
- 136 - QUANTOCK, D.C. -  
The effect of various steroids on local and gene-  
ral body defence.  
Ph D thesis, University of London, 1966
- 137 - NICOL, T. ; BILBEY, D.L.J. ; CHARLES, L.M. ;  
CORDINGLEY, J.L. ; VERNON-ROBERTS, B. -  
Oestrogen : the natural stimulant of body defence.  
J. Endocrinol., 1964, 30, 277
- 138 - NICOL, T. ; VERNON-ROBERTS, B. ; QUANTOCK, D.C. -  
The effects of oestrogen : androgen interaction  
on the reticuloendothelial system and reproductive  
tract.  
J. Endocrinol., 1966, 34, 163
-



- 139 - VILLEE, C.A. ; HAGERMAN, D.D. ; JOEL, P.B. -  
An enzymatic base for the physiologic functions  
of estrogens.  
Recent Prog. Hormone Res., 1960, 19, 49
- 140 - SBARRA, A.J. ; KARNOVSKY, M.L. -  
The biochemical basis of phagocytosis. I- Metabolic  
changes during the ingestion of particles by  
polymorphonuclear leucocytes.  
J. Biol. Chem., 1959, 234, 1355
- 141 - ROBERTS, S. ; SZEGO, C.M. -  
Steroid interaction in the metabolism of reproductive  
target organs.  
Physiol. Rev., 1953, 33, 593
- 142 - KITAY, J.I. -  
Effects of estradiol on pituitary-adrenal function  
in male and female rats.  
Endocrinology, 1963, 72, 947
- 143 - GLENN, E.M. ; MILLER, W.L. ; SCHLAGEL, C.A. -  
Metabolic effects of adrenocortical steroids in  
vivo and in vitro : relationship to anti-inflammatory  
effects.  
Recent Prog. Hormone Res., 1963, 19, 107
- 144 - EBERT, R.H. ; FLOREY, H.W. -  
The extravascular development of the monocyte  
observed in vivo.  
Brit. J. Exptl. Pathol., 1939, 20, 342

- 145 - PAZ, R.A. ; SPECTOR, W.G. -  
The mononuclear response to injury.  
J. Pathol. Bacteriol., 1962, 84, 85
- 146 - BULLOUGH, W.S. -  
Hormones and mitotic activity.  
Vitamines Hormones., 1955, 13, 261
- 147 - NICOL, T. ; VERNON-ROBERTS, B. -  
The influence of the estrus cycle, pregnancy,  
and ovariectomy on RES activity.  
J. Reticuloendothelial Soc., 1965, 2, 15
- 148 - SPECTOR, W.G. ; STOREY, E. -  
A factor in oestrogen-treated uterus causing leu-  
cocyte emigration.  
J. Pathol. Bacteriol., 1958, 75, 383
- 149 - NICOL, T. ; BILBEY, D.L.J. -  
Substances depressing the phagocytic activity of  
the reticuloendothelial system.  
Nature, 1958, 182, 606
- 150 - NICOL, T. ; BILBEY, D.L.J. -  
The effect of various steroids on the phagocytic  
activity of the reticuloendothelial system.  
In : Reticuloendothelial structure and function.  
by : Heller, J.H., New-York, Ronald Press., 1960
-

151 - SNELL, J.F. -

Relationship of chromium phosphate clearance rate to resistance. I- The effects of some corticosteroids on blood clearance rates in mice.

In : Reticuloendothelial structure and function  
by : Heller, J.H. ; New-York, Ronald Press., 1960

152 - EBERT, R.H. ; BARCLAY, W.R. -

Changes in connective tissue reaction induced by cortisone.

Ann. Internal. Med., 1952, 37, 506

153 - SCHAYER, R.W. -

Evidence that induced histamine is an intrinsic regulator of the microcirculatory system.

Am. J. Physiol., 1962, 202, 66

154 - SCHAYER, R.W. -

Induced synthesis of histamine, microcirculatory regulation, and the mechanism of action of the adrenal glucocorticoid hormones.

Progr. Allergy, 1963, 7, 187

155 - GOTH, A. ; ALMAN, R.M. ; MERITT, B.C. ; HOLMAN, J. -

Effect of cortisone on histamine liberation by tween in the dog.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1951, 78, 848

156 - SCHAYER, R.W. ; SMILEY, R.L. ; DAVIS, K.J. -

Inhibition by cortisone of the binding of new histamine in rat tissues.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1954, 87, 590

- 157 - ROCHA E SILVA, M. -  
Bradykinin and histamine.  
Arch. Inter. Pharmacodyn., 1955, 103, 212
- 158 - WEISSMANN, G. ; THOMAS, L. -  
Studies on lysosomes. II- The effect of cortisone  
on the release of acid hydrolases from a large  
granule fraction of rabbit liver induced by an  
excess of vitamin A.  
J. Clin. Invest., 1963, 42, 661
- 159 - ALLISON, F. -  
Anti-inflammatory agents.  
In : Review of the inflammatory response.  
by : ZWEIFACH, B.W. ; GRANT, L. ; Mc CLUSEK, R.T.  
New-York and London, Academic Press., 1965
- 160 - ALLISON, F. ; SMITH, M.R. ; WOOD, W.B. -  
Studies on pathogenesis of acute inflammation :  
action of cortisone on inflammatory response to  
thermal injury.  
J. Exptl. Med., 1955, 102, 669
- 161 - BERLINER, D.L. -  
Biotransformation of corticosteroids as related  
to inflammation.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 116, 1071

162 - ROBINSON, H.J. -

The role of the adrenal glands in infection and intoxication.

In : The suprarenal cortex

by : YOFFEY, J.M., London, Butterworths., 1953

163 - CRABBE, J. -

Enhancing action of small doses of cortisone on macrophage phagocytosis of staphylococci in rabbits.

Acta Endocrinol., 1956, 21, 41

164 - RUBENS-DUVAL, A. ; VILLIAUMEY, J. -

Effect of androgens on granulation tissue.

Ann. Endocrinol., 1962, 23, 648

165 - DIGADDO, M. ; FRATTA, M. -

Influence of 4-chloro-testosterone acetate on wound-healing.

Minerva Chir., 1960, 15, 1227

166 - MYRVIK, O, N. ; EVANS, D.G. -

Effect of bacillus calmette Guerin on the metabolism of alveolar macrophages.

In : The reticuloendothelial system and atherosclerosis

by : DILUZO, N.R., and PAOLETTI, R., New-York, plenum press., 1967

- 167 - BOLIS, L. ; KESSEL, R.W.I. ; PETTI, G. -  
The action of some natural substances on the  
reticuloendothelial system.  
In : The reticuloendothelial system and atheros-  
clerosis.  
by : DIBUZO, N.R. ; PAOLETTI, R., New-York,  
plenum press., 1967
- 168 - HELLER, J.H. -  
In : Reticuloendothelial structure and function  
by : Heller, J.H., New-York, Ronald Press., 1960
- 169 - HELLER, J.H. -  
Nontoxic reticuloendothelial stimulatory lipids.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960, 88, 116
- 170 - BIOZZI, G. -  
Brit. J. Exptl. Pathol., 1960, 41, 599
- 171 - DILUZIO, N.R. -  
Reticuloendothelial involvement in lipid metabo-  
lism.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960, 88, 244
- 172 - BOLIS, L. -  
Aumento dell'attivita fagocitaria del sistema  
reticuloendoteliale in seguito a trattamento con  
una frazione lipopeptidica del fegato.  
Atti. Accad. Med. Lombarda., 1961, 16, 494

173 - QUASTEL, J.H. -

Membrane transport and metabolism.  
in : Kleinzeller and Kotyk  
by : New-York, Academic Press., 1961

174 - MARRO, F. ; LODI, M.P. ; BARTOLI, E. -

Analisi degli effetti esercitati dalla G. strofantina e da una alpha (beta-palmitoil) lisolecitina sul contenuto potassico del cuore isolato pulsante di Rana esculenta.  
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1959, 35, 1813

175 - FLEMMING, K.B.P. -

Pharmacological stimulation and depression of the phagocytic function of the reticuloendothelial system.  
in : the reticuloendothelial system and atherosclerosis.  
by : DILUZO, N.R. ; and PAOLETTI, R. , New-York, plenum press. 1967

176 - STUART, A.E. ; BIOZZI, G. ; STIFFEL, C. ; HALPERN, B.N. ; MOUTON, D. -

The stimulation and depression of reticuloendothelial phagocytic function by simple lipids.  
Brit. J. Exptl. Pathol., 1960, 41, 599

177 - COOPER, G.N. -

J. Reticulo-endothelial Soc., 1964, 1, 50

- 178 - FLEMMING, K. -  
Radiation protective effect and pharmacologically  
changed activity of the reticulo-endothelial  
system.  
Nature, 1963, 200, 1117
- 179 - DICARLO, F.J. ; HAYNES, L.S. ; SILVER, N.J. ;  
PHILLIPS, G.E. -  
J. Reticulo-endothelial Soc., 1964, 1, 224
- 180 - FLEMMING, K. -  
Naturwissenschaften, 1965, 52, 346
- 181 - METZGER, G.V. ; CASARETT, L.J. -  
Some effects of divalent cations on in vitro  
phagocytosis.  
in : the reticuloendothelial system and atherosclerosis  
by : DILUZO, N.R. ; and PAOLETTI, R., New-York,  
plenum press., 1967
- 182 - WILKINS, D.J. ; BANGHAM, A.D. -  
The effect of some metal ions on in vitro phagocytosis.  
J. Reticuloendothelial Soc., 1964, 1, 233
- 183 - ALLISON, F. ; LANCASTER, M.G. ; CROSTHWAITE, J.L. -  
Studies on the pathogenesis of acute inflammation  
V. an assessment of factors that influence in  
vitro the phagocytic and adhesive properties of  
leucocytes obtained from rabbit peritoneal exudate  
Am. J. Pathol., 1963, 43, 775



34 - HAMBURGER, H.J. -

Physikalisch chemische Untersuchungen über phagozyten.

Wiesbaden, 1912

35 - MUDD, S. ; Mc CUTCHERON, M. ; LUCKE, B. -

Phagocytosis.

Physiol. Rev., 1934, 14, 210

36 - WIERNER, J. -

Fine structural aspects of reticuloendothelial blockade.

in : the reticuloendothelial system and atherosclerosis

by : DILUZO, N.R. ; and PAOLETTI, R., New-York plenum press, 1967

37 - WIERNER, J. ; SPIRO, D. ; MARGARETTEN, W. -

An electron microscopic study of reticuloendothelial system blockade.

Am. J. Pathol., 1964, 45, 783

38 - GOOD, R.A. ; THOMAS, L. -

Studies on the generalized shwartzman reaction II- the production of bilateral cortical necrosis of the kidneys by a single injection of bacterial toxin in rabbits previously treated with thoro-trast or trypan blue.

J. Exptl. Med., 1952, 96, 625

- 189 - HOLTER, H. -  
Problems of pinocytosis with special regard to  
amoebae.  
Ann. N.Y. acad. Sci., 1959, 78, 524
- 190 - PALADE, G.E. -  
Blood capillaries of the heart and other organs  
Circulation, 1961, 24, 368
- 191 - BRANDT, P.W. ; PAPPAS, G.D. -  
An electron microscopic study of pinocytosis in  
ameba.  
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1960, 8, 675
- 192 - FAWCETT, D.W. -  
Physiologically significant specializations of  
the cell surface.  
Circulation., 1961, 26
- 193 - BRANDT, P.W. -  
A study of the mechanism of pinocytosis.  
Exptl. Cell. Res., 1958, 15, 300
- 194 - SCHUMAKER, V.N. -  
Uptake of protein from solution by amoeba prote  
Exptl. Cell. Res., 1958, 15, 314

195 - BENNETT, H.S. -

The concepts of membrane flow and membrane vesiculation as mechanisms for active transport and ion pumping.

J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, 4, 99

196 - ELSBACH, P. -

Composition and synthesis of lipids in resting and phagocytizing leukocytes.

J. Exptl. Med., 1959, 110, 696

197 - KARNOVSKY, M.L. ; WALLACH, D.F. -

Incorporation of inorganic phosphate into various classes of phosphalides during phagocytosis.

J. Biol. Chem., 1961, 236, 1895

198 - KARNOVSKY, M.L. -

Metabolic basis of phagocytic activity.

Physiol. Rev., 1962, 42, 143

199 - MONNIER, G. ; JACOTOT, B. ; BEAUMONT, J.L. -

Séparation et purification de l'alpha et bêta-lipoprotéines de rat.

Ann. Biol. Clin., 1970, 28, 347

200 - MABRY, D.S. ; BASS, J.A. ; DODD, M.C. ; WALLACE, J.M.  
WRIGHT, C.S. -

Differential phagocytosis of normal, trypsinized and virus treated human and rabbit erythrocytes by macrophages in tissue culture.

J. Immunol., 1956, 76, 54

- 201 - JENKIN, C.R. ; ROWLEY, D. -  
The role of opsonins in the clearance of living and inert particles by cells of the reticulo-endothelial system.  
J. Exptl. Med., 1961, 114, 363
- 202 - MURRAY, I.M. -  
The mechanism of blockade of the reticuloendothelial system.  
J. Exptl. Med., 1963
- 203 - BENACERRAF, B. ; HALPERN, B.N. ; BIOZZI, G. ; BENOS, S.A.  
Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticulo-endothelial system. III- The effect of cortisone and nitrogen Mustard on the regenerative capacity of the reticulo-endothelial system after saturation with carbon.  
Brit. J. Exptl. Pathol., 1954, 35, 97
- 204 - STUART, A.E. ; BIOZZI, G. ; STIFFEL, C. ; HALPERN, B.N. ; MOUTON, D. -  
The stimulation and depression of reticulo-endothelial phagocytic function by simple lipids.  
Brit. J. Exptl. Pathol., 1960, 41, 601
- 205 - HAMPTON, J.C. -  
An electron microscope study of the hepatic uptake and excretion of submicroscopic particles injected into the blood stream and into the bile duct.  
Acta Anat., 1958, 32, 262

- 206 - KAYE, G.I. ; PAPPAS, G.D. ; DONN, A. ; MALLET, M. -  
Studies on the cornea. II- the uptake and transport of colloidal particles by the living rabbit cornea in vitro.  
J. Cell. Biol., 1962, 12, 481
- 207 - PAPPAS, G.D. ; TENNYSON, V.M. -  
An electron microscopic study of the passage of colloidal particles from the blood vessels of the ciliary processes and choroid plexus of the rabbit.  
J. Cell. Biol., 1962, 15, 227
- 208 - KELLY, L.S. ; DOBSON, E.L. ; HIRSCH, J.D. -  
Proliferation of the reticuloendothelial system in the liver.  
Am. J. Physiol., 1960, 198, 1134
- 209 - KELLY, L.S. ; BROWN, B.A. ; DOBSON, E.L. -  
Cell division and phagocytic activity in liver reticuloendothelial cells.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1962, 110, 555
- 210 - CASARETT, L.J. ; METZGER, G.V. ; CASARETT, M.G. -  
Cytodynamics of rat lung in response to Freund's adjuvant.  
in : The reticuloendothelial system and atherosclerosis  
by : DILUZO, N.R. ; and PAOLETTI, R., New-York, plenum press., 1967

- 211 - HILLEMANN, M.R. -  
A forward look at viral vaccines.  
Am. Rev. Respirat. Diseases, 1964, 90, 683
- 212 - FREUND, J. -  
The mode of action of immunologic adjuvants.  
Advan. Tuberc. Res., 1956, 7, 130
- 213 - STEINER, J.W. ; LANGER, B. ; SCHOTZ, D.L. -  
The local and systemic effects of Freund's adjuvant and its fractions.  
Arch. Pathol., 1960
- 214 - LAUFER, A. ; TAL, C. ; BEING, A.J. -  
Effects of adjuvant (Freund type) and its components on the organs of various animal species.  
Brit. J. Exptl. Pathol., 1959, 40, 1
- 215 - RUGGS, J.C. ; MOORE, R.D. ; SCHOENBERG, M.D. -  
Stimulation of the reticuloendothelial system in the rabbit by Freund's adjuvant.  
Arch. Pathol., 1960, 70, 43.
- 216 - MOORE, R.D. ; SCHOENBERG, M.D. -  
Modification of cellular proliferation of the reticuloendothelial system in the rabbit.  
Exptl. Cell. Res., 1963, 30, 301

- 217 - MOORE, R.D. ; SCHOENBERG, M.D. -  
Alveolar lining cells and pulmonary reticulo-  
endothelial system of the rabbit.  
Am. J. Pathol., 1964, 45, 991
- 218 - BERTALANFFY, F.D. ; LEBLOND, C.P. -  
The continuous renewal of the two types of al-  
veolar cells in the lung of the rat.  
Anat. Rec., 1953, 115, 515
- 219 - CASARETT, L.J. ; MILLEY, P.S. -  
Alveolar reactivity following inhalation of par-  
ticles.  
Health Phys., 1964, 10, 1036
- 220 - NAGAISHI, C. ; OKADA, Y. ; ISHITO, S. ; DAIDO, S. -  
Electron microscopic observations of the pulmo-  
nary alveoli.  
Exptl. Med. Surg., 1964, 22, 81
- 221 - KITAMURA, H. -  
The fine structure of lung alveoli and its reac-  
tions.  
Acta Pathol. Japan, 1964, 14, 147
- 222 - KARRER, H.E. -  
The ultrastructure of mouse lung ; general archi-  
tecture of capillary and alveolar walls.  
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, 2, 241

- 223 KARRER, H.E. -  
Electron microscopic study of the phagocytic  
process in lung.  
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1960, 7, 357
- 224 LOW, F.N. ; SAMPAIO, M.M. -  
The pulmonary alveolar epithelium as an entoder-  
mal derivative.  
Anat. Rec., 1957, 127, 51
- 225 WOODSIDE, G.L. ; DALTON, A.J. -  
The ultrastructure of lung tissue from newborn  
and embryo mice.  
J. Ultrastructure. Res. 1966, 2, 28
- 226 BERRY, L.J. ; AGARWAL, M.K. ; SNYDER, I.S. -  
Comparative effect of endotoxin and reticulo-  
endothelial blocking colloids on selected indu-  
cible liver enzymes.  
in : The reticuloendothelial system and atheros-  
clerosis  
by : DILUZO, N.R. ; and PAOLETTI, R., New-York  
plenum press., 1967
- 227 LEMPERLE, G. -  
The dissimilar effects of two reticuloendothelial  
system stimulants on shock.  
in : DILUZO, N.R. ; and PAOLETTI, R., New-York,  
plenum press., 1967



- 228 - PARANT, M. ; PARANT, F. ; BOYER, F. ; CHEDID, L. -  
On the nature of some nonspecific host responses  
in endotoxin-induced resistance to infection.  
in : the reticuloendothelial system and atheros-  
clerosis  
by : DILUZO, N.R. ; and PAOLETTI, R., New-York,  
plenum press., 1967
- 229 - GRINDLAY, J.H. ; WAUGH, J.M. -  
Plastic sponge which acts as a framework for  
living tissue.  
Arch. Surg., 1951, 63, 228
- 230 - BOUCEK, R.J. ; NOBLE, N.L. -  
Connective tissue ; a technique for its isola-  
tion and study.  
Arch. Path., 1955, 59, 553
- 231 - BOUCEK, R.J. ; NOBLE, N.L. ; WOESSNER, J.F. -  
The effects of tissue age and sex upon connective  
tissue metabolism.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 72, 1016
- 232 - JACOTOT, B. ; BEAUMONT, J.L. -  
Etude comparée de la teneur en cholestérol de  
l'intima aortique et du tissu conjonctif cultivé  
"in vivo".  
Pathol. Biol., 1966, 14, 733

- 233 - KAO, K.Y. ; BOUCEK, J.R. ; NOBLE, N.L. -  
Rate of collagen formation in biopsy connective  
tissue of the rat.  
Proc. Soc. Exptl. Biol., 1957, 95, 535
- 234 - CHAPMAN, J.A. -  
Morphological and chemical studies of collagen  
formation. I- the fine structure of guinea pig  
granulomata.  
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 9, 639
- 235 - JACKSON, D.S. -  
Connective tissue growth simulation by carragenin  
I- the formation and removal of collagen.  
Biochem. J., 1957, 65, 277
- 236 - ROBERTSON, W. ; VAN, B. ; SCHWARTZ, B. -  
Ascorbic acid and the formation of collagen.  
J. Biol. Chem., 1953, 201, 689
- 237 - SLACK, H.G.B. -  
Connective tissue growth simulation by carragenin  
II- the metabolism of sulfate polysaccharides.  
Biochem. J., 1957, 65, 459
- 238 - ROSS, R. ; BENDITT, E.P. -  
Wound healing and collagen formation. I- sequen-  
tial changes in components of guinea pig skin  
wound observed in the electron microscope.  
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 11, 677

- 239 - SCHILLING, J.A. ; FAVATA, B.V. ; RADAKOWITCH, M. -  
Studies of fibroplasia in wound healing.  
Surg. Gynec. Obstet., 1953, 96, 143
- 240 - WASSERMANN, F. -  
Fibrillogenesis in the regenerating rat tendon  
with special reference to growth and composition  
of collagenous fibril.  
Amer. J. Anat., 1954, 94, 399
- 241 - BOUCEK, R.J. ; NOBLE, N.L. -  
Conjugated lipids of connective tissue of rats  
and rabbit.  
Circulation Res., 1955, 3, 519
- 242 - BOUCEK, R.J. ; NOBLE, N.L.  
Lipid metabolism of connective tissue as related  
to vascular aging.  
in : Lansing A.B : the arterial wall  
by : Williams and Wilkins ed., Baltimore, 1959,  
207
- 243 - AVIGAN, J. ; STEINBERG, G.D. ; BERMAN, M. -  
Distribution of labeled cholesterol in animal  
tissues.  
J. Lipid Res., 1962, 237, 2078
- 244 - DAY, J. -  
The macrophage system, lipid metabolism and  
atherosclerosis.  
J. Atheroscl. Res., 1964, 4, 117

- 245 - NEWMAN, H.A.I. ; ZILVERSMIT, D.B. -  
Quantitative aspects of cholesterol flux in rabbit atheromatous lesions.  
J. Biol. Chem., 1962, 237, 2078
- 246 - MORRIS, M.D. ; CHAIKOFF, I.L. ; FELTS, J.M. ;  
ABRAHAMS, S. ; FANSAH, P.O. -  
The origin of serum cholesterol in the rat :  
diet versus synthesis.  
J. Biol. Chem., 1957, 224, 1039
- 247 - MORRIS, M.D. ; CHAIKOFF, I.L. -  
J. Biol. Chem., 1959, 234, 1095
- 248 - CHEVALLIER, F. -  
L'espace cholestérol du rat.  
Arch. Sci. Physiol., 1956, 10, 249
- 249 - CHEVALLIER, F. -  
Dynamics of cholesterol in rats, studied by the isotopic equilibrium method.  
Adv. Lipif. Res., 1967, 5, 209
- 250 - JACOTOT, B. ; MONNIER, G. ; BEAUMONT, J.L. -  
In vivo incorporation of dietary 14-C-cholesterol in rat serum lipoproteins and transfers in connective tissue.  
Clin. Chim. Acta., 1971, 33, 95.

- 251 - MONNIER, G. ; JACOTOT, B. -  
In vivo and in vitro labelling of rat alpha and beta lipoproteins : study of the serum lipoproteins Half time.  
A paraître dans Clin. Chim. Acta.
- 252 - MONNIER, G. ; JACOTOT, B. -  
Rôle du système réticulo-endothélial sur l'épuration des lipoprotéines de rat : action de différents agents modificateurs de l'activité du système réticulo-endothélial sur l'épuration de la bêta-lipoprotéine.  
A paraître.
- 253 - MONNIER, G. ; JACOTOT, B. -  
Rôle du système réticulo-endothélial sur l'épuration des lipoprotéines de rat : action de différents agents modificateurs de l'activité du système réticulo-endothélial sur l'épuration de l'alpha-lipoprotéine.  
A paraître.
- 254 - SZIGETI, M. ; MONNIER, G. ; JACOTOT, B. ; ROBERT, L. -  
Distribution of ingested <sup>14</sup>C-Cholesterol in the macromolecular fractions of rat connective tissue: Connective tissue Research, 1972
- 255 - SAXL, P. ; DONATH, F. -  
Eine Funktionsprüfung der Abfangorgane des reticulo-endothelialems systems.  
Wiem. Klin. Wochschr., 1925, 38, 66

- 256 - JAFFE, R.H. ; BERMAN, S.L. -  
The relation between kuffer cells and liver  
cells.  
A.M.A. Arch. Pathol., 1928, 5, 1020
- 257 - NOMURAT, T. -  
Experimentelle studien über intravenöse Fettin-  
fusion unter besonderer Berücksichtigung paren-  
teraler Ernährung.  
Tokoku J. Exptl. Med., 1929, 12, 497
- 258 - NACHLAS, A. ; DUFF, G.L. ; TIDWELL, H.C. ; HOLT, L.E. -  
Liver function as tested by the lipemic curve  
after intravenous fat administration.  
J. Clin. Invest., 1936, 15, 143
- 259 - MURRAY, R.G. ; FREEMAN, S. -  
The morphologic distribution of intravenously  
injected fatty chyle and artificial fat emulsion  
in rats and dogs.  
J. Lab. Clin. Med., 1951, 38, 56
- 260 - FRENCH, J.E. ; MORRIS, B. -  
The uptake and storage of lipid particles in  
lumph glands in the rat.  
J. Pathol. Bacteriol., 1960, 79, 11

261 - DAY, A.J. -

Oxidation of <sup>14</sup>C-Labelled chylomicron fat and  
<sup>14</sup>C-labelled Unesterified fatty acids by macro-  
phages in vitro and the effect of clearing facto.  
Quart. J. Exptl. Physiol., 1960, 45, 220

262 - DAY, A.J. -

Quart. J. Exptl. Physiol., 1961, 46, 383

263 - NEVEU, T. ; BIOZZI, G. ; BENACERRAF, B. ; STIFFEL, C. ;  
HALPERN, B.N. -

Role of reticulo-endothelial system in blood  
clearance of cholesterol.

Am. J. Physiol., 1956, 187, 269

264 - DAY, A.J. ; FRENCH, J. E. -

Further observations on the storage of cholesterol  
and cholesteryl esters in lymph-glands in the rat.  
J. Pathol. Bacteriol., 1961, 81, 247

265 - DAY, A.J. ; GOULD-HURST, P.R.S. -

Esterification of <sup>14</sup>C-labelled cholesterol by  
reticulo-endothelial cells.

Quart. J. Exptl. Physiol., 1961, 46, 376

266 - MAGAT, I. -

Zur experimentellen Lipoidspeicherung.

Virchows Arch. Pathol. Anat. Allgem. Pathol.,  
1934, 93, 417

- 267 - KIMMELSTEIL, P. ; LAAS, E. -  
Morphologische studien zur Frage des lipoidanta-  
gonismus (nebsteinem Beitrag zur künstlichen  
Grebrosidose).  
Beitr. Pathol. Anat. Allgem. Pathol., 1934, 93,  
417
- 268 - CHRISTIANSON, O.O. -  
A.M.A. Arch. Pathol., 1941, 32, 369
- 269 - FERRARO, A. ; JERVIS, G.A. -  
Studies in experimental lipoidoses. I : phosphatides.  
A.M.A. Arch. Pathol., 1940, 30, 731
- 270 - WADDELL, W.R. ; GEYER, R.P. ; CLARKE, E. ; STARE, F.J. -  
Function of the reticuloendothelial system in  
Removal of Emulsified fat from blood.  
Am. J. Physiol., 1954, 177, 90
- 271 - FRIEDMAN, M. ; BYERS, S.O. ; ROSENMAN, R.H. -  
Am. J. Physiol., 1954, 177, 77
- 272 - FEIGENBAUM, L. ; BYERS, S.O. ; FRIEDMAN, M. -  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1954, 85, 530
- 273 - DOUGHERTY, T.F. ; BERLINER, D.L. -  
in : hormones and atherosclerosis  
by : Pineus, D., Academic press, New-York, 1959



- 274 - DI LUZIO, N.R. -  
Lipid composition of kupffer cells.  
Am. J. Physiol., 1959, 196, 884
- 275 - JAFFE, R.H. -  
in : Handbook of haematology  
by : Downey, V 2, Hamilton London, 1938
- 276 - CIONI, C. -  
Studio sperimentale sulla lipodieresi polmonare  
e sul comportamento del S.R.I nel pneumotorace  
provocato nel coniglio.  
Sperimentale, 1932, 86, 587
- 277 - QUENSEL, V. -  
Israel Hwasser och hans id.  
Upsala Lakareförenings Förh., 1932, 38, 1
- 278 - BERNICK, S. ; ALFIN-SLATER, R.B. -  
Pulmonary infiltration of lipid in Essential  
Fatty acid Deficiency.  
Arch. Pathol., 1963, 75, 13
- 279 - COURTICE, F.C. ; SCHMIDT-DIEDRICHS, A. -  
Lipid deposition in the injured wall of the  
carotid artery in the hypercholesterolaemic and  
hyperlipaemic rabbit.  
Quart. J. Exptl. Physiol., 1962, 47, 228

- 280 - DAY, A.J. ; GOULD-HURST, P.R.S. ; WILKINSON, G.K. -  
The incorporation of 14 C-labelled particulate  
cholesterol into lipoprotein by macrophages.  
J. Atheroscler. Res., 1964, 497, 4
- 281 - COURTICE, F.C. ; GARLICK, D.G. -  
The permeability of the capillary wall to the  
different plasma lipoproteins of the hypercho-  
lesterolaemic rabbit in relation to their size.  
Quart. J. Exptl. Physiol., 1962, 47, 221
- 282 - SCHMIDT-DIEDRICHS, A. ; COURTICE, F.C. -  
Brit. J. Exptl. Pathol., 1963, 44, 345
- 283 - RICE, L.I. ; SCHOTZ, M.C. ; POWELLAND, J.R. ;  
ALFIN-SLATER, R.B. -  
Effect of reticulo-endothelial blocking agents  
on plasma and liver cholesterol levels in the  
rat.
- 284 - PATEK, P.R. ; BERNICK, S. -  
A.M.A. Arch. Pathol., 1959, 69, 35
- 285 - PATEK, P.R. ; BERNICK, S. ; FRANKEL, H. -  
Arterial lesions in rats by Reticuloendothelial  
blocking agents.  
Arch. Pathol., 1961, 72, 70

- 286 - DAY, A.J. ; FRENCH, J.E. -  
The synthesis and hydrolysis of cholesteryl ester  
by cells of the reticulo-endothelial system.  
Quart. J. Exptl. Physiol., 1959, 44, 239
- 287 - DAY, A.J. -  
Cholesterol esterase activity of rabbit macro-  
phages.  
Quart. J. Exptl. Physiol., 1960, 45, 55
- 288 - CHERNICK, S. ; SRERE, R.A. ; CHAIKOFF, I.L. -  
The metabolism of arterial tissue. II : lipide  
syntheses- the formation in vitro of fatty acids  
and phospholipides by rat artery with C<sup>14</sup> and  
p<sup>32</sup> as indicators.  
J. Biol. Chem., 1949, 179, 113
- 289 - AZARNOFF, D.L. -  
Species differences in cholesterol Biosynthesis  
by arterial tissue.  
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1958, 98, 680
- 290 - TOMKINS, E.H. -  
Reaction of the reticuloendothelial cells to  
subcutaneous injections of cholesterol.  
A.M.A. Arch. Pathol., 1946, 42, 299
- 291 - LEARY, T. -  
The genesis of atherosclerosis.  
A.M.A. Arch. Pathol., 1941, 32, 507

- 292 - SIMONTON, J.H. ; GOFMAN, J.W. -  
Macrophage Migration in Experimental atherosclerosis.  
Circulation, 1951, 4, 557
- 293 - GORDON, J. -  
Mechanism of lipophage deposition in atherosclerosis.  
A.M.A. Arch. Pathol., 1947, 44, 247
- 294 - RANNIE, I. ; DUGUID, J.B. -  
The pathogenesis of cholesterol arteriosclerosis in the rabbit.  
J. Pathol. Bacteriol., 1953, 66, 395
- 295 - SIMON, R.C. ; STILL, W.J. ; O'NEAL, R.M. -  
The circulating lipophage and experimental atherosclerosis.  
J. Atheroscler. Res., 1961, 1, 395
- 296 - STILL, W.J.S. ; O'NEAL, R.M. -  
Electron microscopic study of experimental atherosclerosis in the rat.  
Am. J. Pathol., 1962, 40, 21
- 297 - MOLLENDORFF, W. -  
Die Ausscheidung von sauren Farben durch die leber.  
Z. Physiol., 1916, 17, 125

- 298 - WEATHERFORD, H.L. -  
The golgi apparatus and vital staining of the  
amphibian and reptilian liver.  
Z. Zellforsch., 1932, 15, 343
- 299 - ASCHOFF, L. -  
in : lectures on Pathology.  
by : Hoeber, P.B., New-York, 1924
- 300 - BEESON, P.B. -  
Effect of reticulo-endothelial blockade on im-  
munity to the schwartzman phenomnom.  
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1947, 64, 146
- 301 - CHEVALLER, F. -  
Importance des transferts du cholestérol.  
Arch. Mal. Coeur., 1959, 1, 45
- 302 - DUNCAN, L.E. ; BUCK, K. -  
Passage of labeled cholesterol into the aortic  
wall of dog with normal serum proteins.  
Circulat. Res., 1959, 7, 765
- 303 - BAILEY, J.M. -  
Cellular lipid nutrition and lipid transport.  
in : lipid metabolism in tissue culture cells.  
by : Rothblat, G.H. ; Kritchevsky, D. , Wistar  
institute press., Philadelphia, 1967

- 304 - ROTHBLAT, G.H. ; HARTZELL, R. ; KRITCHEVSKY, D. -  
Cholesterol metabolism in tissue culture cells.  
in : lipid metabolism in tissue culture cells  
by : Rothblat, G.H. ; Kritchevsky, D. , Wistar  
institute press., Philadelphia, 1967
- 305 - JACOTOT, B. ; BEAUMONT, J.L. -  
Le renouvellement du cholestérol de l'aorte et  
des granulomes sous-cutanés chez le rat.  
C.R. Soc. Biol., 1967, 161, 2421
- 306 - JACOTOT, B. -  
Fixation et libération du <sup>14</sup>C-cholestérol par  
le tissu conjonctif cultivé in vivo dans des  
éponges en polyvinyle.  
J. Atheroscler. Res., 1969, 10, 139
- 307 - RUTIMEYER, L. -  
Ueber den Durchtritt suspendirter partikel aus  
dem blute ins lymphgefäßssystem.  
Arch. Exptl. Path. Pharmak., 1881, 14, 393
- 308 - RENAUD, S. -  
Jugular veen technique for blood collection and  
intravenous injection in the rat.  
Lab. animal care., 1969, 19, 5

- 309 - ASSOUS, E.F. ; GIRARD, M.L. -  
Microméthode nouvelle de dosage du cholestérol  
libre et du cholestérol total directement sur le  
sérum sanguin.  
Ann. Biol. Clin., 1962, 10, 973
- 310 - FOLCH, J.M. ; LEES, M. ; STANLEY, G.H. -  
A simple method for isolation and purification  
of total lipids from animal tissues.  
J. Biol. Chem., 1957, 226, 497
- 311 - GRIGAUT, A. -  
Procédé colorimétrique de dosage de la cholesté-  
rine dans l'organisme.  
C.R. Soc. Biol., 1910, 68, 791
- 312 - BIGGS, M.H. ; NICHOLS, A.N. -  
University of California Radiation - Laboratory  
publication N° 2586, 1954, 20
- 313 - BIGGS, M.H. -  
Studies on exogenous cholesterol metabolism in  
human atherosclerosis with the aid of isotopes  
Adv. Biol. Mes. Phys., 1957, 5, 357
- 314 - MONNIER, G. ; JACOTOT, B. ; BEAUMONT, J.L. -  
Effect of factors influencing the reticulo-endo-  
thelial system on the turnover of the rat serum  
cholesterol.  
Natr. Metabol., 1971, 13, 266

- 315 - SCHWARTZ, D. -  
Méthodes statistiques à l'usage des médecins  
et des biologistes.  
Editions médicales Flammarion.
- 316 - BISERTE, G. ; SEZILLE, G. ; BERTRAND, M. ; JAILLARD, J. .  
Exploration lipidique au cours du diabète.  
Ann. Biol. Clin., 1964, 7, 861
- 317 - WAREMBOURG, H. ; BISERTE, G. ; JAILLARD, J. ; SEZILLE, M.  
BERTRAND, M. ; SCHERPEREEL, P. -  
Les lipides liés de l'aorte humaine athérosclé-  
reuse.  
J. of Atheroscl. Res., 1967, 7, 601
- 318 - BERSOT, P. ; BROWN, W.V. ; LEVY, R.I. ; WINMUELLER, H.G.  
FREDRICKSON, D.S. ; LEQUIRE, V.S. -  
Further characterization of the apoprotein rat  
plasma lipoproteins.  
Biochem., 1970, 9, 3427

