

5. On this basis, we were able to calculate the daily growth rate of *Polyplastron*. The initial concentration having been fixed to 30 cells/ml, we showed that during the logarithmic growth phase, a cell is divided on an average 4.30 times the first day; 4.03 the second day, 3.83 the third day, 2.86 times the fourth day and 1.96 times the fifth day. During the equilibrium phase the mean rate of multiplication is 1.7.

All these results are discussed according to the facts until then known from *in vivo* general estimates or from obtained data in *in vitro* cultures.

ACTION DE LA FLORE MICROBIENNE DU TRACTUS DIGESTIF SUR LE MÉTABOLISME DES SELS BILIAIRES. DÉGRADATION DE L'ACIDE β -MURICHOIQUE

E. SACQUET, Y. VAN HEIJENOORT, M. RIOTTOT et P. RAIBAUD

*Groupe des Laboratoires de Gif sur Yvette, C. N. R. S.,
91 - Gif sur Yvette*

La comparaison entre rat axénique et rat holoxénique permet d'apprécier dans toute son ampleur l'action que la flore microbienne du tractus digestif exerce sur le métabolisme des sels biliaires.

Chez le rat axénique mâle la quantité totale des sels biliaires présents au niveau de l'intestin grêle est plus que doublée et les proportions respectives des acides cholique et β -muricholique sont très différentes : chez le rat axénique l'acide cholique constitue 35 p. 100 des acides biliaires totaux présents au niveau de l'intestin grêle et l'acide β -muricholique 54 p. 100, alors que chez le rat holoxénique les proportions sont de 61 p. 100 pour l'acide cholique et 12 p. 100 pour l'acide β -muricholique.

L'établissement dans le tractus digestif du rat axénique de souches bactériennes qui ne métabolisent pas les sels biliaires mais qui réduisent le cæcum, détermine une diminution de la quantité des sels biliaires qui retrouve ainsi la valeur qu'elle possède chez le rat holoxénique, mais ne modifie en rien la composition des sels biliaires qui demeure ce qu'elle est chez le rat axénique. Il n'y a donc pas de liaison entre ces deux caractères.

De très nombreuses hypothèses se présentent concernant le mécanisme par lequel la flore microbienne diminue la proportion d'acide β -muricholique. L'une d'elles est que cette diminution provient d'un catabolisme particulièrement actif de cette espèce chimique par certaines bactéries intestinales. Il est utile pour entreprendre cette étude de connaître les métabolites bactériens que la flore microbienne forme chez le rat holoxénique. Dans ce but, de l'acide β -muricholique-4-¹⁴C a été administré à deux rats holoxéniques ; les matières fécales excrétées dans les jours qui suivent ont été traitées selon la méthode de Grundy et Ahrens ; les esters méthyliques des acides biliaires ont été chromatographiés sur couche mince de gel de silice et la répartition de la radioactivité sur ces chromatogrammes a été déterminée par dosage en scintillation liquide après élution.

Cette expérience montre que l'acide β -muricholique est rapidement catabolisé puisque 3 jours après l'administration orale il a complètement disparu chez l'un des rats et ne représente plus que 2,5 p. 100 de la radioactivité excrétée ce jour-là chez l'autre rat. Cette disparition s'accompagne de la formation d'au moins 10 composés marqués qui sont observés sur les chromatogrammes. La radioactivité la plus importante apparaît au niveau de l'ester méthylique de l'acide hydodésocolique : sur les chromatogrammes obtenus à partir des fèces recueillies le 3^e jour, 62 p. 100

de la radioactivité chez l'un des rats et 49 p. 100 chez l'autre se trouvent à ce niveau. L'incubation d'un homogénat de cæcum de rat holoxénique en présence d'acide β -muricholique-4- ^{14}C produit des résultats très différents : 21 p. 100 seulement de l'acide β -muricholique est transformé et aucune radioactivité n'apparaît au niveau de l'ester méthylique de l'acide hyodésoxycholique. Cette observation préliminaire est en accord avec l'étude d'Einarsson selon qui, la formation de l'acide hyodésoxycholique requiert le concours de la flore microbienne du tractus digestif et de l'hépatocyte.

SUMMARY

ACTION OF GASTRO-INTESTINAL MICROFLORA ON BILE SALT METABOLISM IN THE RAT. DEGRADATION OF β -MURICHOLATE

Comparative study of bile salt metabolism in axenic (germ-free) and in holoxenic (conventional) rats allows to fully appreciate the action of microflora on this metabolism.

Studies were carried out on axenic and holoxenic three months old entire male *Fischer* rats which were fed on a semi-synthetic diet.

Compared to its holoxenic homologous, the small intestine of the axenic rat contains more than twice as much total bile salts, the proportion of β -muricholate is higher (54 p. 100 of total bile salts in the axenic *versus* 12 p. 100 in the holoxenic) and the proportion of cholate is lower (35 p. 100 of total bile salts in the axenic *versus* 61 p. 100 in the holoxenic).

When the axenic rat receives a microflora composed of bacteria reducing its large cæcum to holoxenic values and which do not metabolize bile salts, the amount of total bile salts at the level of the small intestine is also reduced to holoxenic values, but the proportions of the different bile salts are not changed and remain of axenic type. This allows to conclude that the higher amount of total bile salts in the axenic rat intestine is not a consequence of the higher proportion of β -muricholate, but depends on a modification of the gastro-intestinal physiology in the absence of microflora.

With a view to studying how intestinal microflora reduces the proportion of β -muricholate in the holoxenic rat, the bacterial degradation of β -muricholate has been investigated. β -muricholate-4- ^{14}C was obtained biologically and given *per os* to holoxenic rats. Bile salts were extracted from the faeces excreted during the following days and methyl esters were separated according to a procedure of descending TLC using silicagel as adsorbant phase and chloroform-acetone-methanol : 70 : 25 : 5 as solvent system.

β -muricholate appears to be rapidly metabolized by the microflora of axenic rats ; three days after 39 micromoles of β -muricholate-4- ^{14}C had been given to two rats, this bile salt could no longer be detected in the faeces of one of the rats and represented only 2.5 p. 100 of the radioactivity excreted on the third day in the other rat. This decrease was accompanied by the formation of at least 10 labelled metabolites. The greatest amount of radioactivity on the chromatograms was observed at the level of hydoxycholic acid methyl ester. Hydoxycholate was very similar to the main bacterial metabolite of β -muricholate. However, when β -muricholate was incubated *in vitro* with cæcum homogenates only 21 p. 100 were metabolized and no hydoxycholate appeared. This preliminary observation is in agreement with Einarsson's findings according to which both intestinal microflora and liver are necessary to form hydoxycholate.

Association of axenic rats with bacterial strains whose action on β -muricholate is determined by *in vitro* test should allow to complete understanding of muricholate degradation.