

2m11. 2824. 5

Université de Montréal

Acides biliaires sériques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive
sans amélioration sous traitement à l'acide ursodéoxycholique:
analyse par le spectromètre de masse en tandem

Par

Shaparak Haj-Agha Araghi

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences

en pharmacologie

Septembre 1999

© Shaparak Haj-Agha Araghi, 1999



2.4584.1/102

10/10/10

10/10/10

10/10/10

10/10/10

W
4
1158
2000
N. 093

10/10/10

10/10/10

10/10/10

10/10/10

10/10/10



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Acides biliaires sériques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive
sans amélioration sous traitement à l'acide ursodéoxycholique:
analyse par le spectromètre de masse en tandem

Présenté par:

Shaparak Haj-Agha Araghi

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr. Ibrahim Yousef: Directeur de recherche

Dr. Pierre-Michel Huet: Codirecteur de recherche

Dr. Pierre-André Lavoie: Président du jury

Dr. Jean-Pierre Villeneuve: Membre du jury

Mémoire accepté le: 25 septembre 2000

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
LISTE DES FIGURES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
REMERCIEMENTS.....	xi

1 INTRODUCTION.....	1
1.1 L'anatomie et la physiologie du foie.....	1
1.2 La bile et les acides biliaires.....	7
1.2.1 Composition et fonction de la bile.....	7
1.2.2 Formation de la bile.....	8
1.2.2.1 Débit biliaire dépendant des acides biliaires.....	10
1.2.2.1.1 Capture hépatique des acides biliaires.....	11
1.2.2.1.2 Transport intracellulaire des acides biliaires.....	13
1.2.2.1.3 Sécrétion canaliculaire des acides biliaires.....	14
1.2.2.2 Débit biliaire indépendant des acides biliaires.....	15
1.2.3 Structure et biosynthèse des acides biliaires.....	16
1.2.4 Propriétés physico-chimiques des acides biliaires.....	19
1.2.5 Conjugaison des acides biliaires.....	21
1.2.5.1 Amidation avec les acides aminés glycine et taurine.....	22
1.2.5.2 Sulfatation des acides biliaires.....	23
1.2.5.3 Glucuronidation des acides biliaires.....	24
1.2.6 Circulation entérohépatique des acides biliaires.....	24
1.2.7 Lipides biliaires.....	25
1.2.8 Métabolisme des acides biliaires sériques en cholestase.....	28
1.3 Cirrhose biliaire primitive (CBP).....	32
1.3.1 Définition et caractéristiques de la maladie.....	32

1.3.2	L'acide ursodéoxycholique dans le traitement médical de la cirrhose biliaire primitive.....	37
1.3.2.1	Structure et propriétés physico-chimiques de l'acide ursodéoxycholique.....	38
1.3.2.2	Métabolisme et mécanismes d'action de l'acide ursodéoxycholique dans le traitement de la cirrhose biliaire primitive.....	39
1.3.2.2.1	Modification de la circulation entérohépatique.....	40
1.3.2.2.2	Effet cytoprotecteur.....	41
1.3.2.2.3	Effet sur le système immunitaire.....	42
1.4	Méthodes d'analyse des acides biliaires.....	43
1.4.1	Méthodes enzymatiques.....	44
1.4.2	Méthodes immunologiques.....	45
1.4.3	Méthodes chromatographiques.....	45
1.4.3.1	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).....	46
1.4.3.2	Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	48
1.4.3.3	Spectromètre de masse en tandem (MS-MS).....	48
1.4.3.3.1	Modes d'acquisition des données.....	50
1.4.4	Isolation des acides biliaires des milieux biologiques complexes.....	51
1.4.5	Étalon interne.....	52
1.4.6	Courbes d'étalonnage.....	53
2	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	54
3	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	56
3.1	Validation des méthodes.....	56
3.1.1	Efficacité des cartouches C ₁₈ dans l'extraction des acides biliaires.....	56
3.1.2	Spectromètre de masse en tandem (MS-MS).....	58
3.1.2.1	Identification et optimisation des acides biliaires par le MS-MS.....	58
3.1.2.2	Quantification des acides biliaires par le MS-MS.....	60
3.1.2.2.1	Choix de l'étalon interne.....	60
3.1.2.2.2	Préparation des échantillons sériques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive pour le MS-MS.....	60

3.1.2.2.3	Courbes d'étalonnage et quantification des acides biliaires.....	61
3.1.3	Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)	62
3.1.3.1	Facteurs de correction de la réponse du détecteur pour les différents acides biliaires en relation avec l'étalon interne.....	62
3.1.3.2	Préparation des échantillons de sérum des patients atteints de cirrhose biliaire primitive pour le GC-MS.....	63
3.2	Sujets expérimentaux	64
3.3	Changements dans les paramètres biochimiques (ALT, AST, PA, γ -GT, bilirubine, cholestérol) chez les 13 patients atteints de cirrhose biliaire primitive avant et 6 mois après le traitement avec l'acide ursodéoxycholique.....	65
3.4	Analyses statistiques.....	68
4	RESULTATS	69
4.1	Validation des méthodes.....	69
4.1.1	Efficacité des cartouches C ₁₈ dans l'extraction des acides biliaires:	69
4.1.2	Analyse des acides biliaires par le spectromètre de masse en tandem (MS- MS) : optimisation et caractérisation des acides biliaires.....	71
4.1.2.1	Le "Full Scan"	71
4.1.2.2	Le "Daughter Scan".....	74
4.1.2.3	Le choix de l'étalon interne.....	76
4.1.2.4	Les courbes d'étalonnage.....	79
4.1.3	Analyse des acides biliaires par le chromatographe gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS).....	79
4.1.3.1	Facteurs de correction de la réponse du détecteur pour les différents acides biliaires en relation avec l'étalon interne.....	79
4.2	Analyse des acides biliaires sériques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive avant et 6 mois après le traitement avec l'acide ursodéoxycholique par le MS-MS et le GC-MS.....	83
5	DISCUSSION ET CONCLUSION	95
5.1	Extraction et purification des acides biliaires par les cartouches C ₁₈	95
5.2	Identification et caractérisation des acides biliaires par le MS-MS	96

5.3 Analyse des acides biliaires sériques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive traités avec l'acide ursodéoxycholique par le MS-MS et le GC-MS... 98

6 BIBLIOGRAPHIE..... 104

SOMMAIRE

L'acide ursodéoxycholique est le traitement de choix dans les maladies hépatiques cholestatiques, en particulier contre la cirrhose biliaire primitive (CBP). Les résultats des essais thérapeutiques démontrent que l'administration de l'acide ursodéoxycholique apporte des améliorations clinique, biologique et histologique sans effets secondaires. Elle diminue les complications tardives, qui conduisent à la transplantation hépatique. En cholestase, les tests hépatiques sont généralement anormaux, tout particulièrement les activités enzymatiques: phosphatase alcaline et γ -glutamyl transpeptidase. Le métabolisme des acides biliaires est modifié et il y a une augmentation des acides biliaires sériques et urinaires avec une action détergente et hépatotoxique (normalement en très faible concentration).

La solution pour la compréhension de la physiologie et de la pharmacologie des acides biliaires est liée au développement de méthodes analytiques précises. Le but premier de cette étude est d'abord de valider la spectrométrie de masse en tandem (MS-MS), une nouvelle méthode dans l'analyse des acides biliaires. Des méthodes de dosage des acides biliaires, telles que des troupes enzymatiques permettant la détermination des acides biliaires totaux, sont disponibles dans tous les laboratoires cliniques. Des méthodes plus sophistiquées, telles que la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie à haute performance (HPLC), la chromatographie GC ou HPLC couplée à un

spectromètre de masse, la spectrométrie de masse par bombardement d'atomes (FAB-MS) ont permis l'identification d'anomalies spécifiques dans le métabolisme des acides biliaires. Cependant, les résultats de criblage des acides biliaires urinaires et plasmatiques sont controversés essentiellement en raison de deux facteurs: premièrement, la capacité des appareils utilisés et deuxièmement, la préparation de l'échantillon. L'utilisation d'un spectromètre de masse en tandem permet d'éliminer la plupart de ces problèmes. Étant donné que le MS-MS est une nouvelle technique, il faudrait tout d'abord développer une méthodologie pour l'analyse détaillée des acides biliaires (identification et quantification) et optimiser les conditions. De plus, à cause de la faible concentration des acides biliaires dans les milieux biologiques, il est essentiel de les extraire à l'aide des colonnes chromatographiques C_{18} ayant une affinité pour les acides biliaires. Cette étape permet de concentrer les acides biliaires et aussi d'éliminer les autres molécules ayant des poids semblables à ceux des acides biliaires.

De plus, à l'aide du spectromètre de masse en tandem, on a analysé les acides biliaires sériques de 13 patients atteints de cirrhose biliaire primitive chez qui on n'a observé aucune amélioration significative des paramètres biochimiques et du prurit après 6 mois de traitement à l'acide ursodéoxycholique. Les sérums de 7 des 13 patients ont aussi été analysés par le GC-MS. Dans cette étude, l'identification des acides biliaires par le MS-MS a été validée. Cependant, la

quantification des acides biliaires n'a pas été validée par cette méthode et reste à être développée davantage.

Suite à l'administration de l'acide ursodéoxycholique, il y a eu une augmentation significative de la proportion des acides biliaires dihydroxylés ainsi qu'une diminution significative des acides biliaires trihydroxylés et on a aussi observé une augmentation du rapport glycine : taurine chez ces 13 patients. Les résultats obtenus ne démontrent aucun acide biliaire anormal dans le sérum de ces patients qui pourrait être relié à l'absence d'amélioration significative des paramètres biochimiques et du prurit. Des études plus poussées et contrôlées sur les mécanismes d'action ainsi que les effets de l'acide ursodéoxycholique sont nécessaires afin d'avoir une meilleure compréhension du fait qu'on n'a observé aucune amélioration du prurit ni des paramètres biochimiques chez certains patients sous traitement à l'acide ursodéoxycholique.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: L'acinus hépatique.....	6
Figure 2: Relation entre le débit biliaire et la sécrétion des acides biliaires dans la bile.....	9
Figure 3: Le système de transport des électrolytes au niveau de la membrane plasmique de l'hépatocyte.....	17
Figure 4: Structure et biosynthèse des acides biliaires primaires, secondaires et tertiaires.....	20
Figure 5: La circulation entérohépatique des acides biliaires.....	27
Figure 6: Le spectre de masse des acides biliaires (LCA, CDCA, CA, GLCA, GCDCA, GCA, TLCA, TCDCA, TCA) obtenu par le MS-MS (mode "Full Scan").....	73
Figure 7: L'ion fille de (a)GCA et (b)TCA obtenus par le mode "Daughter Scan" de MS-MS.....	77
Figure 8a: Les courbes d'étalonnage de (a)TLCA, (b)GLCA (1-100 ng/10 µl injectés).....	80
Figure 8b: Les courbes d'étalonnage de (a)TCDCA, (b)GCDCA (1-100 ng/10 µl injectés).....	81
Figure 8c: Les courbes d'étalonnage de (a)TCA, (b)GCA (1-100 ng/10 µl injectés).....	82

Figure 9: Le spectre de masse des acides biliaires du sérum du patient C, avant
(a) et 6 mois après (b) l'administration de l'acide
ursodéoxycholique.....85

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Caractéristiques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive traités avec l'acide ursodéoxycholique.....	66
Tableau II: Paramètres biochimiques (ALT, AST, PA, γ -GT, bilirubine, cholestérol) (moyenne \pm écart-type) de 13 patients, mesurés avant (T0) et 6 mois après (T6) le traitement à l'acide ursodéoxycholique.....	67
Tableau III: Pourcentage de récupération (moyenne \pm écart-type, n=6) des acide biliaires marqués, extraits avec les cartouches C ₁₈	70
Tableau IV: Pourcentage de récupération (moyenne \pm écart-type, n=3) des acides biliaires conjugués dilués dans le sérum de cheval, obtenu par le MS-MS après l'extraction par les cartouches C ₁₈	70
Tableau V. Optimisation du voltage du cône pour l'analyse des acides biliaires en mode "Full Scan".....	72
Tableau VI. L'ion fille caractéristique des acide biliaires obtenu par le mode "Daughter Scan" de MS-MS.....	75

Tableau VII. Caractéristiques des différents composés dans le choix de l'étalon interne pour la quantification des acides biliaires par le MS-MS..78

Tableau VIII. Facteurs de correction pour LCA, DOCA, CDCA, CA et UDCA (moyenne \pm écart-type, n=3) obtenus par la méthode SIM de GC-MS.....83

Tableau IX. Proportions des acides biliaires sériques de 13 patients atteints de cirrhose biliaire primitive avant (T0) et 6 mois après (T6) l'administration de l'acide ursodéoxycholique, obtenues par le MS-MS.....87

Tableau X. Le rapport glycine:taurine des acides biliaires avant (T0) et 6 mois après (T6) le traitement avec l'acide ursodéoxycholique chez les 13 patients, obtenu par le MS-MS.....89

Tableau XI. Proportions (moyenne \pm écart-type) des différents acides biliaires conjugués avant (T0) et 6 mois après (T6) le traitement avec l'acide ursodéoxycholique de 13 patients atteints de cirrhose biliaire primitive, mesurées par le MS-MS.....91

Tableau XIIa. Proportions des acides biliaires de 7 patients atteints de cirrhose biliaire primitive avant (T0) et 6 mois après (T6) l'administration

de l'acide ursodéoxycholique, mesurées par le GC-MS.....92

Tableau XIIb. Proportions des acides biliaires de 7 patients atteints de
cirrhose biliaire primitive avant (T0) et 6 mois après (T6)
l'administration de l'acide ursodéoxycholique, mesurées par
le MS-MS.....94

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LCA: Acide lithocholique
DOCA: Acide déoxycholique
CDCA: Acide chénodéoxycholique
CA: Acide cholique
UDCA: Acide ursodéoxycholique
GLCA: Acide glycolithocholique
GDOCA: Acide glycodéoxycholique
GCDCA: Acide glycochénodéoxycholique
GCA: Acide glycocholique
GUDCA: Acide glycoursodéoxycholique
TLCA: Acide tauroolithocholique
TDOCA: Acide taurodéoxycholique
TCDCA: Acide taurochénodéoxycholique
TCA: Acide taurocholique
TUDCA: Acide tauroursodéoxycholique

Autres

PA: Phosphatase alcaline
ALT: Alanine transférase
AST: Aspartate transférase
cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate
CBP: Cirrhose biliaire primitive
CMC: Concentration micellaire critique
CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité
 γ -GT: γ -glutamyl transpeptidase
GC-MS: Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
HPLC: Chromatographie liquide à haute performance
HLA: Human Leukocyte Antigen
MRM: Multiple Reaction Monitoring
MS-MS: Spectromètre de masse en tandem
SIM: Selected Ion Monitoring
 μ M: Micromolaire
 μ mol/ml: Micromole par millilitre
 μ g: Microgramme
 μ g/ μ l: Microgramme par microlitre
 μ g/l: Microgramme par litre
 μ m: Micromètre
g: Gramme
g/l: Gramme par litre

kDa: Kilodalton

l/h: Litre par heure

ng/ml: Nanogramme par millilitre

ng/ μ l: Nanogramme par microlitre

V: Volt

eV: Electron volt

kV: Kilovolt

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier ma famille pour leur patience et leur soutien moral durant ces deux années d'études. Particulièrement, un gros merci à mon époux, Houman, qui a toujours été présent pour m'aider et m'encourager.

Je remercie énormément mon directeur de recherche, le Dr. Ibrahim Yousef, pour ses conseils judicieux, sa disponibilité et son soutien moral lors de ce projet. Je désire également exprimer ma gratitude au Dr. Michel Huet, mon codirecteur, pour son importante collaboration et ses conseils pédagogiques. Je tiens également à remercier tout le personnel du laboratoire, en particulier madame Diane Mignault pour son aide précieuse.

Je dédie l'ensemble de mes travaux à la mémoire de mon père.

1 INTRODUCTION

1.1 L'anatomie et la physiologie du foie

Le foie, situé dans la partie supérieure de l'abdomen, est la plus grande glande endocrine et exocrine (pesant environ 1500 g chez l'adulte) et occupe environ 2-5% du poids corporel. Il est divisé en deux lobes principaux, un grand lobe droit et un lobe gauche plus petit, séparés par le ligament falciforme. Le foie est avant tout un organe métabolique extrêmement complexe : il participe à la mise en réserve et à la distribution des nutriments absorbés par l'intestin ; il joue un rôle clé dans la biotransformation et l'élimination des déchets endogènes et des médicaments et toxines exogènes ; il contribue également à la régulation du flux sanguin ainsi qu'à la défense immunitaire.

Le foie est un organe hautement vascularisé. Il reçoit le sang de deux sources : l'artère hépatique apporte du sang oxygéné (20-25%), et la veine porte hépatique du sang désoxygéné contenant des nutriments et des hormones récemment absorbés (75-80%). Le sang porte est mélangé au sang artériel à l'entrée des sinusoides, structures capillaires en étroit contact avec les cellules hépatiques, qui se drainent ensuite vers les veinules hépatiques (Miyai, 1991). La bile, sécrétée par les cellules hépatiques, pénètre dans les canalicules biliaires, qui se déversent dans des petits canaux biliaires. Ces petits canaux s'unissent pour former des canaux plus gros, les canaux hépatiques gauche et droit. Ces deux

canaux se fusionnent et forment le canal hépatique commun. Le canal hépatique commun se joint au canal cystique issu de la vésicule biliaire pour former le canal cholédoque. Entre les repas, la vésicule biliaire, un petit sac situé sous le foie, met la bile en réserve. La vésicule biliaire concentre la bile en absorbant les sels et l'eau. Au cours des repas, les muscles lisses de la vésicule biliaire se contractent, provoquant l'injection d'une solution de bile concentrée dans le duodénum par l'intermédiaire du canal cholédoque.

Le foie est constitué de deux types de cellules: les cellules parenchymateuses et les cellules non parenchymateuses (cellules sinusoïdales). Les cellules parenchymateuses appelées hépatocytes occupent environ 80% du volume total du foie; tandis que les cellules non parenchymateuses en occupent environ 5 à 8%. Les cellules non parenchymateuses se subdivisent en cellules de Kupffer, cellules endothéliales, cellules de Ito et des cellules biliaires (cholangiocytes) (Blouin et al., 1977). Les cellules endothéliales bordent les sinusoïdes et contrôlent les échanges entre le sinusoïde et l'hépatocyte. Les cellules de Kupffer (cellules réticulo-endothéliales étoilées), attachées aux cellules endothéliales, sont des phagocytes chargés de détruire les globules blancs et les globules rouges usés, des substances toxiques et des bactéries. Les cellules de Ito sont des cellules d'emménagement de gras situées à l'intérieur de l'espace de Disse, qui sépare les hépatocytes du sinusoïde. Les cellules de Ito sont aussi responsables du stockage de la vitamine A (Wake, 1971) et de la production du collagène. Les cellules biliaires tapissent l'intérieur des ductules biliaires (ductules

terminaux, cholangioles, canaux de Hering). Ils représentent une très petite fraction de la population cellulaire hépatique et il est souvent très difficile de les identifier dans le foie normal.

L'unité fonctionnelle hépatique est représentée par l'acinus de Rappaport (Rappaport, 1954; Albert, 1996) défini comme une ensemble de cellules parenchymateuses autour de la triade porte (branches terminales de la veine porte, de l'artériole hépatique et du canal biliaire). L'acinus est divisé en trois zones (figure 1): la zone 1 (zone portale) est constituée de cellules qui entourent la veinule portale ; la zone 3, la zone centrale du lobule hépatique, comprend les hépatocytes qui entourent la veinule hépatique terminale. Ces deux zones sont séparées par une zone dite intermédiaire (zone 2) dont les caractéristiques ont été peu étudiées. Les dimensions relatives de cette zone changent avec l'état hémodynamique de l'acinus (Rappaport, 1979; Miyai, 1991). Cette division demeure arbitraire, puisque les frontières de chacune de ces zones sont variables et ne peuvent être précisément définies. Étant donné le sens du flux sanguin, de la région portale à la région centrale, les hépatocytes de la zone 1 sont les premiers à recevoir le sang riche en oxygène et nutriments et sont plus actifs dans la capture et la sécrétion des acides biliaires. Les zones 2 et 3 reçoivent le sang moins riche en aliments nutritifs et sont aussi moins résistantes aux hépatotoxines (Groothuis et al., 1982; Albert, 1996). En utilisant plusieurs techniques, on a démontré l'hétérogénéité des enzymes à l'intérieur de l'acinus (Jungermann et Katz, 1982; Thurman et al., 1986; Gumucio et Chianale, 1988). Ces observations ont permis

de proposer que les hépatocytes des différentes régions de l'acinus diffèrent entre eux dans leur fonction et leur métabolisme (Jungermann et Katz, 1982; Thurman et al., 1986 ; Gumucio et Chianale, 1988). Il est possible qu'elles reflètent un processus de maturation des hépatocytes. Les hépatocytes se diviseraient dans une région de la travée proche de l'espace porte et migreraient ensuite le long des sinusoides vers la veinule hépatique, où la mort cellulaire surviendrait par un mécanisme d'apoptose. Cette différenciation hépatocytaire est sous le contrôle de la matrice extracellulaire et dépend également du caractère unidirectionnel du flux sanguin dans les sinusoides, la composition du sang sinusoidal étant très modifiée entre l'entrée et la sortie des sinusoides (Mion et Minaire, 1996).

La membrane plasmique hépatocytaire peut être divisée en trois domaines adjacents, mais distincts morphologiquement et fonctionnellement. Ce sont les membranes canaliculaire, latérale (intercellulaire) et sinusoidale (basale), qui occupent respectivement 13%, 15% et 72% de la surface totale (Rodriguez et Nelson, 1989; Hubbard et al., 1994). La membrane canaliculaire constitue la portion spécialisée dans l'excrétion biliaire. Elle possède une fluidité moindre que les portions membranaires adjacentes, apportant ainsi une résistance accrue aux fortes concentrations d'acides biliaires (Boyer, 1986; Alvaro, 1994). Cette paroi contient de nombreuses microvillosités. Le pôle canaliculaire de deux hépatocytes adjacents définit le canalicule biliaire, qui conduit la bile produite par les hépatocytes vers les ductules biliaires. La surface latérale est située très proche de celle de l'hépatocyte adjacent et elles sont retenues ensemble par des

desmosomes et des jonctions communicantes possédant une perméabilité pour l'eau et certains ions (Cerejido et al., 1989; Fischer, 1991). La surface sinusoïdale contient des microvillosités et c'est le site où les échanges métaboliques entre l'hépatocyte et le sang ont lieu (Fahimi, 1982; Miayai, 1991). Les surfaces sinusoïdale et latérale sont appelées des surfaces basolatérales et diffèrent de la surface canaliculaire par leur composition biochimique et leur contenu en enzymes et récepteurs (Evans 1980; Maurice et al., 1985). Les hépatocytes sont des cellules multifonctionnelles: ils sont capables de métaboliser, d'entreposer et de sécréter différentes substances endogènes. À l'intérieur de la cellule se trouvent plusieurs organites dont le réticulum endoplasmique qui est l'organe principal impliqué dans la biotransformation des médicaments et des xénobiotiques, dans la synthèse du cholestérol, des phospholipides, des acides biliaires et de la majorité des protéines plasmatiques et membranaires (Parke, 1981; DePierre et al.1988).

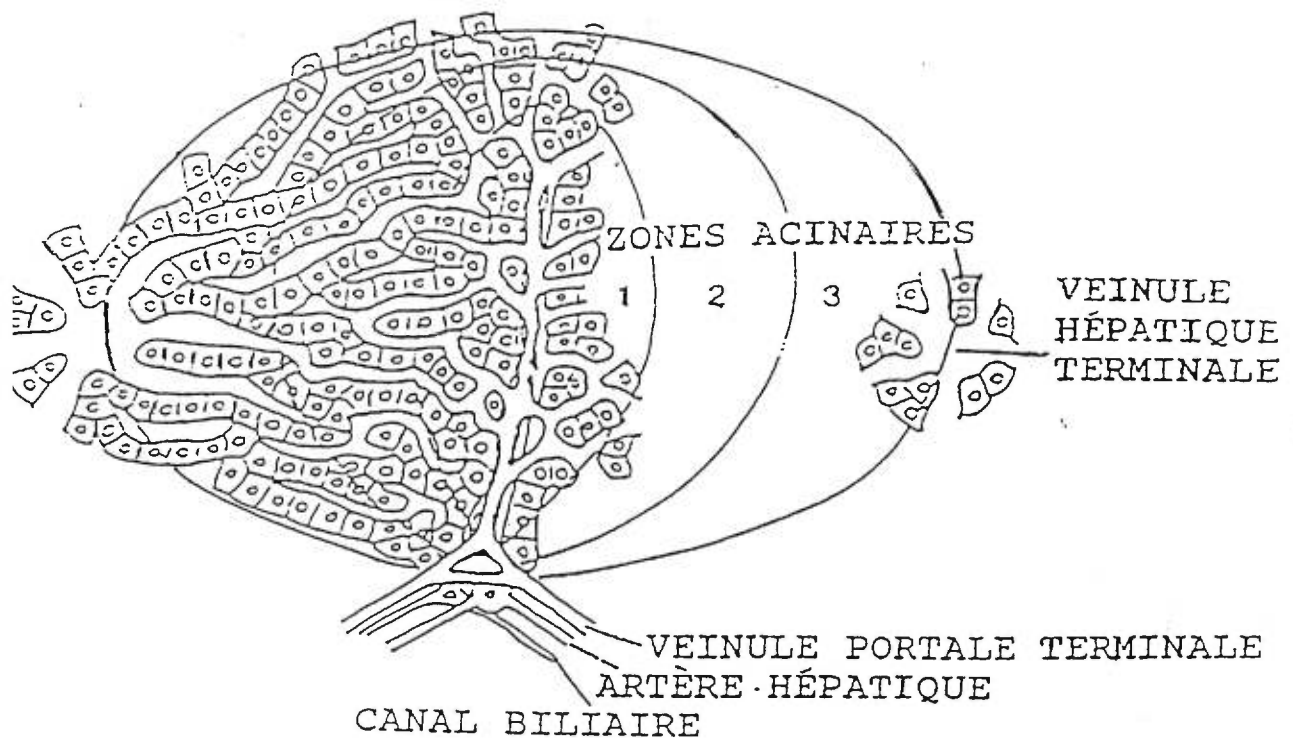


Figure 1. L'acinus hépatique
(Adapté de Gumucio et Chianale, 1988)

1.2 La bile et les acides biliaires

1.2.1 Composition et fonction de la bile

Les cellules hépatiques sécrètent quotidiennement de 600 à 800 ml de bile, une solution aqueuse alcaline jaune, brunâtre ou vert-olive. Son pH varie entre 7,6 et 8,6. La bile se concentre dans la vésicule biliaire et se décharge dans le duodénum à la suite d'un repas. Dans l'intestin, les acides biliaires s'associent à des lipides du régime alimentaire et aussi à d'autres produits digestifs. La composition de la bile varie selon les espèces et aussi selon l'état nutritionnel. Chez l'homme, le taux de sécrétion de la bile hépatique est de 40 ml/h (Erlinger, 1994). La bile est composée d'environ 95% d'eau et 5% de matières solides (Klassen et Watkins, 1984). Parmi les matières solides, on retrouve principalement des acides biliaires (12g/l), les solutés organiques les plus abondants de la bile, et aussi des électrolytes (9g/l), des phospholipides (5g/l), des protéines (2g/l) et du cholestérol (1g/l). La bile contient aussi d'autres substances lipophiliques et des produits du métabolisme lipidique tels que la bilirubine, des vitamines, des stéroïdes, des médicaments et d'autres xénobiotiques (Cornelius, 1986).

Les fonctions de la bile sont multiples. La bile joue un rôle essentiel dans la digestion et l'absorption des graisses par l'action des acides biliaires : ceux-ci aident à l'émulsification des grandes particules alimentaires en de nombreuses

petites particules qui peuvent être attaquées par les lipases pancréatiques et ils aident aussi au transport et à l'absorption des produits finaux de digestion des graisses au travers de la membrane de la muqueuse intestinale. La bile permet aussi d'excréter plusieurs déchets importants véhiculés par le sang. C'est le cas de la bilirubine, produit final de la dégradation de l'hémoglobine, et de l'excès de cholestérol synthétisé par les cellules hépatiques.

1.2.2 Formation de la bile

La formation de la bile canaliculaire est attribuée à un flux osmotique de l'eau en réponse à un transport actif de soluté (Erlinger, 1994). Elle repose sur la haute polarité de l'hépatocyte, impliquant un transport du pôle sinusoïdal au pôle apical. Les acides biliaires sont considérés comme les principaux composés responsables de la génération du flux biliaire. La pente de la ligne de corrélation représente le volume biliaire formé par quantité d'acide biliaire sécrétée. Mais, lorsque la droite de régression du débit biliaire en fonction de l'excrétion des acides biliaires est extrapolée à une sécrétion d'acides biliaires nulle, il y a un débit résiduel, ce qui suggère que le flux biliaire est composée de deux fractions : la première fraction est le débit biliaire dépendant des acides biliaires qui provient d'une sécrétion active des acides biliaires. La deuxième fraction correspond au débit biliaire indépendant des acides biliaires qui est généré à partir d'une sécrétion de solutés différents des acides biliaires (figure 2).

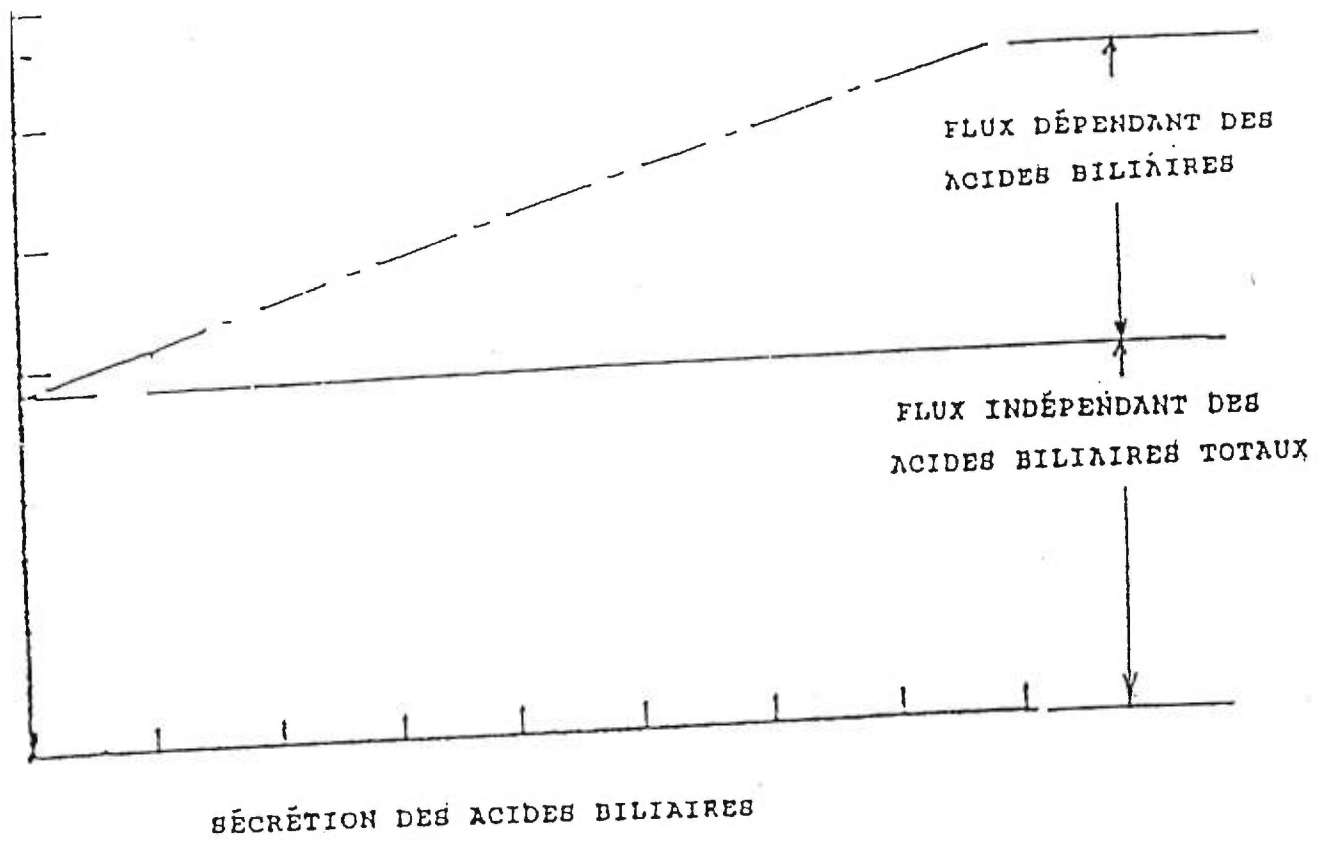


Figure 2. Relation entre le débit biliaire et la sécrétion des acides biliaires dans la bile (Adapté de Erlinger, 1994)

1.2.2.1 Débit biliaire dépendant des acides biliaires

Des travaux de Wheeler et Ramos ont permis d'établir le rôle important des acides biliaires dans la génération du flux biliaire. Ils ont montré qu'il existe une relation presque linéaire entre le débit biliaire et la sécrétion des acides biliaires (Wheeler et Ramos, 1960). Cependant, tous les acides biliaires n'ont pas la même capacité cholérétique. La majorité des acides biliaires conjugués augmente le flux de 9 à 15 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ d'acides biliaires, et les acides biliaires libres, à l'exception de l'acide cholique, augmentent le flux de 20 à 25 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ d'acides biliaires (Gurantz et Hoffman, 1984). Le taurocholate est très souvent utilisé comme modèle dans l'étude du débit biliaire dépendant des acides biliaires.

Le transport hépatique des acides biliaires implique plusieurs étapes. Les acides biliaires devront tout d'abord diffuser à travers les fenêtres des cellules endothéliales des sinusoides avant d'entrer dans les hépatocytes. Ces fenêtres, qui contrôlent les échanges entre le sang et l'espace périsinusoïdal, ont un diamètre de 100 μm . Une fois dans les hépatocytes, ils vont être transportés vers les membranes canaliculaires et vont finalement entrer dans les canalicules. Ces processus de transport ont lieu à cause du grand degré de polarisation des hépatocytes ayant plusieurs systèmes de transport localisés au niveau de la membrane basolatérale, à l'intérieur de la cellule et au niveau de la membrane canaliculaire.

1.2.2.1.1 Capture hépatique des acides biliaires

Dans les conditions physiologiques, plus de 95% des sels biliaires sécrétés dans la bile proviennent de la circulation entérohépatique et moins de 5% sont synthétisés de novo. Les acides biliaires absorbés de l'intestin et retournés au foie par la voie portale, sont liés principalement à l'albumine (Burke et al., 1971; Kramer et al., 1979). La capture hépatique est surtout périportale (Traber et al., 1989), mais elle pourrait aussi se faire par les hépatocytes de la région centrolobulaire (Gumucio et al., 1978). La capture est facilitée par la présence des larges fenêtres entre les cellules endothéliales des sinusoides, permettant un accès facile des complexes albumine-sel biliaire à l'espace de Disse et un contact direct de ces complexes avec les cellules du foie.

La pénétration des acides biliaires dans les hépatocytes se fait contre leur gradient électrochimique, par des systèmes de transport Na^+ -dépendant et Na^+ -indépendant (Frimmer et Ziegler, 1988; Nathanson et Boyer, 1991). La majorité de la capture hépatique des acides biliaires se fait par les transporteurs Na^+ -dépendants, nécessitant de l'énergie (Glasinovic et al., 1975; Schwartz et Barth, 1979; Scharschmidt et Stephens, 1981; Van Dyke et al., 1982). Le gradient transmembranaire de sodium est maintenu par l'activité $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ située sur le domaine basolatéral de la membrane cellulaire (Blitzer et Boyer, 1978; Loria et al., 1991). Plusieurs études rapportent des sites de liaison spécifiques des

acides biliaires sur la membrane sinusoïdale (Accatino et Simon, 1976; Anwer et al., 1977).

Plusieurs études ont permis de caractériser le système de transport Na^+ -dépendant (Kramer et al., 1982 ; Wieland et al., 1984; Von Dippe et al., 1986; Ziegler et al., 1989). Ce transporteur reconnaît le taurocholate, le glycocholate, le cholate et le glycochéno-déoxycholate (Van Dyke et al., 1982). Les autres acides biliaires tels que le chéno-déoxycholate, le déoxycholate et le lithocholate sont transportés dans la cellule par une simple diffusion, non saturable et indépendante du sodium (Van Dyke et al., 1982). On a utilisé des anticorps monoclonaux spécifiques pour mieux caractériser la protéine impliquée dans le système de transport (Ananthanarayanan et al., 1988). Il s'agit d'une protéine de 48 kDa qui a été isolée et purifiée, et le transport du taurocholate a été reconstruit dans les liposomes artificiels. Une autre protéine de 54 kDa responsable du transport des acides biliaires a été aussi identifiée. Il s'agit d'un transporteur indépendant du sodium (Kramer et al., 1982; Fricker et al., 1987). Récemment, on a démontré qu'un transporteur " Na^+ -Taurocholate Cotransporting", localisé au niveau de la membrane sinusoïdale, est impliqué dans la capture des acides biliaires (Meier, 1995; Karpen et al., 1996; Meier et al., 1997). D'autres travaux récents ont identifié la présence d'autres transporteurs, "Organic Anion Transporting Polypeptide " 1 et 2 (Jacquemin et al., 1994; Kullak-Ublick et al., 1996).

1.2.2.1.2 Transport intracellulaire des acides biliaires

Après leur capture hépatique, le transport des acides biliaires de la membrane basolatérale vers la membrane canaliculaire se fait par au moins deux voies de transport (Graf, 1983), dont l'une implique la liaison des acides biliaires à des protéines cytosoliques (Kitamura et al., 1990) et la deuxième implique un système de transport vésiculaire dépendant du système des microtubules (Crawford et al., 1988; Lamri et al., 1988).

Le transport intracellulaire des acides biliaires est très rapide (moins de deux minutes), ce qui suggère la présence de mécanismes de transport spécifiques. Trois grandes familles de protéines ayant une grande affinité pour les acides biliaires ont été identifiées : la glutathione-S-transférase, la protéine liante des acides gras et la 3α -hydroxystéroïde déshydrogénase.

Plusieurs études ont démontré que le transport vésiculaire des acides biliaires implique le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ce transport est plus lent et est utilisé lorsque la concentration d'acides biliaires est élevée (Jones et al., 1979; Suchy et al., 1983; Crawford et al., 1988; Crawford et Gollan, 1991). Cependant, les mécanismes de transport intracellulaire entre les pôles opposés des hépatocytes ne sont pas encore très bien compris.

1.2.2.1.3 Sécrétion canaliculaire des acides biliaires

La sécrétion hépatique des acides biliaires est le déterminant majeur de l'excrétion de l'eau et des solutés dans la bile (Sperber, 1959; Erlinger et Dhumeaux, 1974) et a lieu contre un gradient de concentration. Elle semble être l'étape limitante dans le passage des acides biliaires du sang vers la bile (Boyer, 1971; Inoue et al., 1983; Meier et al., 1984; Erlinger, 1994). Deux mécanismes semblent être impliqués dans la sécrétion canaliculaire des acides biliaires : le premier utilise une différence de potentiel membranaire et le second est un processus dépendant de l'hydrolyse de l'ATP.

Une protéine a été identifiée en utilisant le marquage par photoaffinité (Ruetz et al., 1987) et introduite dans des liposomes artificiels (Ruetz et al., 1988). Il s'agit d'une protéine transmembranaire de 100 kDa. Elle est saturable et Na^+ -indépendante (Inoue et al., 1984) et utilise le potentiel électrique membranaire pour faciliter le transport des acides biliaires. L'utilisation du potentiel électrique cellulaire semble être le principal vecteur permettant la sécrétion canaliculaire de taurocholate. Ce système de transport a plus d'affinité pour les acides biliaires trihydroxylés et les conjugués des dihydroxylés (Weinman et al., 1989). Toutefois, un système de transport de taurocholate dépendant de l'ATP contribue également à la sécrétion canaliculaire (Muller et al., 1991; Nishida et al., 1991; Sippel et al., 1993). Les glycoprotéines-P ("multidrug resistance 1 et 2") et la "Multidrug Resistance-associated Protein" seraient impliquées dans ce système de

transport (Smith et al., 1993; Mayer et al., 1995). Une étude récente a mis en évidence la présence d'une glycoprotéine appelée spgp dans le foie du porc, qui appartient à la famille des transporteurs dépendants d'ATP (Suchy et al., 1997).

1.2.2.2 Débit biliaire indépendant des acides biliaires

Des études sur le foie de rat isolé effectuées par Boyer et Klatskin (Boyer et Klatskin, 1970) ont mis en évidence la présence d'un flux biliaire indépendant des acides biliaires. Les chercheurs ont observé que même en absence complète des acides biliaires, le taux de formation biliaire demeure élevé. Il représente presque 50% du débit biliaire total (Van Dyke et al., 1982). Il semblerait que le flux biliaire indépendant des acides biliaires soit d'origine canaliculaire, et il augmente en présence d'hormones (insuline et glucagon), d'analogues de cAMP et d'agent pharmacologique (Thomsen et Larsen, 1981; Thomsen 1983; Barnhart et Combes, 1974).

On pense que la formation de la bile indépendante des acides biliaires dépend surtout du transport des ions inorganiques sans l'activité de la pompe Na^+/K^+ (Van Dyke et al., 1982). Plusieurs systèmes de transport d'électrolytes ont été caractérisés sur la membrane plasmique de l'hépatocyte (figure 3) : le système antiport Na^+/H^+ et le système de cotransport $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ sur la membrane sinusoïdale (Renner et al., 1989) et le système antiport $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ et un canal de chlore sur la membrane canaliculaire (Meier et al., 1985; Gleeson et al., 1989).

Selon des études récentes, les cellules tapissant les canalicules biliaires, contribuent de façon importante à la formation de la bile par la sécrétion de HCO_3^- et de Cl^- (Alvaro et al., 1997; Schlenker et al., 1997). Toutefois, d'autres solutés organiques devraient aussi être impliqués dans la génération du débit canaliculaire indépendant des acides biliaires. En particulier, on a trouvé qu'il existe une bonne corrélation entre le flux biliaire indépendant des acides biliaires et le glutathion chez le rat (Ballatori et Truong, 1989; 1992).

1.2.3 Structure et biosynthèse des acides biliaires

Les acides biliaires possèdent une chaîne latérale aliphatique avec un groupement hydroxyl terminal, et un noyau stéroïde perhydrocyclopentano-phenanthrène (sans double liaison) de 24 atomes de carbone. Les cellules hépatiques forment chaque jour environ 0.5 gramme de sels biliaires. Le précurseur des sels biliaires est le cholestérol, qui peut être fourni par l'alimentation ou synthétisé par le foie au cours du métabolisme des graisses. Les acides biliaires représentent la seule voie majeure d'élimination du cholestérol et ont un rôle très important dans la régulation de sa synthèse.

La biosynthèse des acides biliaires est un processus très complexe impliquant plusieurs étapes dans la biotransformation du noyau stéroïde et de la chaîne latérale (Vlahcevic et al, 1996). L'initiation de l'oxydation du cholestérol

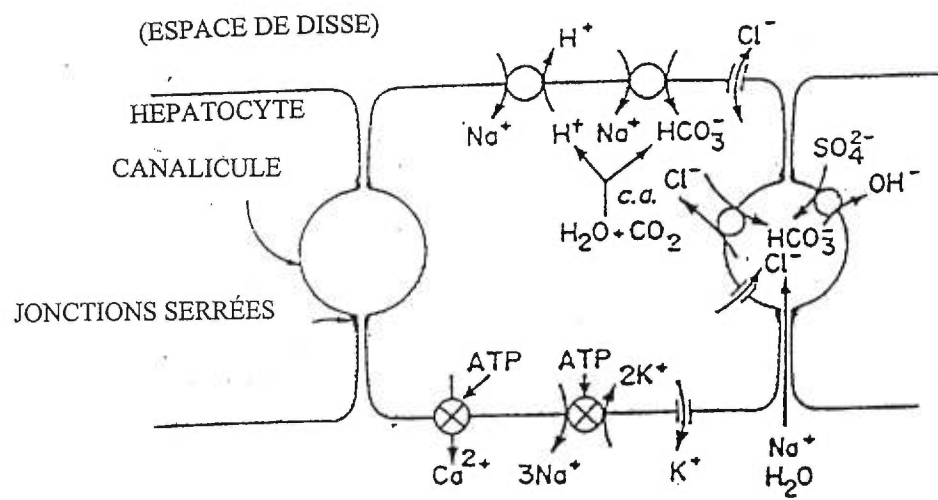


Figure 3. Le système de transport des électrolytes au niveau de la membrane plasmique de l'hépatocyte (Adapté de Erlinger, 1994).

en acides biliaires a lieu dans le foie par deux mono-oxygénases du cytochrome P450 dont la cholestérol 7 α -hydroxylase (enzyme microsomale) et la stérol 27-hydroxylase (enzyme mitochondriale) (Sheffer et al., 1970; Myant et Mitropoulos, 1977). La 7 α -hydroxylation du cholestérol par l'enzyme 7 α -hydroxylase semble être une étape limitante dans la biosynthèse des acides biliaires (Duane et al., 1983). Les acides biliaires primaires, l'acide cholique (CA) et l'acide chénodéoxycholique (CDCA), sont formés directement à partir du cholestérol, de novo, dans les hépatocytes. Ils sont respectivement des acides biliaires trihydroxylés et di-hydroxylés. La majorité de ces acides biliaires est réabsorbée au niveau de l'intestin et retourne au foie au cours du cycle entéro-hépatique. Les acides biliaires non réabsorbés sont transformés en acides biliaires secondaires par des bactéries intestinales. La modification la plus importante est la déshydroxylation à la position C-7 de l'acide cholique et de l'acide chénodéoxycholique par l'enzyme bactérienne 7 α -déshydroxylase. Cette modification donne naissance respectivement à l'acide déoxycholique (DOCA) et à l'acide lithocholique (LCA). Ces quatre acides biliaires constituent plus de 95% du pool des acides biliaires (Vlahcevic et al., 1996) (figure 4). L'acide chénodéoxycholique peut aussi se transformer en acide 7-oxo-lithocholique sous l'action de l'enzyme bactérienne 7 α -déshydrogénase (Hylemon, 1985; Carey et Duane, 1994). Le 7-oxo-lithocholique peut être réduit ensuite en acide ursodéoxycholique (Matern et Gerok, 1979). L'acide lithocholique est également métabolisé en acide ursodéoxycholique (UDCA), mais en quantité très faible. L'acide ursodéoxycholique est formé dans le foie à partir du cholestérol ou par les

bactéries du côlon. Chez l'homme, les acides biliaires communs diffèrent entre eux dans le nombre, la position, et l'orientation des groupements hydroxyles du noyau stéroïde. Ces différences modulent leur rapport hydrophile/hydrophobe et donc leur potentiel biologique. Par conséquent, ces acides biliaires ont différents effets sur les cellules hépatiques et peuvent être classés selon leur degré d'hydrophobicité (et donc hépatotoxicité) : LCA > DOCA > CDCA > CA > UDCA.

1.2.4 Propriétés physico-chimiques des acides biliaires

Les sels biliaires endogènes sont des molécules amphipathiques, possédant une extrémité non polaire liposoluble (noyau stérol) et une extrémité polaire hydrosoluble (groupement OH ou liaison avec la glycine ou la taurine). Les sels biliaires conjugués ont des pouvoirs détergents puissants (Small, 1971; Hofmann, 1984; Carey, 1985) et leur action est importante dans le maintien de l'état physique de la bile (Strasberg et Hofmann, 1990). Ils sont aussi importants dans la digestion et l'absorption des graisses. Ils s'associent dans l'eau pour former des agrégats, appelés des micelles (Kratohvil et al., 1983; Roda et al., 1983; Carey, 1985). Cette structure confère aux acides biliaires leur action détergente. Ces micelles ont la capacité d'intégrer et de solubiliser d'autres molécules lipidiques insolubles dans l'eau (cholestérol, phospholipides, acides gras) pour former des micelles mixtes (Hofmann, 1984; Cabral et Small, 1989; Strasberg et Hofmann, 1990). La formation des micelles a lieu seulement au-delà d'une certaine

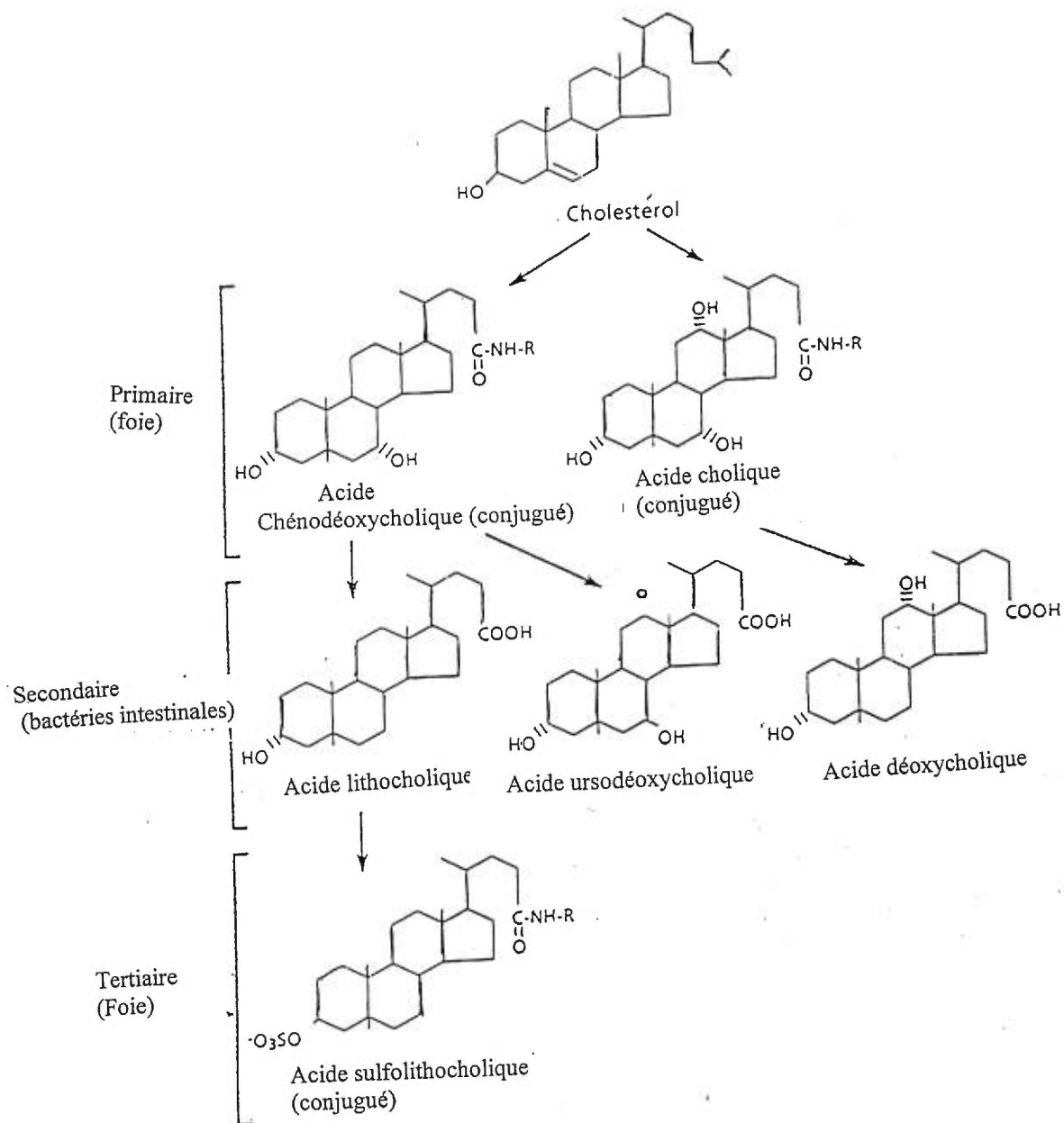


Figure 4. Structure et biosynthèse des acides biliaires primaires, secondaires et tertiaire (Adapté de Vlahcevic et al., 1996)

concentration appelée la “concentration micellaire critique” (CMC). Les acides biliaires non conjugués sont les plus hydrophobes, et les acides biliaires conjugués à la glycine sont plus hydrophobes que ceux conjugués à la taurine (Schölmerich et al., 1984). En règle générale, plus un acide biliaire est hydrophobe, plus il a tendance à s’associer dans l’eau. En conséquence, ces acides biliaires ont une CMC plus faible et ont tendance à former de plus grandes micelles. De plus, ces acides biliaires hydrophobes ont une capacité plus importante de solubiliser les phospholipides et le cholestérol et sont donc de meilleurs détergents et aussi plus nuisibles aux membranes.

La toxicité peut être évaluée par plusieurs méthodes, sur des membranes isolées, sur des cellules entières, ou même par la présence dans la circulation des enzymes membranaires ou cytosoliques. Il est démontré que les acides biliaires toxiques altèrent initialement les membranes basolatérales (sinusoïdales) et canaliculaires des hépatocytes et réduisent la stabilité membranaire. Plus tard ou à des doses plus élevées, ils endommagent les organites.

1.2.5 Conjugaison des acides biliaires

La conjugaison des acides biliaires comprend l’amidation avec les acides aminés glycine ou taurine, l’estérification avec glucuronate, sulfate, glucose ou N-acétylglucosamine.

1.2.5.1 Amidation avec les acides aminés glycine et taurine

Sous conditions normales, plus de 95% des sels biliaires sont amidés avant d'être excrétés dans la bile. L'amidation des acides biliaires se fait en deux étapes: dans une première étape, sous l'action de l'enzyme cholanoyl-coenzyme A-transférase microsomale, les acides biliaires se transforment en dérivés acides biliaires-coenzyme A. La deuxième étape correspond à leur conjugaison avec les acides aminés taurine ou glycine. Cette dernière étape se fait sous l'action de l'enzyme N-acyl-transférase microsomale et cytoplasmique. (Killenberg et Jordan, 1978; Lim et Jordan, 1981).

Cette modification est essentielle chez l'homme. La conjugaison a des effets importants sur la solubilité des acides biliaires. Elle altère les propriétés physico-chimiques des acides biliaires, augmente la polarité de la molécule et facilite son excrétion urinaire et minimise ainsi les dommages portés aux membranes. Les glycoconjugués sont solubles à un pH compris entre 4 et 6, alors que les acides biliaires libres sont insolubles à des pH inférieurs à 6-8 (Hofmann et Roda, 1984; Roda et al., 1989).

L'activité de conjugaison des acides biliaires est plus développée chez les adultes que chez les nouveau-nés (Danielsson et Rutter, 1968). Chez l'adulte, les conjugués de la glycine sont prédominants (rapport glycine/taurine 3,1 : 1), mais ce rapport peut être modifié par la disponibilité de la taurine alimentaire (Batta et

al., 1982; Hardison, 1983). Par contre, durant les premiers mois après la naissance, plus de 80% des acides biliaires sont des tauroconjugués. Environ 20 % des conjugués de la glycine et 10% des conjugués de la taurine se déconjuguent lors d'un cycle entéro-hépatique (Hepner et al., 1972; 1973). La majorité de ces acides biliaires déconjugués est réabsorbée et retourne vers le foie où elle se conjugue de nouveau (Elliot, 1985).

1.2.5.2 Sulfatation des acides biliaires

Les groupements hydroxyles des acides biliaires peuvent être sulfatés dans le foie. Cette biotransformation est considérée comme un mécanisme de protection. Chez l'homme, à l'exception de l'acide lithocholique, la sulfatation des acides biliaires est une voie mineure (Palmer, 1967). La sulfatation de cet acide biliaire est une étape importante de détoxification chez l'homme (Cowen et al., 1975). L'acide lithocholique, absorbé du côlon, est amidé et partiellement sulfaté à la position 3α -hydroxyle dans le foie par l'enzyme sulfotransférase cytoplasmique (Chen et al., 1977; Killenberg et Jordan, 1978 ; Loof et Hjerten, 1980). La sulfatation augmente sa solubilité et accélère son élimination de la circulation entérohépatique (Cowen et al., 1975).

1.2.5.3 Glucuronidation des acides biliaires

La glucuronidation est aussi une voie de biotransformation mineure (quantitativement) pour les acides biliaires endogènes naturels (Takikawa et al., 1985). Elle augmente la polarité des acides biliaires pour faciliter leur excrétion urinaire. La glucuronidation peut se faire sur les groupements hydroxyles de la chaîne latérale ou du noyau, ou sur les groupements carboxyles de la chaîne latérale, alors que l'estérification avec les sulfates, glucose (Matern et Matern, 1987), ou N-acétylglucosamine (Marschall et al., 1989) peut se produire seulement sur les groupements hydroxyles. On observe une augmentation de ces conjugués dans la bile, le sérum et l'urine des personnes atteintes de cholestase, alors qu'on en retrouve très peu sous conditions normales.

1.2.6 Circulation entérohépatique des acides biliaires

Les acides biliaires sont synthétisés et conjugués dans le foie, sécrétés dans la bile et sont emmagasinés temporairement dans la vésicule biliaire. Après un repas, ils sont libérés avec la bile dans le petit intestin. La majorité des acides biliaires est réabsorbée sous forme conjuguée au niveau de l'iléon, par un mécanisme de transport actif, et ils retournent par la circulation porte vers le foie, où ils sont captés au niveau du pôle sinusoidal des hépatocytes par des systèmes de transport à haute capacité. Ceci explique la faible concentration des acides

biliaires dans la circulation générale. Ensuite, les acides biliaires sont sécrétés dans la bile à partir du pôle canaliculaire de l'hépatocyte par un système de transport actif, contre un gradient de concentration. La fraction des acides biliaires non réabsorbée au niveau de l'iléon, est déconjuguée ou transformée en acides biliaires secondaires par les bactéries du côlon. La quantité d'acides biliaires dans la circulation entéro-hépatique est définie comme le pool d'acides biliaires circulants. La circulation entérohépatique permet une conservation intestinale très efficace : environ 95% des acides biliaires circulants sont réabsorbés à chaque passage à travers l'intestin. La faible quantité d'acides biliaires perdue à chaque jour (400 à 600 mg/jour) est remplacée par des acides biliaires nouvellement synthétisés, maintenant ainsi le pool d'acides biliaires à un niveau constant (Vlahcevic et al., 1996). La circulation entérohépatique des acides biliaires est démontrée dans la figure 5.

1.2.7 Lipides biliaires

Dans la bile, le cholestérol et les phospholipides (surtout phosphatidylcholine) constituent les composés lipidiques principaux. La sécrétion d'acides biliaires est associée avec une libération simultanée de cholestérol et de phospholipides (Gurantz et Hofmann, 1984; Alpini et al., 1988; Smith et al., 1993). En général, les acides biliaires non conjugués induisent une plus grande sécrétion des phospholipides et du cholestérol (Gurantz et Hofmann,

1984). Toutefois, les mécanismes impliqués dans la sécrétion des lipides biliaires ne sont pas très bien connus. Hardison et Apter (Hardison et Apter, 1972) ont proposé l'hypothèse que la sécrétion biliaire des phospholipides et du cholestérol a lieu par la formation des micelles. Selon ce modèle simple, les acides biliaires sont concentrés dans la lumière canaliculaire jusqu'à ce que la CMC soit atteinte. Les acides biliaires vont ensuite extraire le cholestérol et les phospholipides des membranes pour former des micelles mixtes. Cette hypothèse est basée sur le fait que le déshydrocholate (analogue d'acide biliaire), avec une faible capacité de former des micelles, a très peu ou pas d'effets sur la sécrétion biliaire du cholestérol et de lécithine chez le rat (Yousef et al., 1990). Toutefois ce modèle ne permet pas d'expliquer certains résultats. En particulier, on a constaté que la sécrétion du cholestérol et des phospholipides par la bile devient très importante lorsque le taux de sécrétion des acides biliaires est très faible et qu'elle diminue avec une augmentation du taux de sécrétion d'acides biliaires (LaRusso et al., 1975; Northfield et Hofmann, 1975; Wagner et al., 1976; Lindblad et al., 1977).

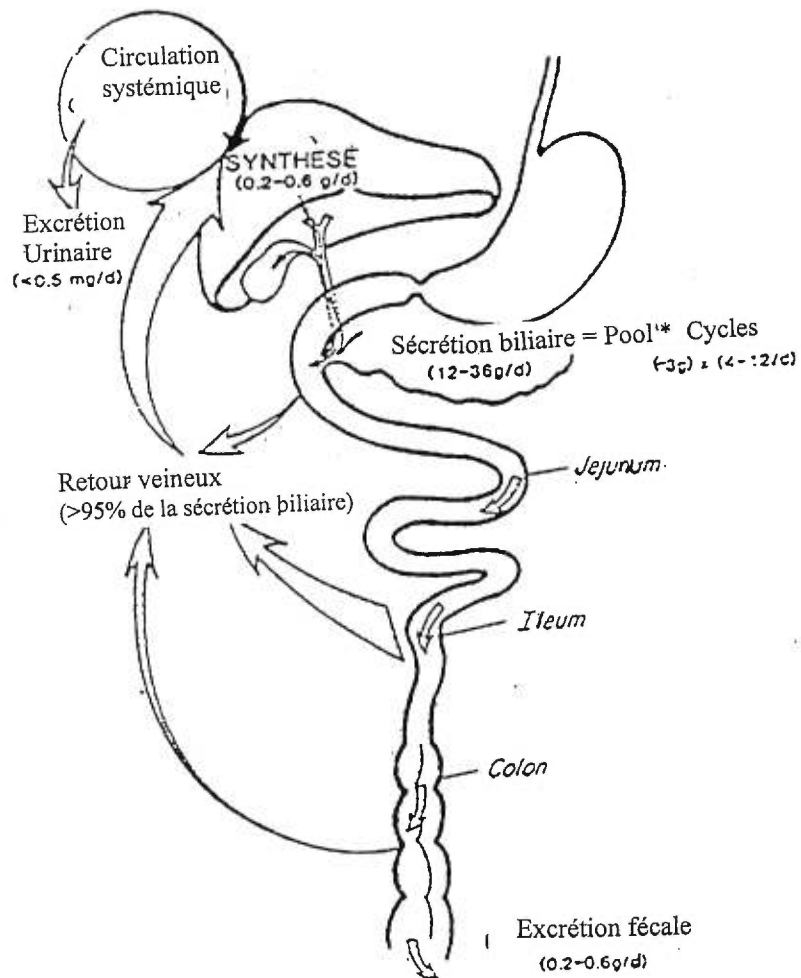


Figure 5. La circulation entérohépatique des acides biliaires (Adapté de Carey et Douane, 1994)

La théorie de sécrétion vésiculaire (Coleman, 1987; Rea et al., 1993) postule l'existence de domaines lipidiques au niveau de la membrane canaliculaire qui contiennent des lipides destinés à la sécrétion dans la bile. Cohen et al. ont suggéré la présence d'un transporteur protéique pour les phospholipides et d'une translocase au niveau de la membrane canaliculaire qui pourrait faciliter le transport des phospholipides à des sites de sécrétion dans la membrane canaliculaire (Cohen et al., 1992). Cependant on ne sait pas encore comment les acides biliaires pourraient moduler ce processus.

1.2.8 Métabolisme des acides biliaires sériques en cholestase

La cholestase se définit comme une diminution de la sécrétion biliaire qui s'accompagne d'une accumulation des composés de la bile dans le plasma et les tissus (Philips et al., 1986) et une diminution de leur concentration dans la bile et l'intestin. La circulation entérohépatique est alors perturbée; la capture, le transport et la sécrétion des acides biliaires par le foie ainsi que leur absorption dans l'intestin semblent être affectés et, par conséquent, le profil des acides biliaires est changé. La manifestation la plus importante reliée à la détérioration de la sécrétion biliaire est la rétention des acides biliaires qui ont des effets toxiques sur les membranes cellulaires et les organites (Palmer, 1972), et aussi sur le métabolisme hépatocytaire, la sécrétion des lipides (Coleman, 1987) et les enzymes (Coleman et al., 1977). Les niveaux d'acides biliaires sériques

augmentent beaucoup dans les maladies hépatiques cholestatiques, en particulier la cirrhose biliaire primitive et la cholangite sclérosante primitive.

Depuis longtemps, on a considéré les acides biliaires comme responsables des lésions hépatiques lorsqu'une obstruction hépatobiliaire est présente. Les acides biliaires, conjugués ou libres, sont des molécules cytotoxiques à des concentrations supérieures à 100-500 μM . Javitt et Emerman (Javitt et Emerman, 1968) ont constaté que l'administration chronique de l'acide lithocholique cause la cholestase chez le rat. Dans d'autres études, l'administration orale et chronique de cet acide biliaire a causé la cirrhose chez le lapin (Holsti, 1960). Cette hépatotoxicité de l'acide lithocholique n'était pas éliminée par la conjugaison, la sulfatation ou la glucuronidation (Oelberg et al., 1984 ; Kuipers et al., 1985). Des études expérimentales démontrent que les autres acides biliaires peuvent aussi provoquer la cholestase et endommager les cellules hépatiques lorsqu'ils sont administrés à des doses élevées.

Dans les premiers stades de cholestase, le niveau sérique des acides biliaires est augmenté, mais la sécrétion biliaire est relativement normale (Roda et al., 1989). Dans un stade plus avancé de cholestase (surtout dans la cirrhose biliaire primitive), la synthèse hépatique des acides biliaires, en particulier celle de l'acide cholique, se détériore (Williams et al., 1979). À cause de l'absence des acides biliaires dans l'intestin, le cholestérol provenant de la diète alimentaire

n'est pas absorbé. Le cholestérol n'entre pas dans l'intestin par la bile et alors, les pertes fécales du cholestérol et des acides biliaires endogènes deviennent négligeables.

La composition en acides biliaires n'est pas trop affectée au début de la maladie (Crosignani et al., 1991). Chez les personnes saines, le cholate, le chénodéoxycholate et le déoxycholate sont les acides biliaires prédominants dont le rapport est d'environ 1:1:0,5 (Sjövall, 1960). En cholestase, la concentration sérique de DOCA est relativement réduite. Cette réduction de DOCA est relié à une réduction de l'excrétion biliaire de CA, suivie d'une baisse au niveau de la formation bactérienne de DOCA au niveau de l'intestin (Mehta et al., 1974). Chez les patients dont la cholestase n'est pas trop sévère, le rapport des acides biliaires trihydroxylés: dihydroxylés dans le sérum est supérieur à 1. Avec des dommages hépatocellulaires sévères, la synthèse hépatique de CA est réduite et ce rapport devient souvent inférieur à 1 (Carey, 1968). Le rapport des acides biliaires trihydroxylés: dihydroxylés a été rapporté comme étant utile dans la distinction des différentes causes des maladies hépatiques, lorsque la concentration des acides biliaires sériques est élevée (Pennington et al., 1977; Berk et Javitt, 1978; Linnet et Kelback, 1982; Azer et al., 1993). On observe normalement une diminution des acides biliaires secondaires (déoxycholate et lithocholate) formés dans l'intestin et une augmentation des acides biliaires polyhydroxylés formés dans le foie. À cause d'une détérioration de la sécrétion biliaire dans les maladies

hépatobiliaires, il y aurait une quantité moins importante des acides biliaires cholique et chénodéoxycholique disponible à la flore intestinale (Mehta et al., 1974; Stiehl, 1978). Cependant, à cause d'une diminution de la clairance hépatique et de la sécrétion de l'acide déoxycholique et de l'acide lithocholique, ils sont retenus dans le plasma et le foie; ils se conjuguent surtout aux sulfates pour faciliter leur clairance rénale (Stiehl et al., 1978; Hofmann et Cummings, 1982). Habituellement, chez la majorité des patients, les acides biliaires déoxycholique et lithocholique constituent une petite fraction (< 10%) des acides biliaires totaux dans le sérum (Bloomer et al., 1976; Fausa et Shalhegg, 1977; Pennington et al., 1977). Plus la cholestase devient sévère, plus les concentrations sériques de ces deux acides biliaires diminuent et deviennent très faibles ou non détectables lorsque l'obstruction biliaire est complète (Summerfield et al., 1977; Hedenborg et al., 1982; Takikawa et al., 1983).

Le rapport glycine : taurine varie beaucoup chez les sujets normaux, mais normalement, il est supérieur à 1 (Ostrow, 1993). Ce rapport a tendance à diminuer dans toutes les maladies hépatobiliaires à cause d'une diminution de la conjugaison avec la glycine. Cette valeur varie beaucoup selon différentes études et même parmi les patients avec des maladies hépatiques similaires, et peut être affectée grandement par la disponibilité de la taurine alimentaire.

1.3 Cirrhose biliaire primitive (CBP)

1.3.1 Définition et caractéristiques de la maladie

La cirrhose biliaire primitive (CBP) est une cholestase chronique qui se caractérise par une destruction segmentaire des canaux biliaires interlobulaires. Cette destruction a pour conséquences une obstruction biliaire et une cholestase, avec, notamment, une accumulation d'acides biliaires dans le foie. Les lésions d'origine immunologique semblent être impliquées dans l'apparition de la maladie. Les acides biliaires, par leur action détergente, induisent une nécrose hépatocytaire et une fibrose qui progresse vers une cirrhose biliaire. On observe une détérioration de la clairance des acides biliaires qui mène à des concentrations élevées dans le sérum et une excrétion élevée dans l'urine.

La maladie évolue en trois phases: asymptomatique, cholestatique puis terminale. La CBP atteint principalement les femmes âgées entre 30 et 65 ans (environ 90% des cas). Une minorité des patients sont des hommes et les symptômes sont moins fréquents que ceux présents chez les femmes. La progression de la maladie varie beaucoup entre les patients. La rétention de quantités élevées de chénodéoxycholate et de cholate dans le foie et dans la circulation systémique pourrait favoriser des lésions. Jusqu'à présent, il n'y a pas de traitement efficace pour la cirrhose biliaire primitive. La transplantation hépatique demeure le traitement de choix lorsque la maladie atteint la phase

terminale. Plusieurs médicaments ont été essayés: azathioprine (Heathcote et al., 1976; Christensen et al., 1985), corticostéroïdes (Mitchison et al., 1986), D-pénicillamine (Bodenheimer et al., 1985; Neuberger et al., 1985), chlorambucil (Hoofnagel et al., 1986). Cependant, ces médicaments, dont certains peuvent être utiles dans le traitement des symptômes, n'ont pas empêché la progression de la maladie (Stellard et al., 1979; Hoenschi et al., 1985). D'autres médicaments semblent utiles dans le ralentissement de la progression de la maladie (Bodenheimer et al., 1988). Des anomalies histologiques persistent et souvent, les patients souffrent des effets secondaires du traitement. Les données actuelles démontrent que l'administration à long terme de l'acide ursodéoxycholique est sans risque et efficace au début de la maladie.

Avant les années 70, la maladie était diagnostiquée seulement à la phase terminale (cholestase, signes d'hypertension portale et insuffisance hépatocellulaire). La plupart des patients ont présentement un diagnostic bien avant la phase terminale: certains sont asymptomatiques, d'autres souffrent de prurit. Le prurit est le symptôme caractéristique de la maladie et son intensité varie considérablement parmi les patients. La jaunisse peut suivre le prurit et, une fois présente, elle a tendance à persister ou devenir plus prononcée. Ce phénomène résulterait directement de la destruction et du dysfonctionnement des canalicules biliaires interlobulaires. Le prurit est présent chez 70-80% des patients atteints de la cirrhose biliaire primitive, et dans 10% des cas il peut être assez sévère pour interférer avec leur qualité de vie. La pathogénèse du prurit est encore

inconnue (Freedman et al., 1981; Ghent, 1987; Bergasa et Jones, 1993). Les acides biliaires jouent probablement un rôle important mais d'autres facteurs seraient sûrement impliqués. D'après certaines études, le prurit est relié à des concentrations élevées d'acides biliaires endogènes dans le sérum (Neale et al., 1971; Murphy et al., 1972), qui ont pour conséquence une concentration élevée sous la peau, alors que d'autres études n'ont pas pu confirmer une corrélation entre le prurit et le niveau d'acides biliaires sous la peau (Ghent et al., 1977). Toutefois, il est important de noter que ce ne sont pas tous les patients avec une obstruction biliaire et des niveaux sériques élevés d'acides biliaires qui souffrent de prurit.

Présentement, dans 30 à 50% des cas, la maladie est diagnostiquée en absence de tout symptôme (Fleming et al., 1978; Brenard et al., 1990). Dans plusieurs cas, c'est par des anomalies dans des tests de laboratoire (la phosphatase alcaline, la γ -glutamyl transpeptidase et les transaminases) qu'on arrive à détecter la maladie. Les mécanismes et les agents responsables de l'inflammation et de la destruction des canalicules biliaires ne sont pas encore très bien connus. Normalement, les cliniciens se basent sur certains tests de laboratoire dans l'évaluation des maladies hépatiques : les tests biochimiques, les acides biliaires et la bilirubine.

Les tests de fonction hépatique sont utilisés pour détecter la présence des maladies hépatiques, suggérer la cause et la sévérité et aussi pour contrôler

l'efficacité du traitement. Les aminotransférases, aspartate (AST) et alanine (ALT), la phosphatase alcaline (PA) et la γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) sont des indicateurs de nécrose hépatocellulaire et de cholestase fréquemment utilisés lors du diagnostic des maladies hépatiques. L'ALT est localisée principalement au niveau du foie alors que l'AST est présente dans plusieurs tissus (cœur, muscles squelettiques, reins, cerveau et foie). L'AST se trouve dans le cytosol et dans les mitochondries des hépatocytes alors que l'ALT est présente seulement dans le cytosol (Rej, 1978). La phosphatase alcaline appartient à une famille d'isoenzymes qui catalyse l'hydrolyse des esters de phosphate à un pH optimum alcalin. La γ -glutamyl transpeptidase catalyse le transfert des groupements γ -glutamyl des peptides à d'autres acides aminés. Cette enzyme est présente au niveau de tout l'arbre biliaire. Sa concentration est plus élevée dans les cellules épithéliales au niveau des ductules biliaires.

La détection des acides biliaires dans le sérum est un indice très utile lorsque la fonction hépatique se détériore. Dans des maladies cholestatiques, la circulation et le métabolisme des acides biliaires sont altérés, la clairance hépatique est diminuée et leur concentration tissulaire et sérique sont augmentées. Les acides biliaires sériques sont très élevés dans les conditions cholestatiques, en particulier la cirrhose biliaire primitive et la cholangite sclérosante primitive. Alors que les niveaux des aminotransférases sériques reflètent le degré de lésion des hépatocytes, les niveaux d'acides biliaires sériques reflètent non seulement les lésions hépatocytaires mais aussi une altération de l'absorption intestinale, de la

capture hépatique, de l'excrétion et de la circulation entérohépatique (Reichen et al., 1988; Azer et al., 1993).

La bilirubine est le principal pigment biliaire. Lorsque les globules rouges se dégradent, le fer, la globine et la bilirubine (dérivé de l'hème) sont libérés. Le fer et la globine sont recyclés, mais une partie de la bilirubine est excrétée dans les canaux biliaires. C'est la bilirubine qui donne à la bile sa couleur jaune caractéristique. Après son entrée dans l'intestin avec la bile, la bilirubine est modifiée par des enzymes bactériennes pour former des pigments marron qui donnent aux matières fécales leur couleur caractéristique. Au cours de leur passage dans l'intestin, certains pigments biliaires sont réabsorbés dans le plasma et sont finalement excrétés dans l'urine, donnant à l'urine sa couleur jaune. La bilirubine est un indice important dans le pronostic et l'évaluation de la fonction hépatique (Child et Turcotte, 1964; Dickson et al., 1989; Bonnaud et al., 1998). Son niveau sérique élevé ($> 70 \mu\text{mol/l}$) en association avec des tests hépatiques anormaux signifie la présence de maladie hépatique. Dans ces situations, au moins 50% de la bilirubine dans le sérum est sous la forme conjuguée. L'hyperbilirubinémie conjuguée est le résultat d'une détérioration de l'excrétion intrahépatique de bilirubine ou d'une obstruction extrahépatique.

1.3.2 L'acide ursodéoxycholique dans le traitement médical de la cirrhose biliaire primitive

L'acide ursodéoxycholique est présent dans la bile humaine normale en faible concentration (<4%) (Hirano et al., 1981). Cependant, il constitue l'acide biliaire principal de la bile de l'ours noir. Au Japon et en Chine, la bile de l'ours a été utilisée pendant plusieurs siècles dans le traitement des maladies hépatiques et gastro-intestinales. Sa commercialisation a eu lieu en 1957 au Japon. À partir des années 1960, les Japonais ont commencé à étudier les effets bénéfiques de l'acide ursodéoxycholique (Ichida, 1961 ; Mijayi et al., 1976). Il a été utilisé pour la première fois au début des années 1970 dans la dissolution des calculs biliaires cholestéroliques de la vésicule biliaire. Cet acide biliaire est maintenant devenu un traitement couramment utilisé dans des maladies cholestatiques chroniques (Queneau et Montet, 1994; Rubin et al., 1994).

L'acide ursodéoxycholique a été testé dans plusieurs maladies hépatiques cholestatiques (Cotting et al., 1990; Plevris et al., 1991; Stiehl et al., 1991; Svanik et al., 1991; Palma et al., 1992), mais il a été utilisé surtout dans le traitement de la cirrhose biliaire primitive et de la cholangite sclérosante primitive. Fischer et Paradine furent les premiers à rapporter les effets bénéfiques de l'acide ursodéoxycholique dans la cirrhose biliaire primitive (Fischer et Paradine, 1986). Plus tard, en 1987, Poupon et al. rapportaient les résultats d'une étude pilote non contrôlée de l'acide ursodéoxycholique chez 15 patients atteints de cirrhose

biliaire primitive (Poupon et al., 1987). C'était la première fois qu'on observait un effet bénéfique d'un médicament sans effets secondaires dans cette maladie: cet essai a montré une amélioration des phosphatases alcalines, des transaminases et de la γ -GT chez tous les patients. De plus, les patients ont montré une détérioration des tests hépatiques lorsque le traitement a été interrompu et une amélioration lorsque le traitement a été rétabli. Dans cette étude, les chercheurs ont postulé que l'acide ursodéoxycholique pourrait déplacer les acides biliaires endogènes dans la circulation entérohépatique et renverser leur cytotoxicité.

1.3.2.1 Structure et propriétés physico-chimiques de l'acide ursodéoxycholique

L'acide ursodéoxycholique (acide 3α - 7β dihydroxy- 5β cholanoïque) est un acide biliaire secondaire lorsqu'il est formé dans le côlon et est un acide biliaire tertiaire lorsqu'il est formé dans le foie (Fromm et al., 1980; 1983). La conversion de l'acide chénodéoxycholique en acide ursodéoxycholique se fait en deux étapes, par épimérisation bactérienne du groupe hydroxyle en position 7 de l'acide chénodéoxycholique (Ward et al. , 1984). Le placement du groupement OH sur la face β diminue le lien H et augmente l'hydrophilicité de l'acide ursodéoxycholique en comparaison avec l'acide chénodéoxycholique (Soloway et al., 1995). L'acide ursodéoxycholique est plus hydrosoluble que les deux autres acides biliaires dihydroxylés, le chénodéoxycholate et le déoxycholate. La

polarité plus élevée de l'acide ursodéoxycholique explique que sa concentration micellaire critique (CMC) soit élevée, environ deux fois celle du chénodéoxycholate (Roda et al., 1989), reflétant sa tendance moins importante que pour les autres acides biliaires à former des micelles. Par conséquent, il possède une capacité moins importante de partition membranaire et de solubilisation des lipides membranaires.

1.3.2.2 Métabolisme et mécanismes d'action de l'acide ursodéoxycholique dans le traitement de la cirrhose biliaire primitive

L'acide ursodéoxycholique est peu soluble dans l'intestin grêle proximal. Environ 30-60% de l'acide ursodéoxycholique administré oralement est absorbé (Parquet et al., 1985). Sous sa forme libre, il s'absorbe au niveau du jéjunum et de l'iléon par un mécanisme de transport passif non ionique (Stiehl et al., 1988). Environ 20% pourrait être absorbé au niveau du côlon (Mekhjian et al., 1979). Ses tauroconjugués sont absorbés dans l'iléon par un transport actif (Wong et al., 1994), alors que les glycoconjugués y sont absorbés par un mécanisme passif (Montagni et al., 1993) et actif (Amselberg et al., 1994). Dans l'intestin, les conjugués de l'acide ursodéoxycholique sont partiellement déconjugués et absorbés au niveau de l'intestin (Stiehl et al., 1988); l'acide ursodéoxycholique en circulation est lié à 99% à l'albumine. Une biotransformation bactérienne totale a lieu avant l'élimination de l'acide ursodéoxycholique. Le métabolisme de la

forme conjuguée dans l'intestin grêle se fait par déconjugaison puis déshydroxylation en acide lithocholique par la flore microbienne (Hofmann, 1994). Le produit nonconjugué n'est pas réabsorbé et est éliminé dans les selles.

Les mécanismes d'action de l'acide ursodéoxycholique ne sont pas encore très bien compris. Son effet bénéfique a été étudié en utilisant différents modèles expérimentaux chez l'animal. Il protège contre l'hépatotoxicité des acides biliaires in vivo et in vitro, sur le foie isolé perfusé et les hépatocytes isolés (Schmucker et al., 1988; Galle et al., 1989; Heuman et al., 1989). De même, lorsque les hépatocytes en culture sont placés dans un milieu contenant à la fois du chénodéoxycholate et de l'ursodéoxycholate, le relargage des enzymes est considérablement réduit (Galle et al., 1989). Sa toxicité est minime et n'apparaît qu'à de fortes doses. À l'heure actuelle, les effets bénéfiques de l'acide ursodéoxycholique sont expliqués par trois mécanismes principaux : modification de la circulation entérohépatique, effet cytoprotecteur et effet sur le système immunitaire. Cependant, aucun d'entre eux ne peut isolément rendre compte de l'effet bénéfique de cette molécule.

1.3.2.2.1 Modification de la circulation entérohépatique

Le premier mécanisme proposé pour expliquer l'effet bénéfique de l'acide ursodéoxycholique correspond à une modification de la circulation entérohépatique. Ainsi, l'absorption iléale des acides biliaires toxiques est inhibée et la sécrétion biliaire est augmentée. Après l'administration de l'acide

ursodéoxycholique, on observe une diminution du pool des acides biliaires qui peut s'expliquer par l'action de cette substance au niveau de la dernière anse iléale. Chez des sujets atteints d'une maladie hépatique cholestatique, l'acide ursodéoxycholique devient l'acide biliaire principal dans la circulation (Eusufzai et al., 1991) et on observe une diminution de la concentration des acides cholique et chénodéoxycholique dans le sérum (Batta et al., 1989; Mazella et al., 1991). Selon Stiehl et al. (Stiehl et al., 1990), les résultats devraient être interprétés en fonction de la maladie puisque, dans la cirrhose biliaire primitive, la concentration sérique d'acide cholique n'est diminuée qu'aux stades précoces. De plus, à part des variations dans les concentrations sériques des acides biliaires endogènes, les hépatocytes sont en contact avec une quantité plus importante d'acide ursodéoxycholique et des concentrations plus faibles d'acides biliaires toxiques. La diminution des acides biliaires endogènes toxiques pourrait se faire par une inhibition compétitive de leur absorption par transport iléal actif sous l'effet des conjugués de l'acide ursodéoxycholique.

1.3.2.2.2 Effet cytoprotecteur

Des études *in vitro* ont montré que l'acide ursodéoxycholique protège contre la toxicité induite par les acides biliaires hydrophobes (Palmer, 1972; Kanai et Kitani, 1983; Schölmerich et al., 1984; Heuman et al., 1991). Il prévient la rupture de la membrane canaliculaire observée dans les affections cholestatiques (Heuman et al., 1991). Il réduit l'hémolyse induite par les acides

biliaires et prévient les lésions hépatocytaires induites par l'acide chénodéoxycholique (Takikawa et al., 1986). L'acide ursodéoxycholique stabilise la bicouche lipidique et réduit la solubilisation micellaire induite par des acides biliaires plus hydrophobes (Heuman, 1993). Ceci a été démontré sur des modèles vésiculaires riches en cholestérol (Heuman et Bajaj, 1994), sur des cultures d'hépatocytes humains (Galle et al., 1990), et in vivo chez l'animal (Vadakekalam et Gores, 1992). Les mécanismes de cette protection membranaire sont inconnus, mais pourraient résider dans la capacité des conjugués de l'acide ursodéoxycholique à modifier la structure et la polarité de la membrane cellulaire (Guldutuna et al., 1993).

1.3.2.2.3 Effet sur le système immunitaire

Dans le foie normal, les molécules HLA de classe I sont exprimées sur les canaux biliaires et les cellules sinusoïdales, alors que l'expression des molécules de classe II est limitée aux cellules sinusoïdales (Calmus et al., 1991). En cas de cholestase, il y a une augmentation des ARNm spécifiques du CMH de classe I (Hillaire et al., 1994), de l'expression des antigènes HLA de classe I sur les hépatocytes, mais aussi de l'expression des antigènes de classe II sur l'épithélium biliaire (Calmus et al., 1994). Il a été démontré que l'acide ursodéoxycholique possède une action sur le système immunitaire des sujets atteints de cirrhose biliaire primitive et de cholangite sclérosante primitive en altérant l'expression des molécules CMH de classe I et des antigènes HLA-DR présents sur les

membranes hépatocytaires de ces patients. Par contre, l'expression anormale des molécules HLA de classe II ne semble pas modifiée sous traitement avec UDCA (Calmus et al., 1990).

1.4 Méthodes d'analyse des acides biliaires

Les sels biliaires sont des agents émulsifiants responsables de l'absorption des lipides et des acides gras dans l'intestin et jouent un rôle important dans la régulation du niveau de cholestérol. Chez les sujets normaux à jeûn, la concentration totale des acides biliaires sériques est inférieure à 5 μM . L'obstruction biliaire et les maladies hépatiques mènent à un métabolisme anormal des acides biliaires, marqué par des variations importantes dans la concentration et les proportions des acides biliaires naturels et par le niveau élevé de leurs formes mineures. Donc, une séparation individuelle et une quantification précise de ces composés dans les échantillons biologiques sont très importantes dans l'étude de leur métabolisme et aussi dans le pronostic et le diagnostic des maladies hépatobiliaires et intestinales chez l'homme et chez d'autres mammifères.

La concentration des acides biliaires peut être mesurée par plusieurs méthodes: des méthodes enzymatiques, immunologiques, ainsi que des méthodes chromatographiques dont la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) et la

chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Parmi ces différentes méthodes, la chromatographie demeure la méthode de choix pour l'analyse détaillée des acides biliaires dans les milieux biologiques.

La sensibilité d'une méthode d'analyse est un paramètre important non seulement pour la quantification mais aussi pour l'identification, car les quantités d'échantillons disponibles sont souvent restreintes et certains composés se retrouvent à l'état de trace. Le but ultime d'analyse de tout mélange complexe est d'identifier ses différents constituants et de donner la mesure de leur concentration respective.

1.4.1 Méthodes enzymatiques

La première application de la méthode enzymatique pour l'analyse des acides biliaires a été rapportée par Iwato et Yamasaki (Iwato et Yamasaki, 1969). Le dosage des acides biliaires par des méthodes enzymatiques se fait en utilisant l'enzyme 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 α HSD), en présence de NAD (nicotinamide adénine dinucléotide). Cette méthode est avantageuse pour des analyses routinières lorsqu'on doit analyser un grand nombre d'échantillons. Il s'agit d'une méthode rapide et simple (Murphy, 1988; Roda et al., 1988). On l'utilise surtout pour l'analyse des acides biliaires dans les milieux où leur concentration est élevée (la bile et les fèces). Cependant, la méthode n'est pas très sensible dans l'analyse des acides biliaires sériques. Elle ne détecte pas les

sulfates et les glucuronides urinaires dont les proportions deviennent très importantes en cholestase (Bolt et Boyer, 1977; Bruusgaard et al., 1977). Donc, l'inconvénient de cette méthode est sa faible sensibilité et il peut y avoir des interférences provenant d'autres constituants de la matrice biologique.

1.4.2 Méthodes immunologiques

La limite de détection et la spécificité sont meilleures avec les méthodes immunologiques en comparaison avec les méthodes enzymatiques. Il s'agit d'une méthode sensible et spécifique, sauf que seuls certains acides biliaires communs (le cholate et le chénodéoxycholate) peuvent être déterminés de façon précise; les formes libres ne sont pas détectées, ou seulement partiellement mesurées à cause de la spécificité de l'anticorps pour les conjugués de taurine et de glycine. Les esters d'acides biliaires ne sont pas non plus mesurés par ces techniques (Mannes et al., 1987; Roda et al., 1988).

1.4.3 Méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques sont les méthodes de choix dans l'analyse des acides biliaires. Cependant, la chromatographie toute seule ne permet pas une détermination complète des acides biliaires dans les mélanges complexes. La chromatographie est, avant tout, une technique de séparation mais

également de quantification des constituants d'un mélange. Il existe plusieurs types de chromatographie: chromatographie sur couche mince (TLC), chromatographie gazeuse (GC), et chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Street et Setchell, 1988; Goto et Nambara, 1991).

1.4.3.1 Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)

La première application de la chromatographie gazeuse dans l'analyse des acides biliaires a été effectuée au début des années 1960 (Vanden-Heuvel et al., 1960). Elle a été utilisée plus que toute autre méthode dans l'analyse du profil des acides biliaires (Almé et al., 1977; Sjövall et al., 1985; Lawsen et Setchell, 1988). Le couplage de la chromatographie gazeuse avec un spectromètre de masse (GC-MS) est considéré comme la méthode de référence (Mannes et al., 1987; Murphy, 1988; Roda et al., 1988), étant donné sa grande sensibilité, son efficacité et sa spécificité. La méthode a été prouvée comme étant cruciale dans l'identification des acides biliaires inhabituels.

Le GC-MS est une combinaison de deux techniques microanalytiques, une technique de séparation (GC) et une technique d'identification (MS). La spectrométrie de masse (MS) est une technique analytique cruciale largement utilisée, particulièrement dans le diagnostic des désordres du métabolisme des

acides biliaires, pour identifier et quantifier les acides biliaires atypiques et pour évaluer les effets thérapeutiques sur le métabolisme des acides biliaires. Cette technique, très sensible, permet d'obtenir un spectre de masse pour un composé organique volatil. Généralement, le spectre fournit des indications précises quant à la structure et l'identité du composé analysé. Ces informations pourront être utilisées à des fins d'analyse quantitative.

L'analyse des acides biliaires par le GC-MS se fait essentiellement par deux modes : les modes SIM et balayage ("Scan"). La méthode de détection d'ions multiples, ("Selected Ion Monitoring " (SIM)), de GC-MS a été développée particulièrement pour la quantification et l'analyse des composés en faible concentration (Yanangisawa et al., 1980; Bartholomew et al., 1982). Donc, en partant du fait qu'on sait exactement ce que l'on veut mesurer (la structure chimique du composé est connue et ses caractéristiques chromatographiques sont établies), on pourrait se limiter à n'intégrer qu'une série d'ions spécifiques du composé étudié. Dans le mode balayage, la machine enregistre des balayages répétés à intervalle de quelques secondes. Cette méthode de détection est très utile lorsqu'on désire obtenir le maximum de données. On obtient un spectre de masse pour chaque composé dans un mélange complexe. On peut identifier chaque composé en comparant son spectre à des spectres contenus dans une librairie de référence. On peut aussi vérifier la présence des composés connus en cherchant leurs ions caractéristiques dans le fichier de données.

1.4.3.2 Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Des progrès majeurs ont été faits durant la dernière décennie dans l'application de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Cette technique est préférable pour l'analyse routinière des acides biliaires parce que contrairement à la chromatographie en phase gazeuse (GC), on peut mesurer directement les conjugués taurine et glycine des acides biliaires sans hydrolyse des conjugués ni préparation de dérivés volatils.

La détection des acides biliaires par les rayons UV entre 200 et 210 nm est limitée par leur capacité d'absorption à ces longueurs d'ondes, en particulier les acides biliaires non conjugués dont l'absorbance est de 20 à 30 fois moins élevée que les acides biliaires amidés. De plus, la présence d'impuretés et d'autres constituants de la matrice biologique, qui ont une plus grande absorbance à 200 nm, peuvent affecter considérablement l'identification des acides biliaires. Pour éviter ce problème, les acides biliaires peuvent subir des dérivatisations pré- et postcolonnes dans le but d'augmenter leur sensibilité aux rayons UV.

1.4.3.3 Spectromètre de masse en tandem (MS-MS)

Le spectre de masse en tandem est une nouvelle méthode analytique très puissante pour identifier différents constituants à l'intérieur de mélanges complexes. Ses principaux avantages sont sa spécificité, sa sensibilité et sa vitesse

d'analyse. Contrairement au GC-MS, le spectromètre de masse en tandem ne demande aucune préparation de dérivés préalable. Il y a donc un gain de temps considérable. Il suffit seulement de d'extraire les acides biliaries par les cartouches C₁₈, une méthode rapide qui permet de purifier et de concentrer les acides biliaries dans les milieux biologiques tel le sérum.

En mode "Electrospray", il se produit une évaporation ionique à partir d'une gouttelette. Le solvant est pompé par le HPLC au travers d'un capillaire d'acier inoxydable transportant un haut potentiel d'environ 3.5 kV. Le champ électrique élevé généré par ce potentiel amène le solvant à être vaporisé de la pointe du capillaire et des gouttelettes hautement chargées sont produites. Puis ces gouttelettes s'évaporent au même rythme que les ions qui y sont présents. Un flux gazeux d'azote chaud passe par la source afin de faciliter le processus de vaporisation de même que le retrait du solvant. Un flux d'azote passe aussi autour du capillaire afin de diriger ces gouttelettes. On peut obtenir différentes informations au sujet des acides biliaries en utilisant différents modes d'analyse : balayage, ions filles, MRM et parent.

1.4.3.3.1 Modes d'acquisition des données

1. Identification des composés

a. Le mode balayage (MS1)

Le mode de balayage est utilisé surtout pour identifier des composés inconnus, pour confirmer leur masse et parfois leur structure. Dans ce mode, les ions produits dans la source sont séparés selon leur masse en utilisant seulement le premier quadropole (MS1) et on obtient un spectre de masse. En augmentant le voltage du cône, il se produit une fragmentation dans la source qui pourrait aider à l'élucidation de la structure de la molécule.

b. Analyse des ions filles

L'analyse des ions filles permet une élucidation structurale de la molécule d'intérêt. Dans ce mode d'analyse, une seule masse produite dans la source est choisie pour passer dans le MS1. Une pression de gaz argon entre dans la cellule de collision hexapole située entre le MS1 et le MS2 (le deuxième quadropole); la fragmentation a lieu au niveau de cette cellule de collision. Le MS2 enregistre tous les ions qui sortent de la cellule de collision. Les ions traversant le MS1 sont appelés "parent" ou "précurseur" et les ions produits dans la cellule de collision sont nommés "filles" ou "fragments". MS1 est en mode statique, c'est-à-dire qu'une seule masse est autorisée à passer à travers le quadropole; le MS2 est utilisé en mode de balayage.

2. Analyse des composés connus

a. "Multiple Reaction Monitoring" (MRM)

Le mode MRM est utilisé dans la détection des molécules d'intérêt avec une sélectivité et sensibilité accrue. Dans ce mode d'analyse, la nature de l'analyte et de l'ion fille produit sont connus. Le MS1 transmet seulement une seule masse d'intérêt, un seul ion fille est sélectionné pour être transmis par le MS2. MS1 et MS2 sont tous les deux en mode statique. La sensibilité accrue de MRM s'explique donc par le fait que les deux quadrupoles contrôlent chacun un seul ion. Sa sélectivité est due au fait qu'une seule masse est autorisée à traverser le MS1. Le MRM ne produit pas de spectre de masse. Ce mode d'analyse est très utile lors d'analyse des matrices biologiques complexes où il peut y avoir des interférences provenant d'autres composés dans l'échantillon.

1.4.4 Isolation des acides biliaires des milieux biologiques complexes

L'analyse des acides biliaires dans les milieux biologiques nécessite des étapes de préparation et d'extraction. Les composés à doser sont présents à l'état de trace, c'est-à-dire à des quantités inférieures à 5 μM . De plus, les composés à doser sont présents dans des milieux complexes. De par la complexité de la matrice, la première étape de la méthode consiste en une extraction du(des) composé(s) recherché(s). Cette étape de purification s'avère nécessaire pour résoudre le problème d'interférences provoquées par les composés présents dans

le milieu à des concentrations nettement supérieures à celle du composé recherché. Les procédés d'extraction sont multiples et le choix doit être guidé par la nature chimique des composés recherchés. L'extraction liquide-solide sur colonnes est utilisée dans quelques laboratoires pour l'analyse des acides biliaires. Cette technique d'extraction par les cartouches C₁₈ a remplacé les méthodes d'extraction liquide-liquide (Hofmann, 1967; Fransson et Schill, 1975) et aussi d'autres méthodes d'extraction liquide-solide (résines d'Amberlite XAD). Il s'agit d'une technique facile et rapide pour la séparation des acides biliaires des autres constituants.

1.4.5 Étalon interne

Les étalons sont essentiels pour la calibration du spectromètre de masse et aussi pour ajuster les conditions afin d'optimiser la sensibilité et la sélectivité de l'appareil. De plus, en raison de nombreux paramètres expérimentaux à contrôler, l'utilisation d'un étalon interne est indispensable dans le but d'optimiser la reproductibilité et l'exactitude des données. L'étalon interne choisi devrait avoir les mêmes propriétés physiques et chimiques que celles de l'analyte. Ainsi, lors des réactions chimiques (dérivatisation) et physiques (extraction, séparation chromatographique, adsorption sur des surfaces), les deux (analyte et étalon interne) subiront les mêmes pertes. Normalement, on introduit dans l'échantillon une quantité connue d'un composé de référence avant de le traiter selon le protocole expérimental choisi. En réalisant ces essais sur des échantillons

synthétiques ou biologiques additionnés de quantités croissantes du composé à mesurer, on établit une courbe d'étalonnage qui servira aux calculs des concentrations des échantillons inconnus.

1.4.6 Courbes d'étalonnage

La mesure quantitative en spectrométrie de masse repose sur l'établissement d'une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'échantillons synthétiques ou biologiques additionnés d'une quantité connue et constante d'étalon interne et de quantités croissantes du composé à déterminer. Le rôle de cet étalonnage est de vérifier qu'il existe une relation linéaire dans la gamme des concentrations à mesurer.

2 OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Durant les dernières années, une attention particulière a été portée au métabolisme des acides biliaires en relation avec le diagnostic des maladies hépatobiliaires et intestinales. Les maladies cholestatiques chroniques, comme la cirrhose biliaire primitive (CBP) sont caractérisées par l'accumulation d'acides biliaires endogènes hydrophobes. Ceux-ci provoquent des lésions des hépatocytes et probablement des cellules biliaires qui pourraient, à terme, être responsables de l'évolution de la maladie vers la fibrose et la cirrhose. La solution pour la compréhension de la physiologie et de la pharmacologie des acides biliaires est liée au développement de méthodes analytiques précises.

Les principaux buts de cette étude sont les suivants:

- 1- Validation de la spectrométrie de masse en tandem (MS-MS), une nouvelle technique analytique pour l'identification et la caractérisation des acides biliaires.
- 2- Validation de la quantification des acides biliaires par le MS-MS en analysant les acides biliaires sériques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive (CBP), prélevés à jeûn, avant et après six mois de traitement à l'acide ursodéoxycholique.

- 3- Analyse des acides biliaires sériques des mêmes patients par le GC-MS, et de comparer les résultats avec ceux obtenu par le MS-MS. Cependant, à cause de quantités insuffisantes de sérum prélevées avant et après l'administration de l'acide ursodéoxycholique pour tous les patients, on a seulement pu analyser les acides biliaires sériques de 7 des 13 patients.

- 4- Étudier l'effet de l'administration de l'acide ursodéoxycholique sur le profil des acides biliaires sériques des patients atteints de CBP. Étant donné que le traitement a été considéré inefficace chez ces patients (absence d'amélioration du prurit et des paramètres biochimiques), on a voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle la présence d'acides biliaires anormaux dans le sérum pourrait expliquer en partie l'inefficacité du traitement.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Validation des méthodes

3.1.1 Efficacité des cartouches C₁₈ dans l'extraction des acides biliaires

Les acides biliaires suivants, obtenus de Calbiochem-Boehring Corp., ont été utilisés pour vérifier l'efficacité d'extraction des cartouches "Octadecylsilane-bonded-silica" (C₁₈): acide cholique (CA), acide glycocholique (GCA), acide taurocholique (TCA), acide chénodéoxycholique (CDCA) et acide lithocholique (LCA). Les acides biliaires radioactifs marqués avec le ¹⁴C ont été obtenus d'Amersham Int. et Du Pont : acide cholique (activité spécifique 55.7 mCi/mmol), acide glycocholique (activité spécifique 44.6 mCi/mmol), acide taurocholique (activité spécifique 46.7 mCi/mmol), acide chénodéoxycholique (activité spécifique 40 mCi/mmol) et acide lithocholique (activité spécifique 50 mCi/mmol).

Les cartouches C₁₈ ont été obtenues de J.T.Baker, avec une capacité de 3 ml et masse sorbante de 500 mg. Toutes les cartouches ont été conditionnées avant l'utilisation. Elles étaient prélavées avec 2 ml de chloroforme : méthanol 2:1, 2 ml de méthanol, 2 ml d'eau distillée et, par la suite, on a ajouté différentes quantités d'acides. À la fin, les colonnes étaient nettoyées avec 2 ml d'eau distillée et 2 ml de n-hexane et les acides biliaires étaient récupérés avec 2 ml de méthanol.

Avant l'extraction, 10 μCi d'acide biliaire radioactif étaient ajoutés à l'acide biliaire non-radioactif correspondant; le tout a été dilué dans de l'eau distillée dans un volume total de 2 ml. Après avoir ajouté 15 ml du liquide de scintillation Eco-Lite (Amersham Corporation, Arlington Heights, Illinois) à l'extrait méthanolique, la radioactivité des acides biliaires a été déterminé au compteur de scintillation liquide.

Dans le cas où les acides biliaires n'ont pas été radiomarqués (acides biliaires dilués dans le sérum de cheval), leur taux de récupération a été calculé à partir des courbes d'étalonnage linéaires obtenues à partir de différentes concentrations (100 à 10000 ng/ml) de chaque acide biliaire par le MS-MS. Étant donné que le spectromètre de masse en tandem utilisé n'est pas équipé d'une colonne séparatrice et qu'il n'y a pas de distinction entre différentes molécules de même poids moléculaire, on a choisi un acide biliaire monohydroxylé (LCA), un acide biliaire dihydroxylé (CDCA) et un acide biliaire trihydroxylé (CA) sous leur forme conjuguée, glycine et taurine pour établir les courbes d'étalonnage. Ces courbes sont obtenues en utilisant 1000 ng d'étalon interne, le 5β -cholanique $3\alpha,12\alpha$ diol-7 one.

Toutefois, le sérum demande des étapes de préparation particulières. Dans une étude effectuée par Setchell et Worthington, ils ont observé une perte importante des acides biliaires majeurs lorsque le sérum est dilué simplement dans l'eau (Setchell et Worthington, 1982). Une forte liaison des acides biliaires et

de leur conjugués avec l'albumine constitue le problème majeur dans leur extraction par les cartouches C₁₈ et les acides biliaires restent retenus dans la phase aqueuse. Cette liaison des acides biliaires avec l'albumine peut être éliminée en augmentant le pH et la température (Rudman et Kendall, 1957). L'augmentation de la température à 64°C minimise la liaison non-ionique des acides biliaires aux protéines sériques et il y a une amélioration dans le taux d'extraction des acides biliaires lorsque le sérum est dilué dans l'eau. Toutefois, si on dilue le sérum avec NaOH 0.1M (pH > 12) avant son passage dans les cartouches C₁₈, la liaison des acides biliaires aux protéines sériques devient minimale et le taux d'extraction est plus satisfaisant (Rudman et Kendall, 1957).

3.1.2 Spectromètre de masse en tandem (MS-MS)

3.1.2.1 Identification et optimisation des acides biliaires par le MS-MS

Le spectromètre de masse utilisé dans l'analyse des acides biliaires est de type VG Quatro II et est raccordé à un ordinateur. Le logiciel Mass Lynx acquiert et manipule les données. Les acides biliaires suivants ont été analysés : acide lithocholique (LCA), acide chénodéoxycholique (CDCA), acide déoxycholique (DOCA), acide cholique (CA), acide ursodéoxycholique (UDCA) et les conjugués glycine et taurine respectifs de chacun de ces acides biliaires. Les analyses ont été effectuées dans les deux modes, positif (M+1) et négatif (M-1). En mode positif, les acides biliaires sont dissous dans l'hydroxyde d'ammonium 2.8%; la dissolution est dans l'eau-acétonitrile 1:1 en mode négatif. Cependant, en mode

positif, le spectre de masse est dominé par la présence des additifs de Na^+ dont l'intensité est beaucoup plus élevée que celle de l'acide biliaire. On a donc dirigé notre étude à l'optimisation des acides biliaires en mode négatif. Différentes quantités de chaque acide biliaire ont été injectées dans le spectromètre de masse en tandem, le taux d'infusion étant de $10 \mu\text{l}/\text{min}$.

En mode de balayage, on obtient l'abondance relative de chaque acide biliaire (M-H). Pour générer des ions filles, la machine laisse passer une seule masse ionique à travers le premier spectromètre de masse (MS1) où elle vient en contact avec une cellule de collision et la collision avec le gaz argon fragmente la molécule en générant des ions filles au niveau du deuxième spectromètre de masse (MS2). Le degré de fragmentation dépend du voltage du cône et de l'énergie de collision. Les conditions suivantes ont été gardées constantes dans le MS1 : capillaire (-3.0 kV), gaz de séchage (250 l/h), température de la source (70°C), lentille HV (-0.5 kV). En MS2, tous les paramètres étaient constants sauf l'énergie de collision et la lentille 8. La lentille 8 correspond à une plaque située devant la cellule de collision qui possède un certain voltage. Elle permet la transmission des ions dans la cellule de collision et aussi limite le flot du gaz de collision en dehors de la cellule.

3.1.2.2 Quantification des acides biliaires par le MS-MS

3.1.2.2.1 Choix de l'étalon interne

Plusieurs molécules ont été analysées dans le choix d'un étalon interne: 5 β -cholanique; 5 β -cholanique 3 α ol-6 one; 5 β -cholanique 3 α , 12 α diol-7 one; 5 β -cholanique 3,7 dione; 5 β -cholanique 3 one; 5 β -cholanique 3 α ol-7 one; 5 β -cholanique 7 α , 12 α diol-3 one; acide hyocholique; acide hyodéoxycholique; 5 β -cholestan 3 β ol; 5 α cholestan 3 β ol; 5 α cholestan 3 one; acide nordéoxycholique et 5 cholesten-3 one.

3.1.2.2.2 Préparation des échantillons sériques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive pour le MS-MS

À 1 ml du sérum on a ajouté 1 ml de NaCl 0.9% et 8 ml de NaOH 0.1M. Cette étape permet de minimiser les liens non ioniques des sels biliaires aux protéines sériques. 1000 ng de l'étalon interne (5 β -cholanique 3 α , 12 α diol, 7-one) a été ajouté à tous les échantillons. On a incubé le mélange à 64°C pendant environ 20 à 30 minutes. Le sérum a été refroidi à l'air libre et les acides biliaires étaient extraits en passant le sérum dans les cartouches C₁₈ d'après la méthode décrite précédemment. Les extraits méthanoliques contenant les acides biliaires étaient séchés sous l'azote extra-sec et dilués dans 1 ml d'eau-acétonitrile 1 : 1

avant d'être injectés dans l'appareil. 10 µl de chaque solution ont été injectés dans le MS-MS.

3.1.2.2.3 Courbes d'étalonnage et quantification des acides biliaries

Pour établir les courbes d'étalonnage, différentes concentrations (100, 500, 1000, 5000, 10000 ng/ml) d'acides biliaries conjugués à la glycine et à la taurine (GLCA, GCDCA, GCA, TLCA, TCDCA, TCA) étaient dilués dans 1 ml du sérum normal de cheval ne contenant pas d'acides biliaries. 1000 ng d'étalon interne, le 5β-cholanique 3α, 12α diol-7 one était ajouté à tous les échantillons. Ces échantillons ont subi les mêmes traitements que les échantillons de sérum des patients décrits dans la section précédente. 10 µl de chaque solution étaient injectés dans l'appareil. Les courbes d'étalonnage sont obtenues par la fonction MRM ("Multiple Reaction Monitoring") du MS-MS. La réponse de chaque acide biliaire est calculée selon la formule suivante:

$$\left\{ \frac{\text{aire sous la courbe de l'acide biliaire}}{\text{aire sous la courbe de l'étalon interne}} \right\} \times \text{quantité de l'étalon interne dans l'échantillon}$$

Les courbes d'étalonnage obtenues sont différentes quantités d'acides biliaries (axe des X) en fonction de leur réponse (axe des Y). À partir de ces courbes, un logiciel dans l'appareil calcule automatiquement la surface sous la courbe et la quantité des différents acides biliaries dans un échantillon inconnu.

3.1.3 Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)

3.1.3.1 Facteurs de correction de la réponse du détecteur pour les différents acides biliaires en relation avec l'étalon interne

La quantification avec le GC-MS nécessite un facteur de correction pour le détecteur du spectromètre de masse pour chacun des acides biliaires à analyser. Le facteur de correction correspond au rapport entre l'aire sous la courbe d'un acide biliaire et celle de l'étalon interne dans le même mélange. Le 5 β -cholanique est l'étalon interne utilisé pour la quantification des acides biliaires par le GC-MS. À cet effet, un mélange de concentrations égales de chacun des acides biliaires suivants a été préparé : 5 β -cholanique, LCA, DOCA, CDCA, CA et UDCA. À partir de ce mélange, différentes quantités (0.02 μ g à 5 μ g) étaient préparées et dérivatisées pour l'analyse avec le GC-MS en mode SIM ("Selected Ion Monitoring"). Dans ce mode d'analyse, chaque acide biliaire est séparé et identifié selon un temps de rétention bien précis et par des ions caractéristiques. Les ions caractéristiques du 5 β -cholanique (étalon interne) sont 217/374, 257/374 pour l'acide lithocholique, 255/370 pour les acides biliaires dihydroxylés (déoxycholique, chénodéoxycholique et l'ursodéoxycholique) et 253/368 pour l'acide cholique.

Le facteur de correction obtenu pour chaque acide biliaire est utilisé dans le calcul de la quantité de l'acide biliaire dans un mélange inconnu. La quantification des acides biliaires par le GC-MS se fait selon la formule suivante :

$$\left\{ \frac{\text{aire sous la courbe de l'acide biliaire} \times \text{quantité de l'étalon interne}}{\text{aire sous la courbe de l'étalon interne}} \right\} / \text{facteur de correction}$$

3.1.3.2 Préparation des échantillons de sérum des patients atteints de cirrhose biliaire primitive pour le GC-MS

Les sérums de 7 des 13 patients étaient disponibles pour l'analyse des acides biliaires par le GC-MS. Dans un premier temps, il s'agit d'extraire les acides biliaires du milieu biologique : dans chaque tube, on a ajouté 5 µg de l'étalon interne (5β-cholanique) à 1 ml du sérum. On ajoute 10 ml d'un mélange éthanol-méthanol 95:5 et on chauffe les tubes à 60-80°C pendant 10 minutes afin d'aider la précipitation des protéines. On transfère le surnageant dans des tubes en plastique et on les centrifuge pendant 30 minutes à une vitesse de 3000 rpm pour éliminer les protéines. Après avoir évaporé l'éthanol sous l'azote extra sec, les acides biliaires ont subi des étapes de préparation avant d'être injectés dans le GC-MS. D'abord, ils ont été hydrolysés avec 2 ml d'hydroxide de sodium 2.5N pendant toute la nuit à 160°C et ont été extraits avec 10 ml d'éther. La prochaine étape consistait en une méthylation des groupements carboxyliques en ajoutant 2 ml de méthanol, 2 ml de 2,2-diméthoxypropane et 10 gouttes de HCl (12 N).

Finalement, les groupements hydroxyles ont été acétylés en ajoutant 1 ml du mélange suivant : 7 ml d'acide acétique glacial, 5 ml d'anhydride acétique et 5 gouttes d'acide perchlorique 70%. À la fin, les dérivés méthylester acétates des acides biliaires sont solubilisés avec 100 µl de chloroforme. Les acides biliaires sous cette forme peuvent être conservés longtemps à 4°C. Seulement 2 µl de la solution étaient injectés dans le GC-MS.

Le chromatographe à gaz utilisé est de type Hewlett-Packard 5890 équipé d'une colonne capillaire (Yousef et al. 1976). Les acides biliaires sont identifiés par un détecteur du spectre de masse de type Hewlett-Packard 5971A raccordé au chromatographe. Les acides biliaires étaient analysés par la méthode SIM (Selected Ion Monitoring). L'identification des acides biliaires s'est faite en se basant sur leur temps de rétention dans le GC. Un ion spécifique est produit pour chacun des acides biliaires.

3.2 Sujets expérimentaux

13 patients (11 femmes, 2 hommes) atteints de cirrhose biliaire primitive (CBP) ont fait le sujet de notre étude. Les sérums étaient prélevés à jeûn à l'hôpital St-Luc, avant et 6 mois après l'administration de l'acide ursodéoxycholique (UDCA). Chaque patient recevait une dose de 13-15 mg/kg (une gélule = 250 mg). Le traitement avec l'acide ursodéoxycholique chez ces patients était considéré inefficace. Cette inefficacité était basée sur le fait qu'il n'y

a pas eu d'amélioration significative de prurit et des paramètres biochimiques après 6 mois de traitement. Toutefois, il était difficile de déterminer le niveau de prurit étant donné qu'il s'agissait de la perception du patient même et il était très variable d'une journée à l'autre chez le même patient. Parmi ces patients, 9 étaient au stade IV, 2 étaient au stade II et un était au stade III de Ludwig et ce stade était indéterminé chez un des patients. Les caractéristiques de ces patients sont présentés dans le tableau I.

3.3 Changements dans les paramètres biochimiques (ALT, AST, PA, γ -GT, bilirubine, cholestérol) chez les 13 patients atteints de cirrhose biliaire primitive avant et 6 mois après le traitement avec l'acide ursodéoxycholique

Les paramètres biochimiques suivants ont été déterminés avant et après 6 mois de traitement: la phosphatase alcaline, les aminotransférases (alanine et aspartate), la γ -glutamyl transpeptidase, la bilirubine et le cholestérol (Tableau II). Chez 5 patients le niveau d'ALT a augmenté (19-113%) et chez 2 patients le niveau de cette enzyme n'a pas changé. Chez ceux donc le niveau d'ALT a diminué, la variation se situe entre 7 et 69%. Parmi les 5 patients qui ont montré une élévation du taux d'ALT, 3 avaient aussi un niveau d'AST plus élevé après l'administration de l'acide ursodéoxycholique (de 21 à 51%). Le taux d'AST est resté presque inchangé chez 2 patients (< 10%). La PA a augmenté de 34% chez un patient, est inchangée chez 4 (< 10%) et a diminué chez 8 patients (12-71%).

TABLEAU I. Caractéristiques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive traités avec l'acide ursodéoxycholique

Patients	Âge (T0)	Sexe	Stade	Prurit (T0)	Prurit (T6)
A	52	F	IV	3	2
B	38	F	IV	2	2
C	40	F	IV	3	3
D	49	H	IV	3	2
E	59	F	N.D.	2	1
F	60	H	IV	2	2
G	69	F	IV	1	1
H	46	F	IV	2	2
I	42	F	IV	3	2
J	56	F	II	2	3
K	33	F	IV	2	3
L	54	F	III	3	2
M	47	F	II	3	2

V : Vivant

D: Décédé

T: Greffe hépatique

N.D. Non déterminé

Prurit: 1= Absent

2= Intermittent

3= Permanent

Le taux de γ -GT a augmenté chez 3 patients, est inchangé chez 2 (< 10%) et a diminué chez 8 (19-64%). La bilirubine a augmenté chez 3 patients (15-198%), est inchangée chez 5 et a diminué chez les 5 autres patients (15-75%). Dans l'ensemble, on observe une diminution de tous les paramètres biochimiques chez les 13 patients faisant partie de notre étude. Cependant, les différences entre les indices biochimiques avant et 6 mois après le traitement ne sont pas significatives sauf dans le cas de la phosphatase alcaline (PA). Toutefois, ces valeurs restent supérieures aux niveaux normales retrouvées normalement chez les sujets sains.

TABLEAU II. Paramètres biochimiques (ALT, AST, PA, γ -GT, bilirubine, cholestérol) (moyenne \pm écart-type) de 13 patients, mesurés avant (T0) et 6 mois après (T6) le traitement avec l'acide ursodéoxycholique

Paramètres biochimiques	Avant traitement (T0) (moyenne\pmécart-type)	Après traitement (T6) (moyenne\pmécart-type)
ALT (UI/L)	198 \pm 201.76	135 \pm 73.22
AST (UI/L)	181 \pm 128.16	133 \pm 66.11
PA (UI/L)	611 \pm 372.01	394 \pm 242.80
γ -GT (UI/L)	567 \pm 474.45	440 \pm 261.31
Bilirubine (μ mol/L)	51.0 \pm 49.22	48.5 \pm 54.95
Cholestérol (mmol/L)	7.60 \pm 2.76	7.59 \pm 2.50

(Les différences entre les indices biochimiques avant et 6 mois après le traitement avec l'acide ursodéoxycholique ne sont pas significatives, sauf dans le cas de la phosphatase alcaline (PA))

3.4 Analyses statistiques

Les données étaient soumises à un test de t pairé et à un test de signe, le niveau de probabilité comme critère de signification étant de 0.05 pour les deux tests.

4 RESULTATS

4.1 Validation des méthodes

4.1.1 Efficacité des cartouches C₁₈ dans l'extraction des acides biliaires:

Le tableau III démontre en moyenne le pourcentage de récupération des acides biliaires marqués avec le ¹⁴C lorsqu'ils sont extraits avec les cartouches C₁₈. Ces acides biliaires sont le CA et le CDCA, les principaux acides biliaires qu'on retrouve dans le sérum humain normal, ainsi que dans les maladies hépatobiliaires. De plus, pour vérifier l'efficacité des cartouches dans l'extraction des acides biliaires conjugués, on a utilisé un acide biliaire conjugué à la glycine (GCA) et un acide biliaire conjugué à la taurine (TCA) marqués avec le ¹⁴C. On a aussi examiné le taux d'extraction de LCA, un acide biliaire très toxique. Le taux d'extraction de ces acides biliaires radiomarqués se situe entre 87.6 et 94.5%.

Afin de calculer le taux de récupérations des acides biliaires non radiomarqués après l'extraction par les cartouches C₁₈, les acides biliaires TLCA, TCDCA, TCA, GLCA, GCDCA et GCA ont été dilués dans le sérum normal de cheval ne contenant pas d'acides biliaires. Différentes concentrations (100 à 10000 ng/ml) de chaque acide biliaire ont été injectées à trois reprises dans le spectromètre de masse en tandem. Après leur extraction par les cartouches C₁₈, le taux de récupération de ces acides biliaires se situe entre 88.35% et 99.90%

TABLEAU III. Pourcentage de récupération (moyenne \pm écart-type, n=6) des acides biliaires marqués, extraits avec les cartouches C₁₈

Acides biliaires	% de récupération (moyenne \pm écart-type)
CA	94.5 \pm 2.8
CDCA	92.0 \pm 5.7
LCA	87.6 \pm 8.8
GCA	90.4 \pm 4.7
TCA	94.3 \pm 6.8

Tableau IV. Pourcentage de récupération (moyenne \pm écart-type, n=3) des acides biliaires conjugués dilués dans le sérum de cheval, obtenu par le MS-MS après l'extraction par les cartouches C₁₈

Concentration (ng/ml)	TLCA (%)	TCDCa (%)	TCA (%)	GLCA (%)	GCDCA (%)	GCA (%)
100	91.83 \pm 2.02	97.45 \pm 5.23	95.14 \pm 6.43	99.90 \pm 4.42	96.59 \pm 4.68	92.02 \pm 5.98
500	89.76 \pm 4.14	95.45 \pm 3.66	89.50 \pm 7.25	90.98 \pm 5.10	88.35 \pm 5.39	96.30 \pm 3.80
1000	95.90 \pm 4.80	88.80 \pm 7.61	92.25 \pm 5.90	98.23 \pm 8.53	92.28 \pm 6.94	92.88 \pm 6.69
5000	90.90 \pm 5.79	93.00 \pm 7.11	91.81 \pm 5.33	88.78 \pm 6.22	91.70 \pm 5.20	90.04 \pm 4.24
10000	92.34 \pm 7.09	95.21 \pm 8.45	90.09 \pm 5.88	95.17 \pm 8.10	90.25 \pm 6.12	91.72 \pm 5.11

(Tableau IV). Dans l'ensemble, le coefficient de variation inter-jour de ces acides biliaires se situe entre 2.20% et 8.87%.

4.1.2 Analyse des acides biliaires par le spectromètre de masse en tandem (MS-MS) : optimisation et caractérisation des acides biliaires

4.1.2.1 Le "Full Scan"

En plus de CA et CDCA, le sérum contient d'autres acides biliaires tels que le DOCA, LCA et UDCA ainsi que leurs conjugués glycine et taurine. En mode négatif, tous les acides biliaires analysés, libres ou conjugués, montrent un pic à m/z M-1 (masse moléculaire - 1). Il y a très peu ou pas de fragmentation additionnelle et le spectre de masse contient uniquement l'ion quasi-moléculaire. On a aussi analysé des solutions d'acides biliaires contenant de l'acétate d'ammonium 0.7%. Cependant, la sensibilité et l'intensité des composés sont réduites comparativement aux échantillons ne contenant pas ce produit.

En injectant chacun des acides biliaires séparément, on a déterminé les valeurs optimales du voltage du cône pour LCA, DOCA, CDCA, CA, UDCA et leurs conjugués glycine et taurine (Tableau V). Le voltage optimum se situe entre 50 et 70 V pour les acides biliaires analysés. La figure 6 représente un spectre de

TABLEAU V. Optimisation du voltage du cône pour l'analyse des d'acides biliaires en mode "Full Scan"

Acides biliaires	Poids moléculaire	Cone Voltage (V)
LCA	375.6	60
DOCA	391.7	50
CDCA	391.7	70
CA	407.7	55
UDCA	391.7	60
GLCA	432.6	55
GDOCA	448.7	50
GCDCA	448.7	55
GCA	464.7	50
GUDCA	448.7	50
TLCA	482.6	55
TDOCA	498.6	55
TCDCa	498.6	60
TCA	514.7	55
TUDCA	498.6	60

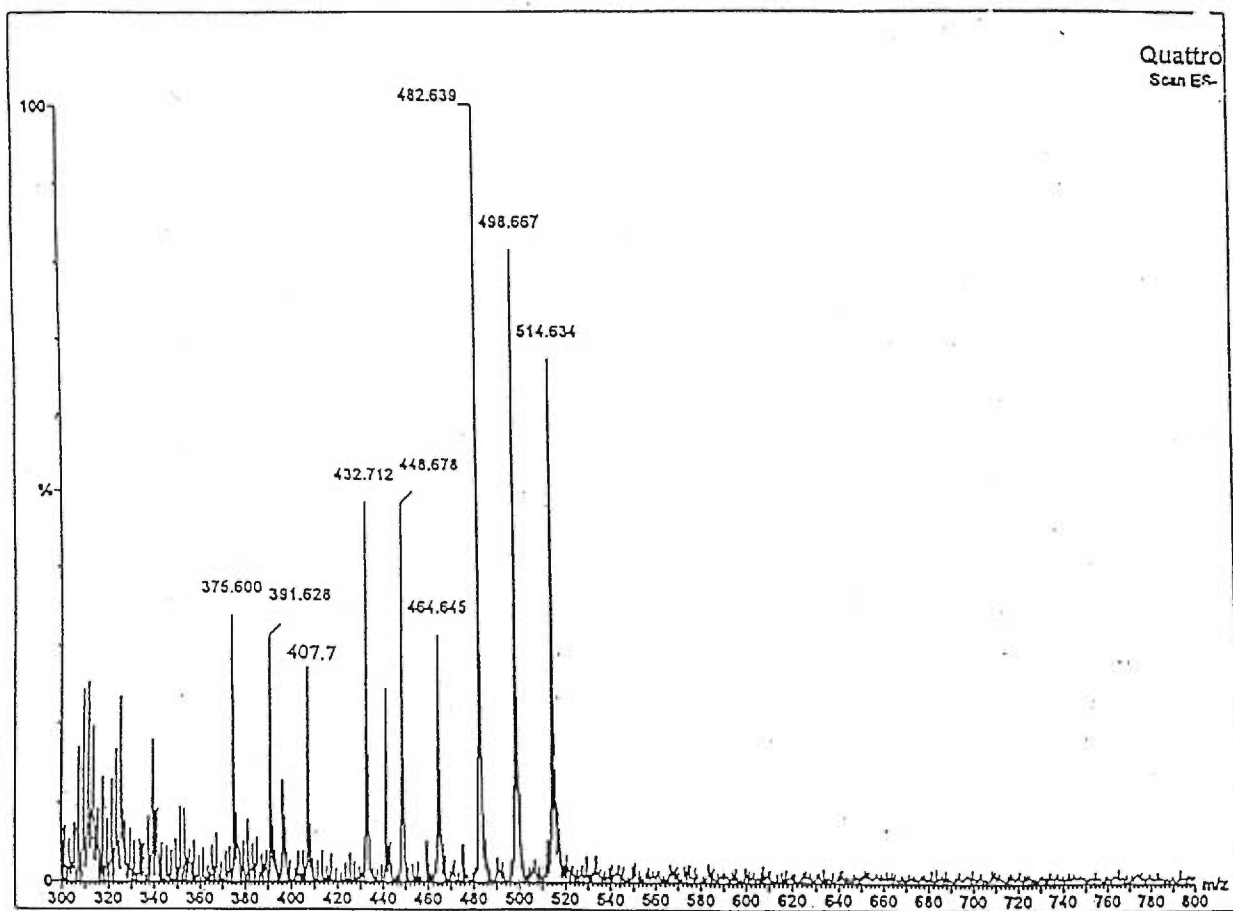


Figure 6. Le spectre de masse des acides biliaires (LCA, CDCA, CA, GLCA, GCDCA, GCA, TLCA, TCDCA, TCA) obtenu par le MS-MS (mode "Full Scan")

masse des acides biliaires libres et conjugués obtenu en mode "Full Scan". Ce spectre est obtenu en injectant 10 µl d'un mélange fait de quantités égales des acides biliaires suivants : LCA, CDCA, CA et leurs glyco- et tauroconjugués respectifs. On peut facilement identifier le pic correspondant au poids moléculaire de chaque acide biliaire. Le pic 375.6 correspond à LCA, les pics 391.7 et 407.7 correspondent au poids moléculaire de CDCA et CA respectivement. Les pics 432.6, 448.7 et 464.7 correspondent respectivement à GLCA, GCDCA et GCA et finalement, les pics 482.6, 498.6 et 514.7 représentent TLCA, TCDCA et TCA respectivement. Étant donné que le MS-MS utilisé n'est pas équipé d'une colonne séparatrice, les acides biliaires ayant le même poids moléculaire ne sont pas séparés et il devient donc impossible de les différencier les uns des autres dans un même mélange. Le pic 391.7 représente DOCA, CDCA et UDCA. Le pic 448.7 représente GDOCA, GCDCA et GUDCA. Le pic 498.6 représente TDOCA, TCDCA et TUDCA. Ainsi, en analysant le spectre de masse des acides biliaires obtenu à partir d'un échantillon inconnu, on peut seulement confirmer la présence des acides biliaires mono-, di-, et trihydroxylés.

4.1.2.2 Le "Daughter Scan"

Une fois qu'on a obtenu l'intensité la plus élevée de la masse moléculaire de chaque acide biliaire, on a gardé le voltage du cône constant en appliquant une certaine énergie de collision. À l'exception de LCA, CDCA et UDCA, tous les autres acides biliaires analysés génèrent des ions filles spécifiques. Les ions filles

caractéristiques de DOCA et CA sont respectivement 343.5 et 289.6. L'ion fille caractéristique des glycoconjugués, l'ion 74, correspond au poids moléculaire de la glycine, et l'ion fille des tauroconjugués est l'ion 124 correspondant au poids moléculaire de la taurine. Les valeurs d'énergies de collision ainsi que l'ion fille généré pour chaque acide biliaire se trouvent dans le tableau VI. Les valeurs optimales de l'énergie de collision se situent entre 35 et 65 eV.

Tableau VI. L'ion fille caractéristique des acides biliaires obtenu par le mode "Daughter Scan" de MS-MS

Acides biliaires	Ion fille	Énergie de collision (eV)
LCA	Aucun ion spécifique	---
DOCA	343.5	45
CDCA	Aucun ion spécifique	---
CA	289.6	50
UDCA	Aucun ion spécifique	---
GLCA	74	35
GDOCA	74	35
GCDCA	74	35
GCA	74	50
GUDCA	74	35
TLCA	124	60
TDOCA	124	55
TCDCa	124	60
TCA	124	65
TUDCA	124	60

La figure 7 est un exemple de spectre obtenu utilisant le mode "Daughter Scan" de MS-MS. Dans le spectre (a), on a cherché l'ion fille de GCA, la glycine (ion 74); dans le deuxième spectre (spectre b), on a demandé l'ion fille de TCA, la taurine (ion 124). Les molécules parents, GCA et TCA sont fragmentés pour générer les ions filles.

4.1.2.3 Le choix de l'étalon interne

Plusieurs molécules ont été essayées dans le but de trouver le meilleur étalon interne (Tableau VII) pour la quantification des acides biliaires. Parmi ces molécules, quelques-unes précipitent dans l'eau et ne peuvent pas être injectées dans l'appareil (5 β -cholestan 3 β ol, 5 α -cholestan 3 β ol, 5 α -cholestan 3 one, 5 cholesten-3 one). D'autres molécules ne produisent pas des ions filles spécifiques et caractéristiques (5 β -cholannique, 5 β -cholannique 3 α ol-6 one, 5 β -cholannique 3 one, 5 β -cholannique 3 α ol-7 one, acide hyocholique et acide hydéoxycholique) et d'autres génèrent des ions filles, mais dont l'intensité est très faible (5 β -cholannique 3,7 dione, 5 β -cholannique 7 α ,12 α diol-3 one et acide nordéoxycholique) et la quantification des acides biliaires devient alors difficile. Le meilleur choix correspond au 5 β -cholannique 3 α ,12 α diol-7 one qui produit un ion fille spécifique (123.2) et dont l'intensité est plus élevée comparativement à celles des autres ions filles produits par les autres molécules analysées.

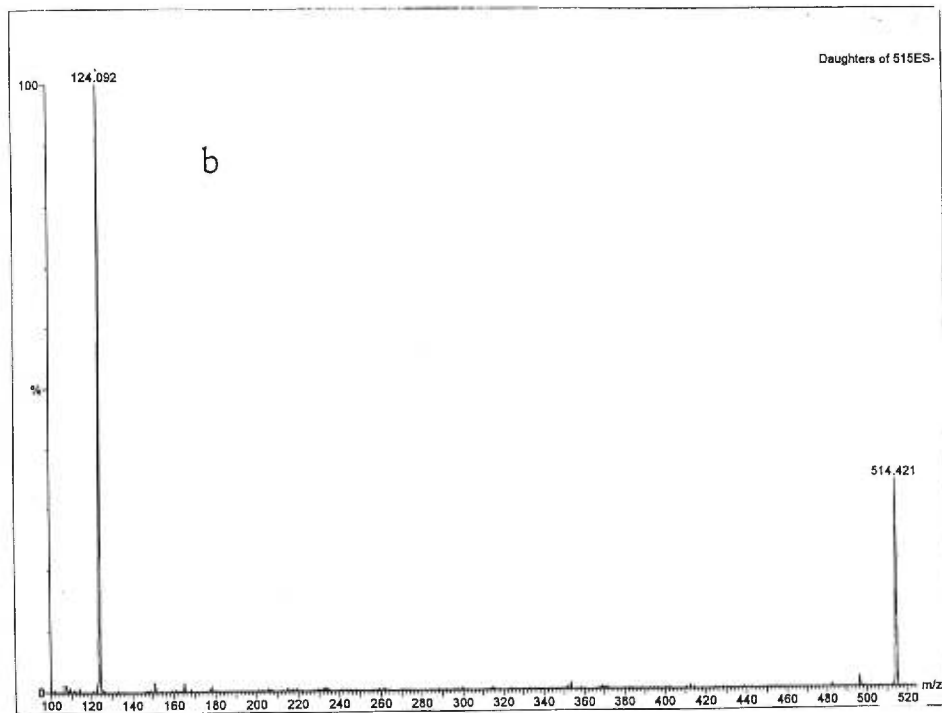
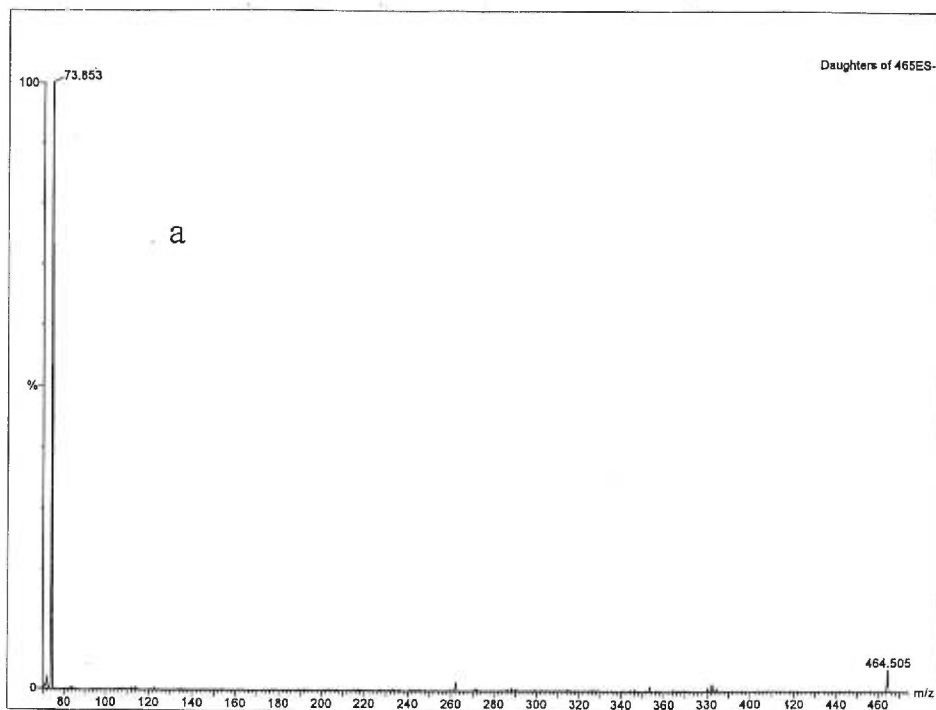


Figure 7. L'ion fille de (a) GCA et (b) TCA obtenus par le mode "Daughter Scan" de MS-MS

TABLEAU VII. Caractéristiques des différents composés dans le choix de l'étalon interne pour la quantification des acides biliaires par le MS-MS

Étalon interne	Poids moléculaire	Ion fille	
5β-cholannique	359.7	X	
5β –cholannique 3α,ol-6 one	389.8	X	
5β – cholannique 3α,12α diol-7 one	405.7	123.2	
5β – cholannique 3,7 dione	387.7	273.6	Intensité faible
5β – cholannique 3 one	373.7	X	
5β – cholannique 3α ol-7 one	389.7	X	
5β – cholannique 7α,12α diol-3 one	405.7	289.36	Intensité faible
Acide hyocholique	391.3	X	
Acide hyodéoxycholique	407.5	X	
5β –cholestan 3β ol	388.7		Précipite dans l'eau
5α-cholestan 3 β ol	388.7		Précipite dans l'eau
5α-cholestan 3 one	386.7		Précipite dans l'eau
Acide nordéoxycholique	377.8	329.5	Intensité faible
5 cholesten-3 one	391.6		Précipite dans l'eau

X: Absence de fragments caractéristiques

4.1.2.4 Les courbes d'étalonnage

Les courbes d'étalonnage sont linéaires pour les 6 acides biliaries analysés à des concentrations comprises entre 100 et 10000 ng/ml: TLCA et GLCA (figure 8a), TCDCA et GCDCA (figure 8b), TCA et GCA (figure 8c).

4.1.3 Analyse des acides biliaries par le chromatographe gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS)

4.1.3.1 Facteurs de correction de la réponse du détecteur pour les différents acides biliaries en relation avec l'étalon interne

Le facteur de correction est un rapport entre l'abondance de chaque acide biliaire et celle de l'étalon interne (5β -cholanique). En moyenne, à des quantités comprises entre 0.02 et 0.8 μg , ce rapport est de 0.27 pour LCA, 0.18 pour DOCA, 0.11, 0.09 et 0.11 pour les acides biliaries CDCA, CA et UDCA respectivement (tableau VIII). Ces rapports diffèrent d'un acide biliaire à un autre, mais restent constants pour chaque acide biliaire donné à des quantités comprises entre 0.02 et 0.80 μg , alors qu'on a observé une grande variation à des quantités supérieures à 0.80 μg . Il est donc nécessaire de diluer les échantillons, si nécessaire, afin d'avoir une quantité finale d'acides biliaries comprise entre 0.02 et 0.8 μg . Pour l'ensemble des acides biliaries analysés à des quantités comprises

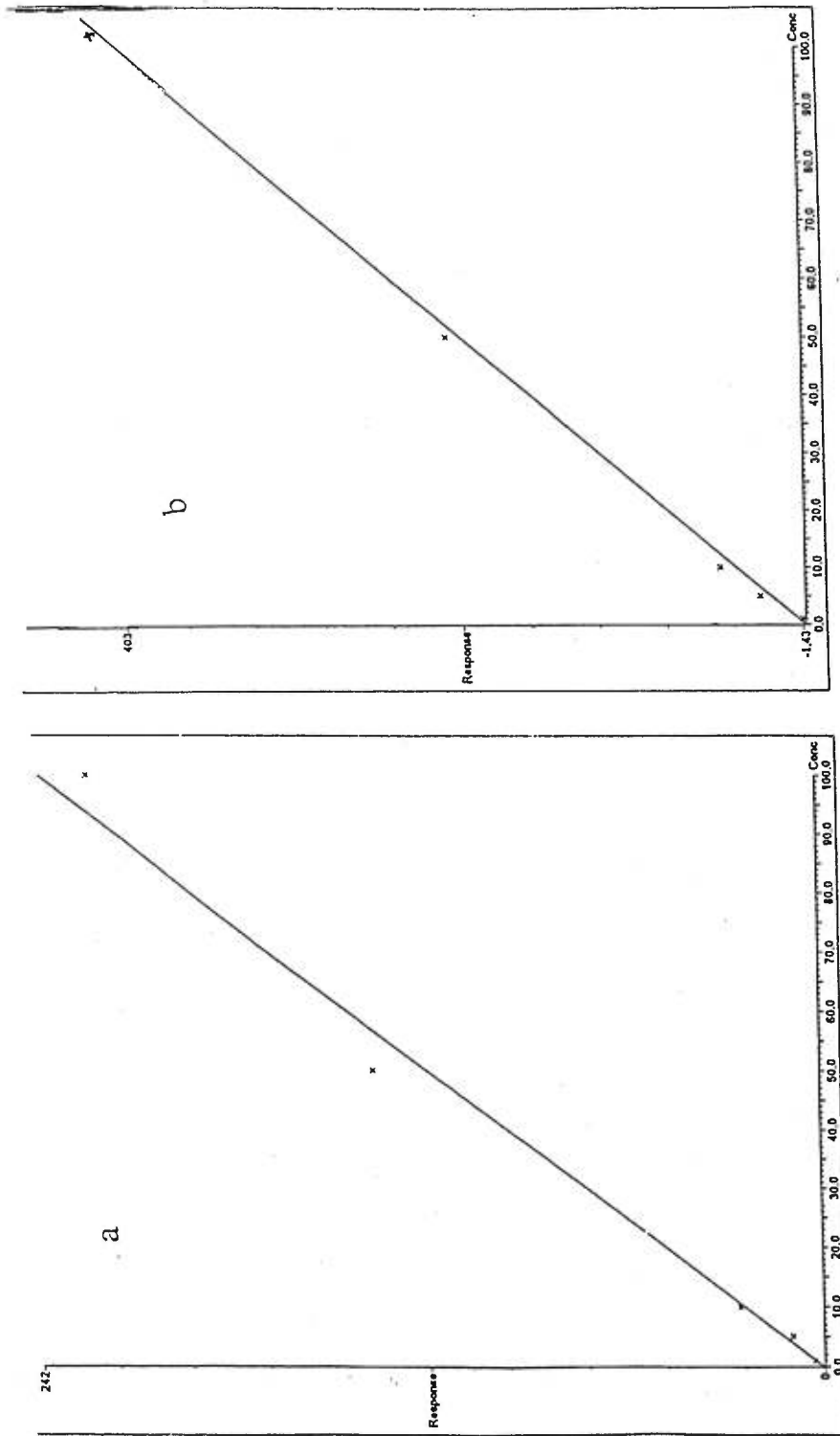


Figure 8a. Les courbes d'étalonnage de (a)TLCA, (b)GLCA (1-100 ng/10 μ l injectés)

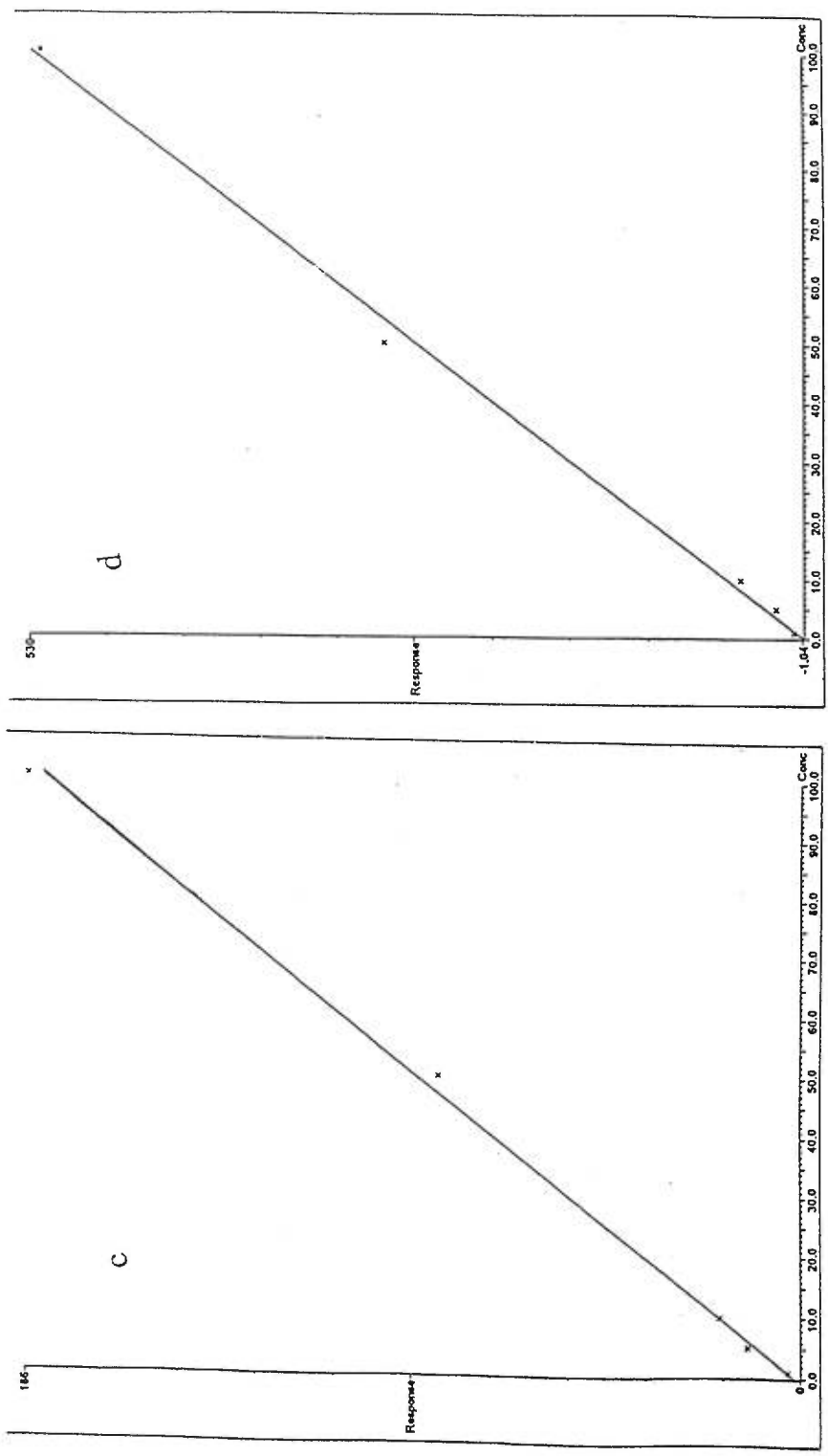


Figure 8b. Les courbes d'étalonnage de (c)TCDDA et (d)GCDDA (1-100 ng/10 µl injectés)

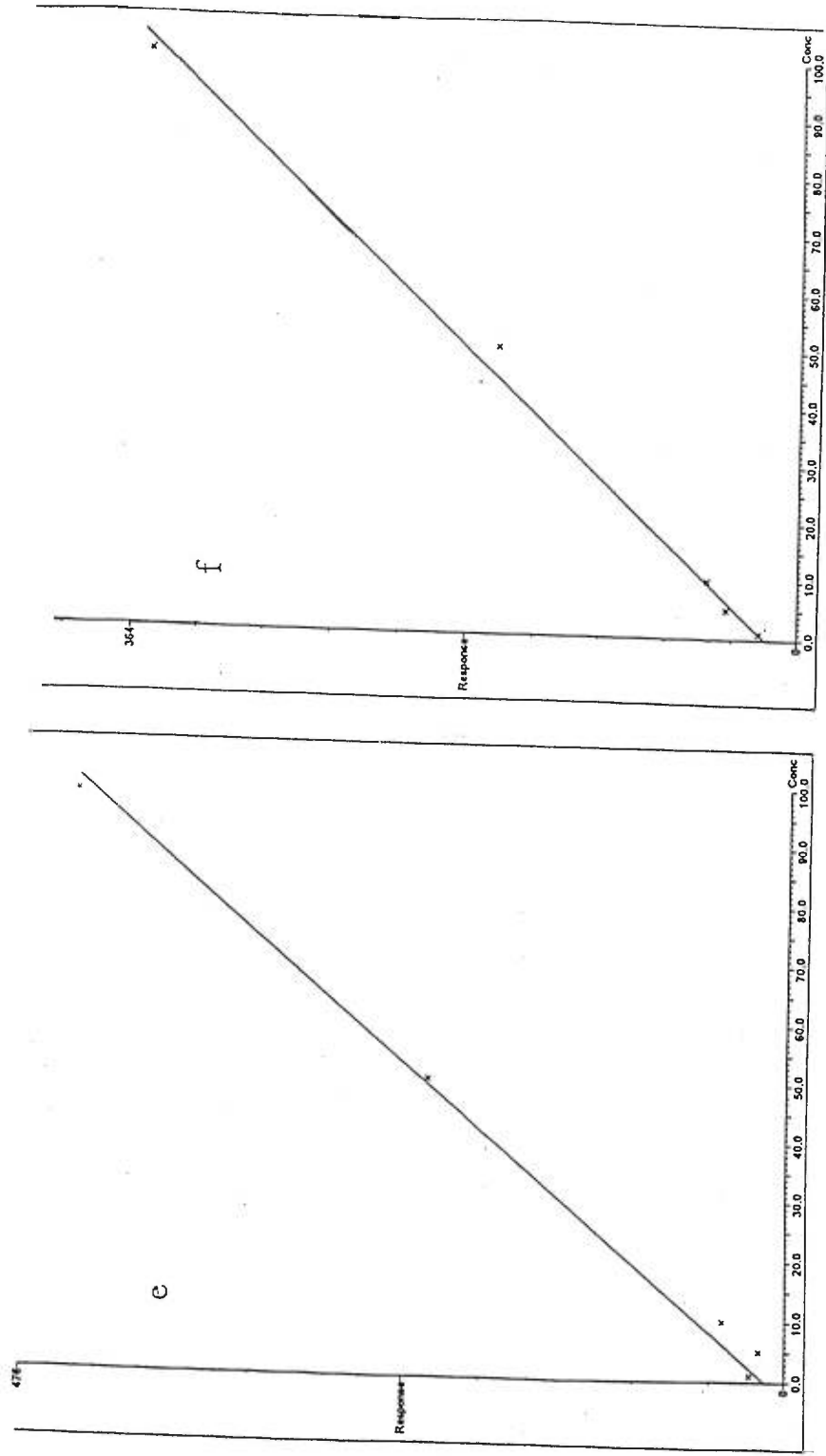


Figure 8c. Les courbes d'étalonnage de (e)TCA et (f)GCA (1-100 ng/10. μ l injectés)

entre 0.02 et 0.8 μg , le coefficient de variation inter-jour se situe entre 0.00% et 12.50% et le coefficient de variation intra-jour se situe entre 3.53% et 14.66%.

TABLEAU VIII: Facteurs de correction pour LCA, DOCA, CDCA, CA et UDCA (moyenne \pm écart-type, n=3) obtenus par la méthode SIM de GC-MS

Quantité (μg)	LCA	DOCA	CDCA	CA	UDCA
0.02	0.27 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00	0.09 \pm 0.00	0.11 \pm 0.00
0.04	0.27 \pm 0.02	0.18 \pm 0.00	0.12 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00
0.06	0.28 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01
0.08	0.27 \pm 0.00	0.18 \pm 0.01	0.12 \pm 0.02	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01
0.16	0.25 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00	0.08 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00
0.40	0.27 \pm 0.01	0.18 \pm 0.00	0.11 \pm 0.01	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01
0.80	0.28 \pm 0.02	0.19 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01
1.00	0.75 \pm 0.01	0.89 \pm 0.02	0.53 \pm 0.03	0.32 \pm 0.03	0.53 \pm 0.02
2.00	0.34 \pm 0.01	0.36 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.23 \pm 0.01
3.00	0.39 \pm 0.03	0.38 \pm 0.02	0.22 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01
4.00	0.76 \pm 0.20	0.79 \pm 0.30	0.46 \pm 0.16	0.22 \pm 0.08	0.45 \pm 0.16
5.00	0.62 \pm 0.02	0.62 \pm 0.02	0.35 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	0.29 \pm 0.02

4.2 Analyse des acides biliaires sériques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive avant et 6 mois après le traitement avec l'acide ursodéoxycholique par le MS-MS et le GC-MS

La figure 9a représente le spectre de masse des acides biliaires retrouvés dans le sérum du patient C prélevé avant l'administration de UDCA et la figure 9b correspond au spectre de masse des acides biliaires retrouvé dans le sérum du

même patient après 6 mois de traitement. On n'a détecté aucun acide biliaire sous forme libre dans ces spectres de masse, ainsi que dans les spectres de masses obtenus à partir des sérums des autres patients. Tous les acides biliaires retrouvés dans les sérums de ces 13 patients étaient conjugués à la glycine ou à la taurine.

L'utilisation du spectromètre de masse permet facilement détecter la présence des acides biliaires dihydroxylés conjugués à la glycine (pic 448.6), les dihydroxylés conjugués à la taurine (pic 498.6), ainsi que les trihydroxylés conjugués à la glycine ou taurine (pics 464.7 et 514.7 respectivement). Les pic correspondant aux acides biliaires monohydroxylés conjugués (432.6 et 482.6) ne sont pas visibles sur ces spectres, à cause de la très faible quantité des ces produits dans les sérums. Toutefois, on pourrait facilement les identifier en demandant un agrandissement des spectres. Le pic 405.5 correspond à l'étalon interne (5 β -cholanique 3 α , 12 α diol-7 one) ajouté dans le sérum. On n'a détecté aucun acide biliaire anormal dans les sérums des patients prélevés avant et 6 mois après l'administration de UDCA (figure 9a et 9b).

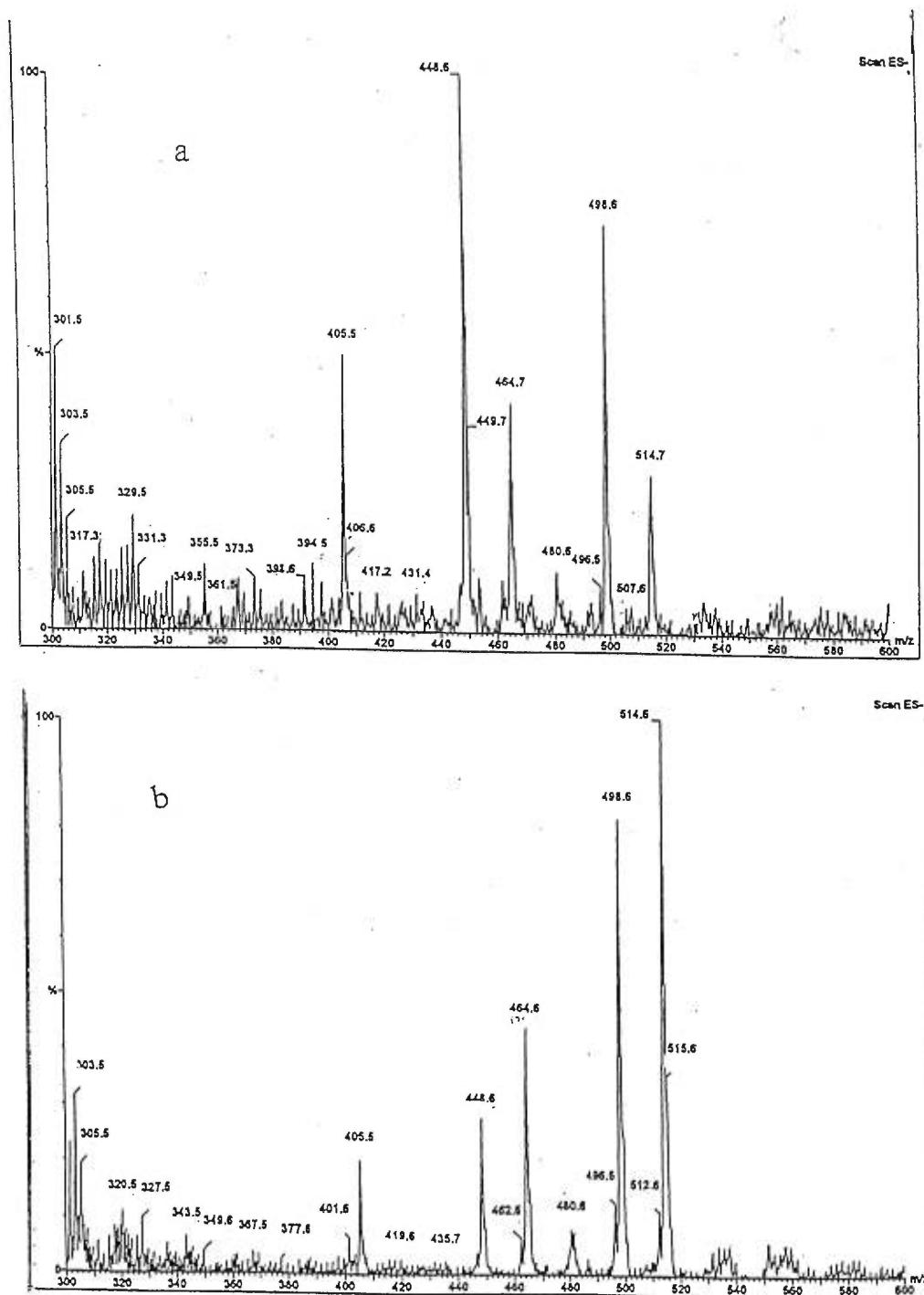


Figure 9. Le spectre de masse des acides biliaires du sérum du patient C, avant (a) et 6 mois après (b) l'administration de l'acide ursodéoxycholique, obtenus par le mode de balayage du MS-MS

Le tableau IX démontre la proportion des acides biliaries monohydroxylés, dihydroxylés et trihydroxylés totaux (glycoconjugués + tauroconjugués) retrouvées dans les sérums de 13 patients atteints de cirrhose biliaire primitive par le MS-MS. En moyenne, avant le début du traitement, la proportion des monohydroxylés est de $1.58\% \pm 0.58$, la proportion des dihydroxylés est de $33.76\% \pm 17.72$ et la proportion des trihydroxylés est de $64.66\% \pm 17.87$. Lorsqu'on a analysé les sérums prélevés après 6 mois de traitement avec UDCA, il n'y a pas eu de changement significatif dans la proportion des monohydroxylés ($2.11\% \pm 0.79$), la proportion des acides biliaries dihydroxylés a augmenté de façon significative à $56.10\% \pm 19.77$, alors que la proportion des acides biliaries trihydroxylés a baissé significativement à $41.79\% \pm 19.67$. En moyenne, la quantité totale des acides biliaries avant le traitement est de $56.47 \mu\text{M} \pm 18.82$ et elle est de $53.54 \mu\text{M} \pm 32.95$ suite à l'administration de l'acide ursodéoxycholique.

Tableau IX. Proportion des acides biliaires sériques de 13 patients atteints de cirrhose biliaire primitive avant (T0) et 6 mois après (T6) l'administration de l'acide ursodéoxycholique, obtenue par le MS-MS

Patients	Mono-hydroxylés (%)	Di-hydroxylés (%)	Tri-hydroxylés (%)	Total (µM)
A-0	1.17	19.10	79.73	57.24
A-6	1.60	20.93	77.47	75.14
B-0	1.58	37.09	61.33	47.30
B-6	1.42	72.91	25.67	55.33
C-0	1.75	19.20	79.05	68.96
C-6	2.24	42.07	55.69	33.02
D-0	1.18	36.03	62.79	46.44
D-6	1.14	64.73	34.13	39.23
E-0	2.25	20.33	77.42	36.85
E-6	3.79	63.15	33.06	46.29
F-0	1.33	57.28	41.39	77.89
F-6	1.50	80.55	17.95	152.00
G-0	1.93	77.90	20.17	52.18
G-6	1.70	83.00	15.30	41.63
H-0	1.96	34.20	63.84	87.29
H-6	2.84	66.82	30.34	43.53
I-0	1.05	34.21	64.74	73.54
I-6	2.75	52.00	45.25	54.02
J-0	2.94	37.92	59.14	55.88
J-6	1.34	70.13	28.53	29.09
K-0	1.12	14.89	83.99	31.97
K-6	2.70	47.08	50.22	42.83
L-0	1.42	33.41	65.17	72.78
L-6	1.69	27.93	70.38	63.91
M-0	0.87	17.36	81.77	25.80
M-6	2.70	38.06	59.24	19.97
Moyenne ± écart-type (T0)	1.58 ± 0.58	33.76 ± 17.72	64.66 ± 17.87	56.47 ± 18.82
Moyenne ± écart-type (T6)	2.11 ± 0.79	56.10 ± 19.77	41.79 ± 19.67	53.54 ± 32.95

Le tableau X démontre le rapport glycine : taurine et les proportions des acides biliaires conjugués à la glycine ou la taurine pour chaque patient obtenues par le MS-MS. En moyenne, la proportion des glycoconjugués retrouvée dans le sérum des patients avant l'administration de UDCA est de $51.07\% \pm 8.49$ et la proportion des acides biliaires conjugués à la taurine est de $48.93\% \pm 8.49$. Suite à l'administration de UDCA, les glycoconjugués occupaient en moyenne $73.48\% \pm 4.66$ du total (augmentation significative) et la proportion des tauroconjugués a diminué à $26.52\% \pm 4.66$ (diminution significative). Dans l'ensemble, avant l'administration de l'acide ursodéoxycholique, la proportion des glycoconjugués est légèrement supérieure à celle des tauroconjugués (54.26% vs 45.74%); leur proportion devient beaucoup plus importante que celle des tauroconjugués suite à l'administration de l'acide ursodéoxycholique (73.48% vs 26.52%). En moyenne, il y a une augmentation significative du rapport glycine:taurine sous traitement avec l'acide ursodéoxycholique (1.11 ± 0.36 vs 2.88 ± 0.69).

Tableau X. Le rapport glycine/taurine des acides biliaires avant (T0) et 6 mois après (T6) le traitement avec l'acide ursodéoxycholique chez les 13 patients obtenu par le MS-MS

Patients	Glyco-conjugés (%)	Tauro-conjugés (%)	G/T
A-0	55.76	44.24	1.26
A-6	68.46	31.54	2.17
B-0	54.71	57.29	1.21
B-6	70.12	29.88	2.35
C-0	51.16	48.84	1.05
C-6	71.77	28.23	2.54
D-0	40.57	59.43	0.68
D-6	71.17	28.83	2.47
E-0	36.99	63.01	0.59
E-6	76.60	23.40	3.27
F-0	52.00	48.00	1.08
F-6	75.59	24.41	3.10
G-0	57.09	42.91	1.33
G-6	80.27	19.73	4.07
H-0	55.36	44.64	1.24
H-6	78.10	21.90	3.57
I-0	44.95	55.05	0.82
I-6	79.80	20.20	3.95
J-0	62.46	37.54	1.66
J-6	64.38	35.62	1.81
K-0	63.40	36.60	1.73
K-6	70.46	29.54	2.38
L-0	39.00	61.00	0.64
L-6	74.93	25.07	2.99
M-0	50.45	49.55	1.19
M-6	73.60	26.40	2.79
Moyenne ± écart-type (T0)	51.07 ± 8.49	48.93 ± 8.49	1.11 ± 0.36
Moyenne ± écart-type (T6)	73.48 ± 4.66	26.52 ± 4.66	2.88 ± 0.69

Le tableau XI présente en moyenne les proportions des différents acides biliaires glycoconjugués et tauroconjugués mesurées dans les sérums des 13 patients atteints de CBP avant et après 6 mois de traitement avec l'acide ursodéoxycholique. Avant le traitement, la proportion des monohydroxylés conjugués à la taurine est de $0.72\% \pm 0.41$ et il y a une augmentation légère, mais non significative de leur proportion suite au traitement ($1.01\% \pm 0.52$). La proportions des dihydroxylés tauroconjugués a restée presque inchangée après le traitement ($12.37\% \pm 5.69$ vs $11.02\% \pm 0.12$). Les trihydroxylés tauroconjugués occupaient $35.84\% \pm 12.74$ du pool total des acides biliaires avant l'administration de UDCA et il y a eu une diminution significative de leur proportion après le traitement ($14.49\% \pm 10.47$). La proportion des acides biliaires monohydroxylés conjugués à la glycine n'a pas changé de façon significative après le traitement ($0.86\% \pm 0.66$ vs 1.10 ± 0.83). Il y a eu une augmentation significative de la proportion des dihydroxylés conjugués à la glycine ($21.39\% \pm 16.45$ vs $45.08\% \pm 17.72$). La proportion des acides biliaires trihydroxylés conjugués à la glycine a restée presque inchangée après l'administration de UDCA ($28.82\% \pm 14.56$ vs $27.30\% \pm 13.36$).

Tableau XI. Proportions (moyenne \pm écart-type) des différents acides biliaires conjugués avant (T0) et 6 mois après (T6) le traitement avec l'acide ursodéoxycholique de 13 patients atteints de cirrhose biliaire primitive, mesurées par le MS-MS

Acides biliaires	Avant traitement (T0) (%)	Après traitement (T6) (%)
Tauro-mono-hydroxylés	0.72 \pm 0.41	1.01 \pm 0.52
Tauro-di-hydroxylés	12.37 \pm 5.69	11.02 \pm 0.12
Tauro-tri-hydroxylés	35.84 \pm 12.74	14.49 \pm 10.47
Glyco- mono-hydroxylés	0.86 \pm 0.66	1.10 \pm 0.83
Glyco- di-hydroxylés	21.39 \pm 16.45	45.08 \pm 17.72
Glyco- tri-hydroxylés	28.82 \pm 14.56	27.30 \pm 13.36

Les tableaux XIIa et XIIb comparent le profil des acides biliaires sériques de 7 des 13 patients analysés par le GC-MS et le MS-MS. Le tableau XIIa démontre la proportion des acides biliaires mono-, di-, et trihydroxylés retrouvés avant et après 6 mois de traitement dans les sérums de 7 des 13 patients analysés par le GC-MS. On a calculé le pourcentage de LCA (mono-hydroxylé), DOCA, CDCA et UDCA (di-hydroxylés) et CA (tri-hydroxylé) dans les sérums prélevés avant et 6 mois après le traitement avec l'acide ursodéoxycholique. En moyenne, la proportion des acides biliaires mono-hydroxylés avant l'administration de UDCA est de 1.30% \pm 0.71 et elle a restée presque inchangée sous le traitement (2.00% \pm 0.92). Avant le traitement, les acides biliaires di-hydroxylés occupaient 21.76% \pm 10.78 du total des acides biliaires alors qu'il y a eu une augmentation

Tableau XIIa. Proportion des acides biliaires sériques de 7 patients atteints de cirrhose biliaire primitive avant (T0) et 6 mois après (T6) l'administration de l'acide ursodéoxycholique, mesurée par le GC-MS

Patients	Mono-hydroxylés (%)	Di-hydroxylés (%)	Tri-hydroxylés (%)	Total (µM)	% UDCA
A-0	1.72	21.10	77.18	124.55	0.00
A-6	1.46	15.71	82.83	142.75	6.12
B-0	0.98	32.44	66.58	67.13	0.00
B-6	1.12	79.05	19.83	43.91	33.10
C-0	1.08	11.37	87.55	207.95	0.00
C-6	1.77	28.04	68.62	269.93	17.20
H-0	1.54	25.33	73.13	156.24	0.00
H-6	3.45	52.23	44.32	234.75	46.67
K-0	2.55	38.20	59.25	85.07	0.00
K-6	1.91	54.69	43.40	113.89	37.26
L-0	0.90	11.90	87.20	204.80	0.00
L-6	1.21	47.39	51.40	181.64	30.73
M-0	0.33	12.01	87.66	114.15	0.00
M-6	3.08	48.29	48.63	105.56	40.21
Moyenne ±écart-type (T0)	1.30± 0.71	21.76± 10.78	76.94± 11.31	121.13± 72.83	0.00
Moyenne ±écart-type (T6)	2.00± 0.92	46.49± 20.22	51.30± 20.00	156.06± 78.42	30.18± 14.02

significative dans leur proportion ($46.49\% \pm 20.22$) après 6 mois de traitement. La proportion des trihydroxylés était de $76.94\% \pm 11.31$ avant le traitement et elle a baissé à $51.30\% \pm 20.00$ (significative). La proportion de UDCA retrouvée dans les sérums prélevés 6 mois après l'administration de UDCA de ces 7 patients est en moyenne $30.18\% \pm 14.02$, variant entre 6.12% et 46.67%. 2 patients ont seulement un taux d'UDCA égal ou légèrement supérieur à 40% dans leur sérum (patients H et M).

Le tableau XIIb représente la proportion des différents acides biliaires retrouvés dans les sérums de ces 7 patients, prélevés avant et après traitement avec l'acide ursodéoxycholique, mesurées par le MS-MS. En comparant les données des tableaux XIIa et XIIb, il n'y a pas de différences significatives dans le profil des acides biliaires sériques des 7 patients obtenu par les deux méthodes d'analyse, le GC-MS et le MS-MS.

La quantité totale (μM) des acides biliaires sériques des patients avant et après le traitement a été aussi calculée par le MS-MS et le GC-MS (Tableaux XIIa et XIIb). Il y a une différence significative dans les résultats obtenus par les deux méthodes. Les valeurs obtenues par le GC-MS sont beaucoup plus élevées que ceux obtenues par le MS-MS. En moyenne, la quantité totale d'acides biliaires obtenues par MS-MS est de $55.91 \mu\text{M} \pm 22.34$ avant le traitement et elle est de $47.67 \mu\text{M} \pm 18.71$ après l'administration de l'acide ursodéoxycholique. Avec le GC-MS, la quantité totale d'acides biliaires est de $121.13 \mu\text{M} \pm 72.83$

(T0) et $156.06 \mu\text{M} \pm 78.42$ (T6). Ainsi, la quantification des acides biliaires par le MS-MS n'a pas pu être validée.

Tableau XIIIb. Proportion des acides biliaires sériques de 7 patients atteints de cirrhose biliaire primitive avant (T0) et 6 mois après (T6) l'administration de l'acide ursodéoxycholique, mesurée par le MS-MS

Patients	Mono-hydroxylés (%)	Di-hydroxylés (%)	Tri-hydroxylés (%)	Total (μM)
A-0	1.17	19.10	79.73	57.24
A-6	1.60	20.93	77.47	75.14
B-0	1.58	37.08	61.33	47.30
B-6	1.42	72.91	20.67	55.33
C-0	1.75	19.20	79.05	68.96
C-6	2.24	42.07	54.69	33.02
H-0	1.96	34.20	63.84	87.29
H-6	2.84	66.82	30.34	43.53
K-0	1.12	14.89	83.99	31.97
K-6	2.70	47.08	49.22	42.83
L-0	1.42	33.41	65.17	72.78
L-6	1.69	26.93	70.38	63.91
M-0	0.87	17.36	81.77	25.80
M-6	2.70	38.06	59.24	19.97
Moyenne ±écart- type (T0)	1.41 ± 0.38	25.03 ± 9.40	73.55 ± 9.65	55.91 ± 22.34
Moyenne ±écart- type (T6)	2.17 ± 0.82	46.89 ± 17.03	50.51 ± 17.38	47.67 ± 18.71

5 DISCUSSION ET CONCLUSION

5.1 Extraction et purification des acides biliaires par les cartouches C₁₈

Les acides biliaires jouent un rôle important dans la régulation du niveau de cholestérol corporel et facilitent l'excrétion des lipides par leur action détergent. Chez l'homme, les acides biliaires sont concentrés surtout dans le vésicule biliaire à des concentrations millimolaires, alors que la concentration des acides biliaires dans le sérum d'un sujet normal est environ mille fois moindre dû à la clairance hépatique. Le profil des acides biliaires est très important dans le criblage et le diagnostic des maladies hépatiques. Dans les maladies hépatobiliaires et intestinales, la synthèse hépatique, la clairance des acides biliaires ainsi que leur absorption intestinale deviennent anormales et on observe souvent une élévation de leurs concentrations sériques, urinaires et fécales.

L'analyse des acides biliaires dans les milieux biologiques demeure toujours une tâche très difficile principalement à cause de leur nature très complexe (différentes formes et structures) et aussi, à cause de leur faible quantité dans les fluides biologiques tels le sérum et l'urine. Il devient donc nécessaire d'avoir des techniques d'extraction qui permettent d'éliminer les molécules de poids moléculaires semblables à ceux des acides biliaires et de concentrer les échantillons avant d'être analysés.

Les méthodes d'extraction et purification des acides biliaires ont évolué de façon considérable. Les cartouches C₁₈ ont été introduites par Shackleton et Whitney (Shackleton et Whitney, 1980) ainsi que par Goto et Nambara (Goto et Nambara, 1991). Ils sont utilisés couramment dans l'analyse de plusieurs composés lipophiles et amphipatiques endogènes et exogènes. L'adsorption des acides biliaires sur les cartouches octadécylsilane C₁₈ a fait l'objet des études par Setchell et collaborateurs (Setchell et Worthington, 1982; Setchell et Matsui, 1983; Sjövall et Setchell, 1988; Rodrigues et Setchell, 1996). Dans notre étude, on a d'abord essayé de valider l'efficacité de ces cartouches dans l'extraction des acides biliaires. Lorsque les acides biliaires sont simplement dilués dans l'eau, le taux d'extraction se situe entre 87.6% et 94.5%, avec le taux le plus faible pour l'acide biliaire hydrophobe, LCA, et la valeur la plus élevée pour l'acide biliaire hydrophile, CA. Le taux d'extraction des acides biliaires a été aussi déterminé plus loin dans l'étude à l'aide du MS-MS, lorsqu'ils étaient dilués dans du sérum et le taux de récupération était supérieur à 88.35%. Il s'agit d'une méthode facile et rapide qui permet d'éliminer l'excès de cholestérol et de concentrer davantage les acides biliaires sériques des milieux biologiques (sérum, urine, bile) en quelques minutes.

5.2 Identification et caractérisation des acides biliaires par le MS-MS

Le développement de méthodes sensibles et précises a été le sujet de plusieurs études qui, au cours des années, ont permis d'améliorer des méthodes

déjà existantes. Plusieurs méthodes sont utilisées dans l'analyse des acides biliaires: méthodes enzymatiques, chromatographie sur couches minces, chromatographie gazeuse, chromatographie à haute performance et chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (Scalia, 1995; Roda et al., 1997; Batta et Salen, 1999). Cependant toutes ces méthodes diffèrent entre elles au niveau de leur spécificité, sensibilité et simplicité. Le GC-MS a contribué plus que toute autre méthode à l'élucidation de la structure des acides biliaires présents dans les fluides biologiques. Les spectres de masse des acides biliaires obtenus par cette technique ont été bien documentés (Sjövall et al., 1971; Miyazaki et al., 1974; Elliot, 1980). Le GC-MS est considéré présentement la méthode de référence dans l'analyse des acides biliaires (Mannes et al., 1987; Roda et al., 1988)

Dans notre étude, on a voulu valider une nouvelle technique analytique, le spectromètre de masse en tandem (MS-MS), pour l'identification et la quantification des acides biliaires. Les acides biliaires libres et conjugués sont détectés selon leur poids moléculaire. Cependant, comme mentionné avant, en absence d'une colonne de séparation, on obtient un seul pic pour les acides biliaires ayant le même poids moléculaire et il est impossible de les différencier les uns des autres dans le même mélange. Ainsi, en utilisant le mode de balayage, on peut seulement confirmer la présence des acides biliaires mono-, di- ou trihydroxylés en général. L'avantage de l'utilisation du MS-MS dans l'identification des acides biliaires est sa rapidité lorsqu'on veut identifier les différents acides biliaires dans un mélange inconnu. Cette méthode demande très

peu de préparation préalable des échantillons avant leur injection, comparativement au GC-MS qui demande des étapes de préparations longues et laborieuses pour rendre les molécules volatiles avant leur injection dans l'appareil. De plus, le spectromètre de masse en tandem permet d'obtenir des informations complémentaires à ceux obtenus par le GC-MS. Avec le GC-MS, les acides biliaires sont dérivatisés et déconjugués et le spectre de masse contient seulement les acides biliaires à l'état libre. Par ailleurs, avec le MS-MS, on peut mesurer directement les conjugués glycine et taurine des acides biliaires sans hydrolyse des conjugués ni préparation de dérivés volatils. Cependant, jusqu'à présent, il n'y a pas d'études qui ont été effectuées sur la quantification des acides biliaires par le MS-MS. On a tenté de quantifier les acides biliaires sériques des patients par cette nouvelle technique. Malgré le fait que le profil des acides biliaires des patients obtenu par le MS-MS et le GC-MS soit comparable, on obtient des quantités beaucoup plus élevées avec le GC-MS, qui a servi de méthode de référence dans l'analyse des acides biliaires.

5.3 Analyse des acides biliaires sériques des patients atteints de cirrhose biliaire primitive traités avec l'acide ursodéoxycholique par le MS-MS et le GC-MS

Les acides biliaires étant de puissants détergents induisent des lésions au niveau des cellules hépatiques (nécrose hépatocytaire, puis fibrose). Ce sont ces

lésions qui conduisent progressivement à une cirrhose biliaire et qui sont responsables des complications de la maladie. Dans les conditions physiologiques normales, les monohydroxylés occupent environ 12% du pool total des acides biliaires, les acides biliaires dihydroxylés et trihydroxylés en occupent respectivement 73% et 15% (Mannes et al., 1987). L'accumulation hépatique des acides biliaires hydrophobes semble jouer un rôle central dans les dommages hépatiques cholestatiques (Greim et al., 1972; Attili et al., 1986; Hofmann, 1990; Schmucker et al., 1990). Certaines études ont démontré que les niveaux hépatiques des acides biliaires dihydroxylés hydrophobes, le CDCA et le DOCA, sont en corrélation avec le degré des dommages hépatiques (Greim et al., 1972; Schmucker et al., 1990).

L'acide ursodéoxycholique, un acide biliaire dihydroxylé, est largement utilisé aujourd'hui dans le traitement des maladies cholestatiques chroniques apportant une amélioration clinique, biologique et histopathologique avec peu d'effets secondaires. Les premiers effets bénéfiques de cet acide biliaire sur les tests hépatiques ont été publiés dans les années 1980 (Leuschner et al., 1985; Poupon et al., 1987; Leuschner et al., 1989). Ces effets bénéfiques ont déjà été observés par les Japonais (Mijayi et al., 1976). Le mécanisme d'action de l'acide ursodéoxycholique demeure obscur. Selon plusieurs études, lorsque UDCA est administré à une dose de 13-15 mg/kg/j chez les patients atteints de maladies hépatiques cholestatiques, il devient le sel biliaire principal dans le sérum et dans la bile et se substitue progressivement aux autres acides biliaires physiologiques,

le cholate, le chénodéoxycholate et le déoxycholate (Batta et al., 1989; Eusafzai et al., 1991; Mazella et al., 1991) pour occuper environ 40-60% du pool total des acides biliaires, sans un changement significatif dans la concentration totale des acides biliaires sériques (Poupon et al., 1987; Chrétien et al., 1989; Stiehl et al., 1990; Crosignani et al., 1991; Beuers et al., 1992).

Notre étude a confirmé que l'administration orale de l'ursodéoxycholique aux patients atteints de CBP induit un changement au niveau du profil des acides biliaires en circulation, avec une augmentation significative de la proportion des acides biliaires dihydroxylés, avec une augmentation de la proportion des glycoconjugués et une diminution significative des acides biliaires trihydroxylés, avec une diminution des tauroconjugués. Ces changements ont été aussi observés par Stiehl et al., dans une étude effectuée chez 29 patients atteints de CBP (Stiehl et al., 1990). Cependant, parmi les 7 sérums analysés par le GC-MS, chez seulement deux patients, UDCA occupait plus de 40% du total des acides biliaires sériques. La majorité des études ont démontré une diminution du pool des deux acides biliaires primaires endogènes, CA et CDCA (Roda et al., 1979; Lee et al., 1981; Nilsell et al., 1983) suite à l'administration de UDCA. Chrétien et al. (Chrétien et al., 1989) ont suggéré que l'augmentation des conjugués de UDCA et la diminution des acides biliaires primaires impliqueraient une inhibition compétitive pour l'absorption iléale entre les conjugués de UDCA et les conjugués de CDCA et de CA. L'absence de changement dans la proportion de LCA dans le sérum des patients dans cette étude peut suggérer que l'équilibre entre le taux de

formation et l'absorption intestinales d'un part et le taux d'extraction hépatique d'autre part n'a pas été affecté par UDCA.

Dans cette étude, on a aussi voulu vérifier l'hypothèse selon laquelle la présence d'acides biliaires anormaux dans les sérums analysés, pourrait possiblement avoir un lien avec l'inefficacité du traitement chez ces patients en particulier. Toutefois, on n'a observé aucun acide biliaire anormal dans les spectres de masse de chacun obtenu par le MS-MS. On ne connaît pas encore la cause du prurit; il ne semble pas être en relation avec le niveau d'acides biliaires au niveau de la peau ou du sérum (Ghent et al., 1977; 1978). D'autres études ont démontré que le prurit pourrait être médié par les neurotransmetteurs du système opioïde (Thornton et Losowsky, 1988; Bergassa, 1993). Certaines études ont montré que l'acide ursodéoxycholique est moins efficace dans les stades plus avancés de la maladie où l'état des patients s'est détérioré (Matsuzaki et al., 1990; Perdigo et al., 1992; Combes et al., 1993).

Des études récentes ont démontré que la bilirubine est le paramètre le plus important dans le pronostic des maladies hépatiques (Dickson et al., 1989; Bonnard, 1998). Lorsque la bilirubine est supérieure à 100 $\mu\text{mol/l}$, l'espérance de vie est souvent inférieure à deux ans et une transplantation hépatique doit être proposée (Erlinger, 1991). Les patients qui avaient normalisé sous traitement leur niveau de bilirubine avaient une meilleure amélioration clinique. Dans une autre étude effectuée par Jorgenson et al., ils ont démontré que les patients qui avaient

normalisé les épreuves hépatiques à la suite du traitement avaient initialement des niveaux plus faibles de bilirubine (Jorgenson et al., 1995). Dans l'ensemble, chez nos patients, le niveau des tests biochimiques (après traitement) est demeuré beaucoup plus élevé que le niveau normal, contrairement aux études effectuées par d'autres chercheurs (Poupon et al., 1987; Dickson et al., 1989; Christensen et al., 1993) où des améliorations significatives de la phosphatase alcaline, d'ALT, d'AST et de γ -GT sont généralement observées suite à l'administration de l'acide ursodéoxycholique. L'amélioration de ces paramètres s'observe normalement après les premiers mois et atteint un plateau après 3 à 6 mois de traitement (Matsuzaki et al, 1990).

En conclusion, la séparation et l'identification des acides biliaires se font présentement par des méthodes chromatographiques qui sont plus ou moins laborieuses. Le MS-MS est une nouvelle technique analytique prometteuse qui combine des étapes préanalytiques simples, sensibilité élevée, résolution efficace et faible limite de détection. Avec cette technique, on peut réaliser des analyses qualitatives des acides biliaires à partir des échantillons de sérum. Cependant, cette méthode ne semble pas valable pour la quantification des acides biliaires. Des études plus poussées seraient nécessaires pour améliorer la technique dans la quantification des acides biliaires. Par ailleurs, pour des études détaillées sur le profil des acides biliaires et de leurs conjugués, la combinaison de MS-MS et de GC-MS semble être la solution la plus efficace.

L'acide ursodéoxycholique a été utilisé avec des résultats très prometteurs pour la cirrhose biliaire primitive. Il pourrait ralentir l'évolution et éviter, ou tout au moins retarder, le recours à la transplantation. Les mécanismes par lesquels l'acide ursodéoxycholique améliore les indices biochimiques et morphologiques demeurent toujours mal compris. Des études plus poussées sur les mécanismes d'action ainsi que les effets de l'acide ursodéoxycholique sont nécessaires afin de fournir plus d'informations sur la survie à long terme des patients et comprendre pourquoi il n'y a pas d'amélioration clinique chez certains.

6 BIBLIOGRAPHIE

Accatino L, Simon FR. Identification and characterization of a bile acid receptor in isolated liver surface membranes. *J Clin Invest* 1976; 57:496-508.

Albert LJ: Anatomy of the normal liver. In: *Hepatology, a textbook of liver disease*, Boyer Z, Third edition. Vol. 1. 1996; 3-58.

Almé B, Bremmelgaard J, Sjövall J, Thomassen P. Analysis of metabolic profiles of bile acids in urine using a lipophilic anion exchanger and computerized gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res* 1977; 18:339-362.

Alpini G, Lenzi R, Sarkozi L, Tavoloni N. Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J Clin Invest* 1988; 81: 569-578.

Alvaro D, Angelico M, Gandin C, Gigliozzi A, Cantafora A, Masella R, Santini MT. Membrane fluidity and liver pathophysiology. In: Dianzani MU and Gentilini P, (eds). *Liver pathophysiology*. Pise, Excerpta Medica, 1994; 95-134.

Alvaro D, Mennone A, Boyer JL. Role of kinases and phosphatases in the regulation of fluid secretion and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997; 273 (2 Pt 1) : G303-G313.

Amselberg A, Boyapalli RR, Scheingart CD, Hofmann AF. Carrier-mediated transport of conjugated bile acids in the guinea pig jejunum: a new mechanism for conjugated bile acid absorption (abstract). *Gastroenterology* 1994;106:A219.

Ananthanarayanan M, Von Dippe P, Levy D. Identification of the hepatocyte Na⁺-dependant bile acid transport protein using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 1988; 263: 8338-8343.

Angelin B, Björkhem I, Einarsson K. Individual serum bile acid concentration in normo- and hyperlipoproteinemia as determined by mass fragmentography: relation to bile acid pool size. *J Lipid Res* 1978; 19: 527-537.

Anwer MS, Kroker R, Hegner D, Petter A. Cholic acid uptake in isolated rat hepatocytes. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 1977; 358:543-553.

Attili AF, Angelico M, Cantafora A, Alvaro D, Capocaccia L. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids. *Med Hypotheses* 1986; 19:57-69.

Azer SA, Murray M, Farrell GC, Stacy NH. Selectivity and sensitivity of changes in serum bile acids during induction of cirrhosis in rats. *Hepatology* 1993; 18:1224-1231.

Ballatori N, Truong AT. Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am J Physiol* 1989; 256:G22-G30.

Ballatori N, Truong AT. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J Physiol* 1992; 263(5 Pt 1): G617-G624.

Barnhart JL, Combes B. Effect of theophylline on hepatic excretory function. *Am J Physiol* 1974; 227:194-199.

Bartholomew TC, Summerfield JA, Billing BH, Lawson AM, Setchell KDR. Bile acid profiles of human serum and skin interstitial fluid and their relationship to

pruritus studied by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Sci* 1982; 63:65-73.

Batta AK, Salen G, Shefer S, Tint GS, Dayal B. The effect of tauroursodeoxycholic acid and taurine supplementation on biliary bile acid composition. *Hepatology* 1982; 2:811-816.

Batta AK, Arora R, Salen G, Katz S. Characterization of serum and urinary bile acids in patients with primary biliary cirrhosis by gas-liquid chromatography-mass spectrometry: effect of ursodeoxycholic acid treatment. *J Lipid Res* 1989; 30:1953-1962.

Batta AK, Salen G. Gas chromatography of bile acids. *J Chromatography* 1999; 723:1-16.

Bergasa NV, Jones EA. The pruritus of cholestasis. *Semin Liv Dis* 1993; 13:319-327.

Berk PD, Javitt NB. Hyperbilirubinemia and cholestasis. *Am J Med* 1978; 64:311-326.

Beuers U, Spengler U, Zwiebel FM, Pauletzki J, Fischer S, Paugmartner G. Effect of ursodeoxycholic acid on kinetics of major hydrophobic bile acids in health and in chronic cholestatic liver disease. *Hepatology* 1992; 15:603-608.

Blitzer BL, Boyer JL. Cytochemical localization of Na⁺, K⁺-ATPase in the rat hepatocyte. *J Clin Invest* 1978; 62:1104-1108.

Bloomer JR, Allen RM, Klatskin G. Serum bile acids in primary biliary cirrhosis. *Arch Intern Med* 1976; 136:57-61.

Blouin A, Bolender RP, Weibel ER. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non-hepatocytes in the rat liver parenchyma. *J Cell Biol* 1977; 72:441-445.

Bodenheimer HC, Schaffner F, Sternlieb I, Klion FM, Vernace S, Pezzullo J. A prospective clinical trial of D-penicillamine in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1985; 5:1139-1142.

Bodenheimer HC, Schaffner F, Pezzullo J. Evaluation of colchicine therapy in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1988; 95:124-129.

Bolt MG, Boyer JL. Pitfalls in serum bile acid analysis in patients with cholestasis: differing biochemical properties of 3-hydroxysteroid dehydrogenases from wild type and mutant *Ps-testosteroni*. In: Paumgartner G, Stiehl A, Editors. *Bile acid metabolism in health and disease*. Baltimore, University Park Press, 1977; 285-292.

Bonnand AM, Heathcote EJ, Lindor K, Poupon RE. Clinical significance of serum bilirubin levels under ursodeoxycholic acid therapy in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1998; 29:39-43.

Bouchier IAD, Pennington CR. Serum bile acids in hepatobiliary disease. *Gut* 1978; 19: 492-496.

Bouwens L, Wisse E. Pit cells in the liver. *Liver* 1992; 12:3-9.

Boyer JL, Klatskin G. Canalicular bile flow and bile secretory pressure . *Gastroenterology* 1970; 59:853-859.

Boyer JL. Canalicular bile formation in the isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 1971; 221:1156-1163.

Boyer JL. Mechanisms of bile secretion and hepatic transport. In: Andreoli TE, Hofmann AG, Fanestil DD, Schultz SH, (eds). Physiology of membrane disorders. New York, Plenum Publishing Corp., 1986; 609-636.

Brauer RW. Liver circulation and function. *Physiol Rev* 1963; 43:115-213.

Brenard R, Degos F, Degott C, Lassoued K, Benhamou JP. La cirrhose biliaire primitive: modes actuels de présentation. *Gastroenterol Clin Biol* 1990; 14:307-312.

Bruusgaard A, Soreneu H, Gilhus-Moe CC, Skalhegg BA. Bile acid determination with different preparation of 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Clin Chim Acta* 1977; 77:387-395

Burke CW, Lewis B, Panveliwalla D, Tabaqchali S. The binding of cholic acid and its taurine conjugates to serum proteins. *Clin Chim Acta* 1971; 32:207-214.

Cabral DJ, Small DM. Physical chemistry of bile. In: Schultz SG, Forte JG, Rauner BB, (eds). Handbook of physiology- the gastrointestinal system III, section 6. Baltimore, American Physiological Society, 1989; 621-662.

Calmus Y, Gane P, Rouger P, Poupon R. Hepatic expression of class I and class II major histocompatibility complex molecules in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990; 11:12-15.

Calmus Y, Weill B, Poupon R. Expression hépatique des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité. *Gastroenterol Clin Biol* 1991; 15:110-119.

Calmus Y, Podevin P, Robert A, Poupon R. Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on expression of procoagulant activity by human monocytes. *J Hepatology* 1994; 20:466-472.

Carey M. Physical-chemical properties of bile acids and their salts. In: Danielsson H, Sjövall J, (eds). *Sterols and bile acids (new comprehensive biochemistry)*, Vol 12. Amsterdam, Elsevier, 1985; 345-403.

Carey M, Cohen DE. Biliary transport of cholesterol in vesicles, micelles and liquid crystals. In: Paugmartner G, Stiehl A, Gerok W, (eds). *Bile acids and the Liver. Falk Symposium #45*. Boston, MTP Press, 1987; 287-345.

Carey M, Douane WC. Enterohepatic circulation. In: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachterand DA, Shafritz. *The Liver: Biology and Pathobiology*, Third Edition. New York, Raven press, 1994; 719-767.

Cereijido M, Pince A, Gonzales M. Tight junctions and apical basolateral polarity. *J Membrane Biol* 1989; 110 : 1-9.

Chen LJ, Bolt RJ, Admirand WH. Enzymatic sulfation of bile salts : partial purification and characterization of an enzyme from rat liver that catalyzes the sulfation of bile salts. *Biochim Biophys Acta* 1977; 480: 219-227.

Child CG, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. In: Child CG, (ed). *The Liver and Portal Hypertension*. Philadelphia, Saunders Co.; 1964; 50-75.

Chrétien Y, Poupon R, Gherardt MF. Bile acid glycine and taurine conjugates in serum of patients with primary biliary cirrhosis. *Gut* 1989; 30:1110-1115.

Christensen E, Neuberger J, Crowe J, Altman DG, Popper H, Portmann B, Donniach D, Ranek L, Williams R. Beneficial effect of azathioprine and prediction of prognosis in primary biliary cirrhosis. Final results of an international trial. *Gastroenterology* 1985; 89:1084-1089.

Christensen E, Altman DG, Neuberger J, Tystrup N, Williams R. Updating prognosis in primary biliary cirrhosis using a time-dependant Cox regression model. PBC1 and PBC2 trial groups. *Gastroenterology* 1993; 105:1865-1876.

Cohen DE, Carey MC. Acyl chain unsaturation modulates distribution of lecithin molecular species between mixed micelles and vesicles in model bile. Implications for particle structure and metastable cholesterol solubilities. *J Lipid Res* 1991; 32:1291-1302.

Cohen DE, Leighton LS, Carey MC. Bile salt hydrophobicity controls vesicle secretion rates and transformations in the native bile. *Am J Physiol* 1992; 263:G386-G395.

Coleman R, Holdsworth G, Vyvoda AS. In: Popper H, Bianchi L, Rutter W, (eds). *Membrane alterations as the basis of liver injury*. Baltimore, University Park Press, 1977;143-156.

Coleman R. Biochemistry of bile secretion. *Biochem J* 1987; 244:249-261.

Coleman R. Bile salts and biliary lipids. *Biochem Soc Trans* 1987; 15 (suppl): 68S-80S.

Coleman R, Rahman K, Bellringer ME. Biliary lipid secretion and its control. In: Northfield T, Azrawi R, Zentler-Munro P (eds). *Bile acids in health and disease*. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1988; 27-39.

Combes B, Carithers RI, Maddrey WC. A randomized double blind placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis (abstract). *Hepatology* 1993; 18: 175A.

Cornelius CE. Comparative bile pigment metabolism in vertebrates. In: Ostraw JD, (ed). *Bile pigments and jaundice*. New York, Marcel Dekker, 1986; 601-634.

Cotting J, Lentze MJ, Reichen J. Effect of ursodeoxycholic acid treatment on nutrition and liver function in patients with cystic fibrosis and longstanding cholestasis. *Gut* 1990; 31:918-921.

Cowen AE, Korman MG, Hofmann AF, Cass OW. Metabolism of lithocholate in healthy man. I. Biotransformation and biliary excretion of intravenously administered lithocholate, lithocholyglycine, and their sulfates. *Gastroenterology* 1975; 69:59-66.

Cowen AE, Korman MG, Hofmann AF, Cass OW, Coffin SB. Metabolism of lithocholate in healthy man. II. Enterohepatic circulation. *Gastroenterology* 1975; 69:67-76.

Crawford JM, Berken CA, Gollan JL. Role of hepatocyte microtubular system in the excretion of bile salts and biliary lipid: implications for intracellular vesicular transport. *J Lipid Res* 1988; 29:144-156.

Crawford JM, Gollan JL. Transcellular transport of organic anions in hepatocytes. Still a long way to go. *Hepatology* 1991;14:192-197.

Crosignani A, Podda M, Battezzati PM, Bertolini E, Zuin M, Watson D, Setchell KD. Changes in bile acid composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic administration. *Hepatology* 1991; 14:1000-1007.

Danielsson H, Rutter WH. The metabolism of bile acids in the developing rat liver. *Biochemistry* 1968; 7:346-352.

DePierre JW, Anderson G, Dallner G. Endoplasmic reticulum and Golgi complex. In: Arias IM, Jacoby WB, Popper H, Schachter D, Schafritz D (eds). *The Liver: Biology and Pathobiology*, second edition. New York, Raven Press, 1988; 165-187.

Dickson ER, Grambsch PM, Fleming TR, Fisher LD, Langworthy A. Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making. *Hepatology* 1989; 10:1-7.

Duane WC, Levitt DG, Mueller SM, Behrens JC. Regulation of bile acid synthesis in man. Presence of diurnal rhythm. *J Clin Invest* 1983; 72:1930-1936.

Elliott WH. Identification of sterols and bile acids by computerized gas chromatography -mass spectrometry. *Lipids* 1980; 15: 764-769.

Elliott WH. Metabolism of bile acids in liver and extrahepatic tissues. In: Danielsson H, Sjövall J, (eds). *Sterols and bile acids (new comprehensive biochemistry)*, Vol 12. Amsterdam, Elsevier, 1985; 303-329.

Erlinger S, Dhumeaux D. Mechanism and control of secretion of bile water and electrolytes. *Hepatology* 1974; 66:281-304.

Erlinger S. La formation de la bile . *Revue du Praticien* 1991; 41(23) :2341-2346.

Erlinger S. Bile flow. In: Arias IM, Popper H, Jacoby WB, Schachter D, Shafritz DA, (eds). *The liver: Biology and Pathobiology*, third edition. New York, Raven Press, 1994; 769-788.

Eusufzai S, Ericsson S, Cederlund T, Einarsson K, Angelin B. Effect of ursodeoxycholic acid treatment on ileal absorption of bile acids in man as determined by the SeHCAT test. *Gut* 1991; 32:1044-1048.

Evans WH. A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim Biophys Acta* 1980; 604:27-64.

Fahimi DH. Sinusoidal endothelial cells and perisinusoidal fat-storing cells : structure and function. In Arias IM, Popper H, Schachter D, (eds). *The Liver : Biology and Pathology*, New York, Raven Press, 1982; 495-506.

Fausa O, Skalhogg BA. Quantitative determination of serum bile acids using a 7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Scan J Gastroenterol* 1977; 12:441-447.

Fischer A. Quatre familles de molécules responsables de l'adhérence intercellulaire. *Médecine/Sciences* 1991; 7:540-542.

Fischer CD, Cooper NS, Rothschild MA, Mosbach EH. Effect of dietary chenodeoxycholic acid and lithocholic acid in the rabbit. *Am J Dig Dis* 1974; 19:877-886.

Fischer MM, Paradine ME. Influence of ursodeoxycholic acid on biochemical parameters in cholestatic liver disease (abstract). *Gastroenterology* 1986; 90:1725.

Fleming CR, Ludwig J, Dickson ER. Asymptomatic primary biliary cirrhosis. Presentation, histology, and results with D-penicillamine. *Mayo Clin Proc* 1978; 53:587-593.

Fransson B, Schill G. Isolation of acidic conjugates by ion-pair extraction. *Acta Pharmacol Soc* 1975; 12:417-424.

Freedman MR, Holzbach RT, Ferguson DR. Pruritus in cholestasis: no direct cause for bile acid retention. *Am J Med* 1981; 70:1011-1016.

Fricker G, Schneider S, Gerok W, Kurz G. Identification of different transport system of bile salts in sinusoidal and canalicular membranes of hepatocytes. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1987; 368 : 1143-1150.

Frimmer M, Ziegler K. The transport of bile acids in the liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1988; 947:75-99.

Frohling W, Stiehl A. Bile salt glucuronides: identification and quantitative analysis in urine of patients with cholestasis. *Eur J Clin Invest* 1976; 6:67-74.

Fromm H, Carlson GL, Hofmann AF, Farviar S, Amin P. Metabolism in man of 7-ketolithocholic acid: a precursor of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids. *Am J Physiol* 1980; 239:G161-G166.

Fromm H, Sarva RP, Bazzoli F. Formation of ursodeoxycholic acid from chenodeoxycholic acid in the human colon: studies of the role of 7-ketolithocholic acid as an intermediate. *J Lipid Res* 1983; 24:841-853.

Galle PR, Theilmann I, Kohl B, Raedsch R, Stiehl A. Ursodeoxycholate reduces toxicity of different bile acids in human primary hepatocytes cultures. *Gastroenterology* 1989; 96: A599.

Galle PR, Theilmann I, Raedsch R, Otto G, Stiehl A. Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepatology* 1990; 12:486-491.

Gates GA, Henley KS, Pollard HM, Schmidt E, Schmidt FW. The cell population of human liver. *J Lab Clin Med* 1962; 57:182-184.

Ghent CN, Bloomer JR, Klatskin G. Elevation in skin tissue levels of bile acids in cholestasis: relation to serum levels and to pruritus. *Gastroenterology* 1977; 73:1125-1130.

Ghent CN. Pruritus of cholestasis is related to effects of bile salts on the liver, not the skin. *Am J Gastroenterol* 1987; 82:117-118.

Glasinovic JC, Dumont M, Duval M, Erlinger S. Hepatocellular uptake of bile acids in the dog: evidence for a common carrier-mediated transport system. *Gastroenterology* 1975; 69:973-981.

Gleeson D, Smith ND, Boyer JL. Bicarbonate-dependant and -independent intracellular pH regulatory mechanisms in rat hepatocytes. Evidence for Na^+ - HCO_3^- cotransport. *J Clin Invest* 1989; 84:312-321.

Goto J, Nambara T. Liquid chromatography in biomedical analysis. *J Chromatogr Library*, vol. 50, Elsevier, Amsterdam, 1991; 81-108.

Graf J. Canalicular bile salt-independent bile formation: concepts and clues from electrolyte transport in rat liver. *Am J Physiol* 1983; 244:G233-G246.

Greim H, Trulzsch D, Roboz J, Dressler K, Czygan P, Hutterer F, Schaffner F, Popper H. Mechanism of cholestasis. 6. Bile acids in human livers with or without biliary obstruction. *Gastroenterology* 1972; 63:846-850.

Groothuis GMM, Hardnok MJ, Keulemans KPT, Nieuwenhuis P. Autoradiographic and kinetic demonstration of acinar heterogeneity of taurocholate transport. *Am J Physiol* 1982; 243:G455-G462.

Guldutuna S, Zimmer G, Imhof M, Bhatti S, You T, Leuschner U. Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 1993; 104:1736-1744.

Gumucio JJ, Chianale J. Liver cell heterogeneity and liver function. In Arias, Jacoby WB, Popper H, Schachter D, Schafritz DA, (eds): *The liver: Biology and Pathobiology*, second edition. New York, Raven Press, 1988; 931-947.

Gumucio W, Balbaud C, Miller DL, DeMason LJ, Appelman HD, Stoecker J, Franzblau DR. Bile secretion and liver cell heterogeneity in the rat. *J Lab Clin Med* 1978; 91:350-362.

Gurantz D, Hofmann AF. Influence of bile acid structure on bile flow and biliary lipid secretion in hamster. *Am J Physiol* 1984; 247:G736-G748.

Gurantz D, Schteingart CD, Hagey LR, Steinbach JH, Grotmol T, Hofmann AF. Hypercholeresis induced by unconjugated bile acid infusion is mediated by biliary secretion and not hepatocyte retention of unconjugated bile acids. *Hepatology* 1991; 13:540-550.

Hardikar W, Suchy FJ. A new bile acid transporter? *Hepatology* 1993;18:1278-1279.

Hardison WG, Apter JT. Micellar theory of biliary cholesterol secretion. *Am J Physiol* 1972; 222:61-67.

Hardison WG. Relation of hepatic taurine pool size to bile acid conjugation in man and animals. *Prog Clin Biol Res* 1983; 125:407-417.

Hayes JD, Strange RC, Percy-Robb IW. Cholic acid binding by glutathione-s-transferase from rat liver cytosol. *Biochem J* 1980; 185:83-87.

Healy JE. Vascular anatomy of the liver. *Ann NY Acad Sci* 1970; 170:8-17.

Heathcote J, Ross A, Sherlock S. A prospective control trial of azathioprine in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1976; 70:656-660.

Hedenborg G, Norlander A, Norman A. Bile acid excretion during drainage of extrahepatic cholestasis with refeeding of bile. *Scand J Clin Lab Invest* 1982; 42:551-556.

Hedenborg G, Norman A. The nature of urinary bile acid conjugates in patients with extrahepatic cholestasis. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44:725-733.

Hepner GW, Hofmann AF, Thomas PJ. Metabolism of steroids and amino acid moieties of conjugated bile acids in man. I. Cholyglycine. *J Clin Invest* 1972; 51:1889-1897.

Hepner GW, Hofmann AF, Thomas PJ. Metabolism of steroids and amino acid moieties of conjugated bile acids in man. II. Glycine conjugated dihydroxy bile acids. *J Clin Invest* 1972; 51:1898-1905.

Hepner GW, Sturmman JA, Hofmann AF, Thomas PJ. Metabolism of steroids and amino acid moieties of conjugated bile acids in man. III. Cholyltaurine (taurocholic acid). *J Clin Invest* 1973; 52:433-440.

Heuman DM, Komito SF, Pandak WM, Vlahcevic ZR. Tauroursodeoxycholate protects against cholestatic and hepatocytolytic toxicity of more hydrophobic bile salts. *Gastroenterology* 1989; 96:A607.

Heuman DM, Pandak WM, Hylemon PB, Vlahcevic ZR. Conjugates of ursodeoxycholate protects against toxicity of more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Hepatology* 1991; 14:920-926.

Heuman DM. Hepatoprotective properties of ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 1993; 104:1865-1870.

Heuman DM, Bajaj R. Ursodeoxycholate conjugates protect against disruption of cholesterol rich membranes by bile salts. *Gastroenterology* 1994; 106:1333-1341.

Hillaire S, Boucher E, Calmus Y, Gane P, Ballet F, Franco D, Moukhtar M, Poupon R. Effects of bile acids and cholestasis on major histocompatibility

complex class 1 in human and rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1994; 107:781-788.

Hirano S, Masuda N, Oda H. In vitro transformation of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid by human intestinal flora, with particular reference to the natural conversion between the two bile acids. *J Lipid Res* 1981; 22:735-743.

Hoensch HP, Balzer K, Dylewicz P, Kirch W, Goebell, Ohnhaus EE. Effect of rifampicin treatment on hepatic drug metabolism and serum bile acids in patients with primary biliary cirrhosis. *Eur J Clin Pharmacol* 1985; 28:475-477.

Hofmann AF. Efficient extraction of bile acid conjugates with tetraheptylammonium chloride, a liquid ion exchanger. *J Lipid Res* 1967; 8: 55-62.

Hofmann AF, Cummings SA. In: Barbara L, Dowling RH, Hofmann AF, Roda E, eds. *Bile acids in gastroenterology*. Lancaster: MTP Press, 1982; 75-117.

Hofmann AF. The physical chemistry of bile in health and disease. *Hepatology* 1984; (Suppl): 1S-252S.

Hofmann AF, Roda A. Physicochemical properties of bile acids and their relationship to biological properties: an overview of the problem. *J Lipid Res* 1984; 25:1477-1489.

Hofmann AF. Bile acid hepatotoxicity and the rationale of UDCA therapy in chronic cholestatic liver disease: some hypotheses. In: Paumgartner G, Stiehl A, Barbara L, Roda E, (eds). *Strategies for the Treatment of Hepatobiliary Diseases*. Lancaster: Kluwer, 1990; 13-33.

Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in cholestasis. In: Lentze MJ, Reichen J, (eds). Paediatric cholestasis. Boston: Kluwer, 1992; 105-117.

Hofmann AF. Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug. Scand J Gastroenterol 1994; 29 (Suppl. 204):1-15.

Holsti P. Cirrhosis of the liver induced in rabbits by gastric instillation of 3-monohydroxycholanic acid (Abstract). Nature 1960; 186:250.

Hoofnagle JH, Davis GL, Schafer DF. Randomized trial of chlorambucil for primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 1986; 91:1327-1334.

Hubbard AL, Barr VA, Scott LJ. Hepatocyte surface polarity. In: Arias IM, Jacoby WB, Popper H, Schachter D, Schafritz DA, (eds). The liver: Biology and pathobiology, third edition. New York, Raven Press, 1994;189-213.

Hylemon PB. Metabolism of bile acids in intestinal microflora. In: Danielsson H, Sjövall J, (eds). Sterols and bile acids (new comprehensive biochemistry), vol 12. Amsterdam: Elsevier, 1985; 331-343.

Ichida F. Clinical experience with ursodeoxycholic acid (S-Urso) for chronic hepatitis. Diagn Treat 1961; 36:388.

Inoue M, Kinne R, Tran T, Biempica L, Arias IM. Rat liver canalicular membrane vesicles: isolation and topological characterization. J Biol Chem 1983; 258:5183-5188.

Inoue M, Kinne R, Tran T, Arias IM. Taurocholate transport by the rat liver canalicular membrane vesicles: evidence for the presence of Na⁺-independent transport system. *J Clin Invest* 1984; 73:659-663.

Iwato T, Yamasaki K. Enzymatic determination and thin-layer chromatography of bile acids in blood (abstract). *J Biochem* 1969; 56:424.

Jacquemin E, Hagenbuck B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. Expression cloning of rat liver Na⁺-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:133-137.

Javitt NB, Emerman M. Effect of sodium tauroolithocholate on bile flow and bile acid excretion. *J Clin Invest* 1968; 47:1002-1014.

Jones AL, Schmucker DL, Mooney JS, Ockner RK, Adler RD. Alteration in hepatic pericanalicular cytoplasm during enhanced bile secretory activity. *Lab Invest* 1979; 40:512-517.

Jorgensen RA, Dickson ER, Hofmann AF, Rossi SS, Lindor KD. Characterisation of patients with a complete biochemical response to ursodeoxycholic acid. *Gut* 1995; 36: 935-938.

Jungermann K, Katz N. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology* 1982; 2:385-395.

Kanai S, Kitani K. Glycoursodeoxycholate is as effective as tauroursodeoxycholate in preventing the taurocholate-induced cholestasis in the rat (abstract). *Hepatology* 1983; 3:811.

Karpen SJ, Sun AQ, Kudish B, Hadenbuch B, Meier PJ, Ananthanarayanan M, Suchy FJ. Multiple factors regulate the rat liver basolateral sodium-dependant bile acid cotransporter gene promoter. *J Biol Chem* 1996; 271: 15211-15221.

Killenberg PG, Jordan H. Measurement and subcellular distribution of cholyl-CoA synthetase and bile acid-CoA: amino acid N-acetyltransferase activities in rat liver. *J Lipid Res* 1978; 19:24-31.

Kitamura T, Gatmaitan Z, Arias IM. Serial quantitative image analysis and confocal microscopy of hepatic uptake, intracellular distribution and biliary secretion of a fluorescent bile acid analog in rat hepatocyte douplets. 1990; 12:1358-1364.

Klassen CD, Watkins JB. Mechanism of bile formation, hepatic uptake, and biliary secretion. *Pharmacol Rev* 1984; 36:1-67.

Kramer W, Busher HP, Gerok W, Kurz G. Bile salt binding to serum components. Taurocholate incorporation into high density lipoproteins revealed by photoaffinity labeling. *Eur J Biochem* 1979; 102:1-9.

Kramer W, Bickel U, Busher HP, Gerok W, Kurz G. Bile-salt-binding polypeptides in plasma membranes of hepatocytes revealed by photoaffinity labelling. *Eur J Biochem* 1982; 129:13-24.

Kratohvil JP, Hsu WP, Jacobs MA, Aminabhavi TM, Mukunoki Y. Concentration-dependant aggregation patterns of conjugated bile salts in aqueous sodium chloride solutions: a comparison between sodium taurodeoxycholate and sodium taurocholate. *Colloid Polymer Sci* 1983; 261:781-785.

- Kuipers F, Havinga R, Vonk RJ. Cholestasis induced by sulphated glycolithocholic acid in rat: protection by endogenous bile acids. *Clin Sci* 1985; 68:127-134.
- Kullack-Ulbick GA, Beuers U, Meier PJ, Domdey H, Paumgartner G. Assignment of the human organic anion transporting polypeptide (OATP) gene to chromosome 12p12 by fluorescence in situ hybridization. *J Hepatol* 1996; 25: 985-987.
- Lamri Y, Roda A, Dumont M, Feldmann G, Erlinger S. Immunoperoxidase localization of bile salt in rat liver cells. *J Clin Invest* 1988; 82:1173-1182.
- LaRusso NF, Hoffman NE, Hofmann AF, Northfield TC, Thistle JL. Effect of primary bile acid ingestion on bile acid metabolism and biliary lipid secretion in gallstone patients. *Gastroenterology* 1975; 69:1301-1314.
- Lawson AM, Setchell KDR. Mass spectrometry of bile acids. In: Setchell KDR, Kritchevsky D, Nair PP, (eds). *The Bile Acids*, vol. 4, New York, Plenum Press, 1988; 194-226.
- Lee D, Bonorris G, Cohen H, Gilmore C, Marks G, Schenfield LJ. Effect of ursodeoxycholic acid on bile acid kinetics and hepatic lipid secretion (Abstract). *Hepatology* 1981; 1: 36.
- Leuschner U, Leuschner M, Sieratzki J, Kurtz W, Hubner K. Gallstone dissolution with ursodeoxycholic acid in patients with chronic active hepatitis and two years follow-up. A pilot study. *Dig Dis Sci* 1985; 30:642-649.
- Leuschner U, Fischer H, Kurtz W, Guldutuna S, Hubner K, Hellstern A, Gatzert M. Ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis: results of controlled double-blind trial. *Gastroenterology* 1989; 97:1268-1274.

- Lévy S. Mécanisme d'action de l'acide ursodéoxycholique dans les maladies de foie cholestatiques. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 1996; 20(6-7) :549-559.
- Lim WC, Jordan TW. Subcellular distribution of hepatic bile acid conjugation enzymes. *Biochem J* 1981;197:611-618.
- Lindblad L, Lundholm K, Schersten T. Influence of cholic and chenodeoxycholic acid on biliary cholesterol secretion in man. *Eur J Clin Invest* 1977; 7:383-388.
- Linnet K, Kelbaek H. The patterns of glycine and taurine conjugates of bile acids in serum in hepatobiliary disease. *Scan J Gastroenterol* 1982; 17:919-924.
- Loof GL, Hjerten S. Partial purification of a human liver sulphotransferase active towards bile salts. *Biochim Biophys Acta* 1980; 617:192-204.
- Loria P, Bertolotti M, Tripodi A, Dilengite MA, Carulli N. Advances in the comprehension of the pathophysiology of bile secretion. *Dig Dis* 1991; 9: 142-155.
- Mannes GA, Stellard F, Paumgartner G. Diagnosis sensitivity of fasting and postprandial serum bile acids determined by different methods. *Clin Chim Acta* 1987; 162:147-154.
- Marschall HU, Egestad B, Matern H, Matern S, Sjövall J. N-acetylglucosamides. A new type of bile acid conjugate in man. *J Biol Chem* 1989; 264:12989-12993.

Matern H, Matern S. Formation of bile acid glucosides and dolichyl phosphoglucose by microsomal glucosyltransferases in liver, kidney and intestine of man. *Biochim Biophys Acta* 1987; 921:1-6.

Martan R. Physiologie de la membrane cellulaire. Dans: *Physiologie humaine*, deuxième édition. Paris, Hervé Guénard, 1996; 375-411.

Matern S, Gerok W. Pathophysiology of the enterohepatic circulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1979; 85:126-204.

Matern S, Matern H, Farthmann EH, Gerok W. Hepatic and extrahepatic glucuronidation of bile acids in man. *J Clin Invest* 1984; 74:402-410.

Matsuzaki Y, Tanaka N, Osuga T, Aikawa T, Shoda J, Doi M, Nakano M. Improvement of biliary enzyme levels and itching as a result of a long term administration of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis, *Am J Gastroenterol* 1990; 85:15-23.

Maurice M, Durand-Schneider AM, Garbaz M, Feldmann G. Characterization of rat hepatocyte plasma membrane domains by monoclonal antibodies. *Eur J Clin Biol* 1985; 39:122-129.

Mayer R, Kartenbeck J, Buchler M, Jedlitschky G, Leier I, Keppler D. Expression of MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocyte. *J Cell Biol* 1995; 131: 137-150.

Mazzella G, Rizzo N, Salzetta A, Iampieri R, Bovicelli L, Roda E. Management of intrahepatic cholestasis in pregnancy. *Lancet* 1991; 2:1594-1595.

Mazella G, Parini P, Bazzoli F. Ursodeoxycholic acid administration on bile acids metabolism in patients with early stages of primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1993; 38:896-902.

Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuck B, Stieger B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 1997; 26:1667-1677.

Meier PJ. Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am J Physiol* 1995; 269(6 Pt 1): G801-G812.

Mehta SJ, Struthers JE, Kaye MD, Naylor JL. Biliary deoxycholate in patients with alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1974; 67:674-679.

Meier PJ, St. Meier-Abt A, Barrett C, Boyer JL. Mechanisms of taurocholate transport in canalicular and basolateral rat liver plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* 1984; 259:10614-10622.

Meier PJ, Knickelbeim R, Moseley RH, Dobbins JW, Boyer JL. Evidence for carrier-mediated chloride/bicarbonate exchange in canalicular rat plasma membrane vesicles. *J Clin Invest* 1985; 75:1256-1263.

Mekhjian HS, Phillips SF, Hofmann AF. Colonic absorption of unconjugated bile acids: perfusion studies in man. *Dig Dis Sci* 1979; 24:545-550.

Miayi K. Structural organization of the liver. In: *Hepatotoxicology*. Robert GM, Steadman DH, Richard JB, (eds), Boca Raton, CRC Press, 1991; 1-66.

Mijayi KA, Akiyama T, Ito M, Urakawa T, Shimaji Y. The effect of ursodeoxycholic acid on liver functions in patients with chronic liver disease. A

double blind study in one institution and the study of the effect on hepatic blood flow. *Rinsho to Kenkyu* 1976; 53:1395-1403.

Mitchison HC, Bassendine MF, Record CO, Bateson MC. Controlled trial of prednisolone for primary biliary cirrhosis: good for the liver, bad for the bones (Abstract). *Hepatology* 1986; 6:1211.

Mion F et Minaire Y. La digestion. Dans: *Physiologie humaine*, deuxième édition. Paris, Hervé Guénard, 1996; 375-411.

Miyazaki HM, Ishibashi M, Inoue M, Itoch M, Kubodera T. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of bile acids by mass chromatography. *J Chromatography* 1974; 99:553-565.

Montagni M, Aldini R, Roda A, Polimeni C, Sipahi AM, Roda E. Jejunal and ileal bile acid transport (abstract). *Gastroenterology* 1993; 104:A265.

Moore EW. Biliary calcium and gallstone formation. *Hepatology* 1990;12(suppl): 206S-218S.

Muller M, Ishikawa T, Berger U, Klunemann C, Lucka L, Schreyer A, Kannicht C, Reutter W, Kurz G, Keppler O. ATP-dependent transport across the hepatocyte canalicular membrane mediated by a 100-kDa glycoprotein binding ATP and bile salt. *J Biol Chem* 1991; 266:18920-18926.

Murphy GM, Ross A, Billing BH. Serum bile acids in primary biliary cirrhosis. *Gut* 1972; 13:201-206.

Murphy GM. Serum bile acids. In: Setchell D, Kritchevsky D, Nair PP (eds), *The Bile Acids*, vol.4, New York, Plenum Press, 1988; 379-403.

Myant NB, Mitropoulos KA. Cholesterol 7 α -hydroxylase. *J Lipid Res* 1977; 18:135-153.

Nathanson MH, Boyer JL. Mechanism of regulation of bile acid secretion. *Hepatology* 1991; 14:551-566.

Neale G, Lewis B, Weaver V, Panveliwalla D. Serum bile acids in liver disease. *Gut* 1971; 12:145-152.

Neuberger J, Christensen E, Portmann B, Caballeria J, Rodes J, Ranek L, Tygastrup N, Williams R. Double-blind controlled trial of D-penicillamine in patients with primary biliary cirrhosis. *Gut* 1985; 26:114-119.

Nilsell K, Angelin B, Leijid B, Einarsson K. Comparative effect of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on bile acid kinetics and biliary lipid secretion. *Gastroenterology* 1983; 85: 1248-1256.

Nishida T, Gatmaitan Z, Che M, Arias IM. Canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent transport system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:6590-6599.

Northfield TC, Hofmann AF. Biliary lipid output during three meals and an overnight fast. I. Relationship to bile acid pool size and cholesterol saturation of bile in gallstone. *Gut* 1975; 16:1-11.

Oelberg DG, Chari MV, Little JM, Adcock EW, Lester R. Lithocholate glucuronide is a cholestatic agent. *J Clin Sci* 1984; 73:1507-1514.

Ostrow JD. Metabolism of bile salts in cholestasis in humans. In : Tavoloni N, and Berk PO, (eds). *Hepatic transport and bile secretion : Physiology and Pathophysiology*. New York, Raven Press, 1993; 673-707.

Palma J, Reyes H, Ribalta J, Iglesias J, Gonzalez MC, Hernandez I, Alvarez C, Molina C, Danitz AM. Effects of ursodeoxycholic acid in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Hepatology* 1992; 15:1043-1047.

Palmer RH. The formation of bile acid sulfates : a new pathway of bile acid metabolism in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; 58:1047-1050.

Palmer RH. Bile acids, liver injury, and liver disease. *Arch Intern Med* 1972; 130:606-617.

Parke DV. The endoplasmic reticulum: its role in physiological functions and pathological situations. In: Yenner P, Testa B, (eds). *Concept in drug metabolism*. New York, Dekker, 1981; 1-52.

Parquet M, Metman EH, Raizman A, Rambaud JC, Berthaux N, Infante R. Bioavailability, gastrointestinal transit, solubilisation and fecal excretion of ursodeoxycholic acid in man. *Eur J Clin Invest* 1985; 15:171-178.

Pennington CR, Ross PE, Bouchier IA. Serum bile acids in the diagnosis of hepatobiliary disease. *Gut* 1977; 18:903-908.

Perdigoto R, Wiesner RH. Progression of primary biliary cirrhosis with ursodeoxycholic acid therapy. *Gastroenterology* 1992; 102:1389-1391.

Phillips MJ, Poucell S, Oda M. Cholestasis : Surgical pathology, mechanisms, and new concepts. *Lab Invest* 1986; 54:593-608.

Plevris JN, Hayes PC, Bouchier IAD. Ursodeoxycholic acid in the treatment of alcoholic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1991; 3:653-656.

Poupon R, Poupon RE, Calmus Y, Chrétien Y, Ballet F, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet* 1987; 1:834-836.

Poupon RE, Balkau B, Eschwege E, Poupon R. A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. *N Eng J Med* 1991; 324 : 1548-1554.

Pries JM, Sherman CA, Williams GC, Hanson RF. Hepatic extraction of bile salts in conscious dog. *Am J Physiol* 1979; 236:E191-E197.

Queneau PE, Montet JC. Hepatoprotection by hydrophilic bile salts. *J Hepatol* 1994; 21:260-268.

Raedsch R, Lauterburg BH, Hofmann AF. Altered bile acid metabolism in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1981; 26:394-401.

Raedsch R, Stiehl A, Theilman L. Influence of ursodeoxycholic acid on primary biliary cirrhosis depending on the stage of the disease. *Gastroenterology* 1989; 96:A647.

Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role of hepatic physiology and pathology. *Anat Rec* 1954; 119:11-34.

Rappaport AM. Physioanatomical basis of toxic liver injury. In: Farber E, Fisher MM, (eds). *Toxic injury of the liver*. New York, Marcel Dekker, 1979; 1-57.

Rea TJ, DeMattos RB, Pape ME. Hepatic expression of genes regulating lipid metabolism in rabbits. *J Lipid Res* 1993; 34:1901-1910.

Reichen J, Paumgartner G. Kinetics of taurocholate uptake by the perfused rat liver. *Gastroenterology* 1975; 68:132-136.

Reichen J, Egger B, Ohara N, Zettner TB, Zysset T, Ziemmermann A. Determinants of hepatic function in liver cirrhosis in rat: multivariate analysis. *J Clin Invest* 1988; 82:2069-2076.

Rej R. Aspartate aminotransferase activity and isoenzyme proportions in human liver tissues. *Clin Chem* 1978; 24:1971-1979.

Renner EL, Lake JR, Scharschmidt BF, Zimmerli B, Meier PJ. Rat hepatocytes exhibit basolateral $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport. *J Clin Invest* 1989;83:1225-1235.

Roda A. Bile acids in gastroenterology. Lancaster, MTP Press, 1983; 57-68.

Roda A, Hofmann AF, Mysels KJ. The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions. *J Biol Chem* 1983; 258: 6362-6370.

Roda A, Roda E, Festi D, Colombo C. Immunoassay for bile acids. In: Setchell KDR, Kritchevsky D, Nair PP, (eds). In: *The Bile Acids*, vol.4. New York, Plenum Press, 1988; 269-293.

Roda A, Grigolo B, Pellicciari R, Natalini B. Structure-activity relationship studies on natural and synthetic bile acid analogs. *Dig Dis Sci* 1989; 34:24S-35S.

Roda A, Gicchini AM, Cerre C, Baraldini M. High-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of bile acids in biological fluids. *J Chromatography B Biomed Sci Appl* 1995; 665: 281-294.

Roda A, Piazza F, Baraldini M. Separation techniques for bile salts analysis. *J Chromatography B Biomed Sci Appl* 1998; 717:263-278.

Roda E, Roda A, Sama C. Effect of ursodeoxycholic acid on biliary lipid composition and bile acid kinetics in cholesterol gallstone patients. *Dig Dis Sci* 1979; 24: 123-128.

Roda E, Mazella G, Bazzoli F, Villanova N, Minutello A, Simoni P, Ronchi M, Poggi C, Festi D, Aldini R.. Effect of ursodeoxycholic acid administration on biliary lipid secretion in primary biliary cirrhosis. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 52S-58S.

Rodriguez E, Nelson WJ. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 1989; 245: 718-725.

Rodriguez E, Setchell KDR. Performance characteristics of reversed-phase bonded silica cartridges for serum bile acid extraction. *Biomed Chromatography* 1996; 10:1-5.

Rohr HP, Luthy J, Gudat F, Oberholtzer M, Gysin C, Stadler G, Bianchi L. Stereology: A new development to the study of human liver biopsy specimens. In Popper H and Schaffner F, (eds): *Progress of liver diseases*, Vol 5. New York, Grune and Stratton, 1976; 24-34.

Rubin RA, Kowalski TE, Malet PF. Ursodiol for hepatobiliary disorders. *Ann Intern Med* 1994; 121:207-218.

Rudman D, Kendall FE. Bile acid content of human serum. Serum bile acids in patients with hepatic diseases. *J Clin Invest* 1957; 36:530-537.

Ruetz S, Fricker G, Hugentobler G, Winterhalter K, Kurz G, Meier PJ. Isolation and characterization of the putative canalicular bile salt transport system of rat liver. *J Biol Chem* 1987; 262:11324-11330.

Ruetz S, Hugentobler G, Meier PJ. Functional reconstitution of the canalicular bile salt transport system of the rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:6147-6151.

Ryhage R, Stenhagen E. Mass spectrometry in lipid research. *J Lipid Res* 1960; 361-390.

Scalia S. Bile acid separation. *J Chromatography* 1995; 671:299-317.

Scharschmidt BF, Stephens JE. Transport of sodium, chloride and taurocholate by cultured rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:986-990.

Schlenkter T, Romac JM, Sharara AI, Roman RM, Kim SJ, LaRusso N, Liddle RA. Regulation of biliary secretion through apical purinergic receptors in cultured rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 1997; 273 (5 Pt 1) : G1108-G1117.

Schmucker DL, Kitani K, Ohta M, Sato Y. Hepatic injury induced by bile salts and its prevention by tauroursodeoxycholate: correlation between biochemical and morphological events (abstract). *Hepatology* 1988; 8:1357.

Schmucker DL, Ohta M, Kanai S, Sato Y, Kitani K. Hepatic injury induced by bile salts: correlation between biochemical and morphological events. *Hepatology* 1990; 12:1216-1221.

Schölmerich J, Becher MS, Schmidt K, Schubert R, Feldhaus S, Kremer B, Gerok W. Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties. Studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. *Hepatology* 1984; 4:661-666.

Schölmerich J, Roda AM, DeLuca M. Bioluminescence assay using immobilized enzymes in bile acid analysis. In: Setchell KDR, Kritchevsky D, Nair PP, (eds).

The bile acids: chemistry, physiology and metabolism. Vol. 4. New York, Plenum Presee, 1988; 269-314.

Schwarz LR, Barth CA. Taurocholate uptake by adult rat hepatocytes in primary culture. *Hoppe-Seyler's Physiol Chem* 1979; 360:1117-1120.

Setchell KDR, Worthington JA. A rapid method for the quantitative extraction of bile acids and their conjugates from serum using commercially available reverse phase octadecylsilane bonded silica cartridges. *Clin Chim Acta* 1982; 125: 135-139.

Setchell KDR, Matsui A. Serum bile acid analysis. *Clin Chim Acta* 1983; 127:1-17.

Shackelton CH, Whitney JO. Use of Sep-pak cartridges for urinary steroid extraction: evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis. *Clin Chim Acta* 1980; 107:107-231.

Sheffer S, Hauser S, Bekersky I, Mosbach EH. Biochemical site of regulation of bile acid biosynthesis in the rat. *J Lipid Res* 1970; 11:404-411.

Sippel CJ, Suchy FJ, Ananthanaryanan M, Perlmutter DH. The rat liver ecto-ATPase is also a canalicular bile acid transport protein. *J Biol Chem* 1993; 268:2083-2091.

Sjövall J. Bile acids in man under normal and pathological conditions. *Clin Chim Acta* 1960; 5:33-41.

Sjövall J, Eneroth P, Rhyage R. Mass spectra of bile acids. In: Nair PP, Kritchevsky D, (eds). *The bile acids: Chemistry, Physiology and Metabolism*, Vol. 1. New York, Plenum Press, 1971; 209-248.

Sjövall J. Analytical methods and studies of bile acid metabolism. In: Bianki L, Gerok W, Sickinger K, (eds). Liver and bile. Lancaster, MTP Press, 1977; 67-88.

Sjövall J, Lawson AM, Setchell KDR. Mass spectrometry of bile acids. *Methods Enzymol* 1985; 111:63-113.

Sjövall J, Setchell KDR. Techniques for extraction and group separation of bile acids. In: Setchell KDR, Kritchevsky D, Nair PP, (eds). *The Bile Acids*. Vol 4., Plenum Press, New York, 1988; 1-42.

Small DM. The physical chemistry of cholanic acids. In: Nair PP, Kritchevsky D, (eds). *The Bile Acids: Chemistry, Physiology and Metabolism*, Vol 1. New York, Plenum press, 1971; 249-356.

Smith JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar E, Van Deemter L, Ottenhoff R, Vander Lugt MM, Van Roon MA. Homozygous disruption of the murine *mdr2*-glycoprotein gene leads to complete absence of phospholipid from bile and liver disease. *Cell* 1993; 75:451-462.

Soloway RD, Taylor TD, Growther RS, Okido M, Hirakawa N, Wu JG. Dihydroxy bile acid intermolecular H-bonding inversely correlated with therapeutic efficacy in liver disease. *Gastroenterology* 1995; 108: (suppl) 1175A.

Sperber I. Secretion of organic anions in the formation of urine and bile. *Pharmacol Rev* 1959;11:109-119.

Stellaard F, Bolt MG, Boyer JL, Klein PD. Phenobarbital treatment in primary biliary cirrhosis. *J Lab Clin Med* 1979; 94:853-861.

Stiehl A, Ast E, Czygan P, Frohling W, Kommerell B. Formation, metabolism and excretion of bile salt sulfates in man. In: Taylor W, (ed). The hepatobiliary system. New York, Plenum Press, 1976; 453-476.

Stiehl A. Disturbances of bile acid metabolism in cholestasis. Clin Gastroenterol 1977; 6:45-67.

Stiehl A, Ast E, Czygan P, Fröhling W, Raedsch R, Kommerell B. Pool size synthesis, and turnover of sulfated and non sulfated cholic acid and chenodeoxycholic acid in patients with cirrhosis of liver. Gastroenterology 1978; 74:572-577.

Stiehl A, Raedsch R, Rudolph G. Ileal excretion of bile acids: comparison with biliary bile composition and effect of ursodeoxycholic acid treatment. Gastroenterology 1988; 94:1201-1206.

Stiehl A, Rudolph G, Raedsh R, Möller B, Hopff U, Lotterer E, Bircher J, Folsch U, Klaus U, Ende R. Ursodeoxycholic acid-induced changes of plasma and urinary bile acids in patients with primary biliary cirrhosis. Hepatology 1990; 12:492-497.

Stiehl L, Rudolph G Raedsch R, Stiehl A. Effects of ursodeoxycholic acid in patients with primaty sclerosing cholangitis. In: Paumgartner G, Stiehl A, Gerok W, (eds). Bile acids as therapeutic agents. Dordrecht, Kluwer Academic, 1991; 305-307.

Strasberg SM, Hofmann AF. Biliary cholesterol transport and precipitation. Hepatology 1990; 12(Suppl):1S-244S.

Street JM, Setchell KR. Chromatographic methods for bile acid analysis. *Biomed Chromatography* 1988; 2:229-241.

Suchy FJ, Balistreri WF, Hung J, Miller P, Garfield SA. Intracellular bile acid transport in rat liver as visualized by electron microscope autoradiography using a bile acid analogue. *Am J Physiol* 1983; 245(5 Pt 1): G681-G689.

Suchy FJ, Courchene SM, Balistreri WF. Ontogeny of hepatic bile and conjugation in the rat. *Pediatr Res* 1985; 19:97-101.

Suchy FJ, Sippel CJ, Ananthanarayanan M. Bile acid transport across the hepatocyte canalicular membrane. *FASEB J* 1997; 11:199-205.

Sugiyama Y, Yamada T, Kaplowitz N. Newly identified bile acid binder in rat liver cytosol. Purification and comparison with glutathione-s-transferase from rat liver cytosol. *J Biol Chem* 1983; 258: 3602-3607

Summerfield JA, Cullen J, Barnes S, Billing BH. Evidence for renal control of urinary excretion of bile acids and bile acid sulfates in the cholestatic syndrome. *Clin Sci Mol Med* 1977; 52:51-65.

Svanik J, Friman S, Persson H. Does adjuvant ursodeoxycholic acid prevent acute rejection in liver transplant recipients? In: Paumgartner G, Stiehl A, Gerok W, (eds). *Bile acids as therapeutic agents*. Dordrecht, Kluwer Academic, 1991; 357-360.

Takikawa H, Beppu T, Seyama Y, Wada, T. Quantitative determination of non-sulfated bile acids in the serum of patients with hepatobiliary diseases by mass fragmentography. *Gastroenterol Jpn* 1983; 18:246-251.

Takikawa H, Beppu T, Seyama Y. Profiles of bile acids and their glucuronide and sulfate conjugates in the serum, urine and bile from patients undergoing bile drainage. *Gut* 1985; 26:38-42.

Takikawa H, Kawahara T, Kumashiro R. Effects of bile acids on the cultured hepatocytes and Kupffer cells (abstract). *Hepatology* 1986; 6:779.

Thomsen OO, Larsen JA. The effect of glucagon, dibutyrylic cyclic AMP and insuline on bile production in the intact rat and the perfused rat liver. *Acta Physiologica Scandinavica* 1981; 111:23-30.

Thomsen OO. Simulatory effect of bile acids on insulin-induced choleresis in the rat. *Am J Physiol* 1983; 244:G301-G307.

Thornton JR, Losowsky MS. Plasma methionine enkephalin concentration and prognosis in primary biliary cirrhosis. *Brit Med J* 1988; 297: 1241-1242.

Thurman RG, Kauffman FC, Baron J. Biotransformation and zonal toxicity. In: *Metabolism. Intra- and intercellular compartmentation*. New York, Plenum Press, 1986; 321-382.

Traber PG, Chianale J, Gumuccio JJ. Physiologic significance and regulation of hepatocyte heterogeneity. *Gastroenterology* 1989; 15:1130-1143.

Vadekalam J, Gores GJ. Ursodeoxycholate cytoprotection against hepatocyte killing by hydrophobic bile salts cannot be explained solely by changes in the hydrophobicity index (abstract). *Hepatology* 1992; 16:134A.

Van Berge Henegouwen GP, Brandt KH, Eyssen H, Parmentier G. Sulfated and unsulfated bile acids in serum and urine of patients with cholestasis. *Gut* 1976; 17:861-869.

Van Dyke RW, Stephens JE, Scharschmidt BF. Effect of ion substitution on bile acid-dependant and -independent bile formation by rat liver. *Am J Physiol* 1982; 70:505-517.

Van Dyke RW, Stephens JE, Scharschmidt BF. Bile acid transport in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1982; 243:G484-G492.

Vanden-Heuvel WJA, Sweeley CC, Mornign EC. Microanalytical separation by gas-chromatography in ses hormone and bile acid series. *Biochim Biophys Res Commun* 1960; 3:33-39.

Vlahcevic ZR, Heuman DM, Hylemon PB. Physiology and pathophysiology of enterohepatic circulation of bile acids. In: Zakim D, Boyer TD, (eds). *Hepatology, a textbook of liver disease*, vol. 1, third edition. Philadelphia, Saunders Company. 1996; 377-404.

Vogel W, Kathrein H, Judmaier G, Braunsteiner H. Deterioration of primary biliary cirrhosis during treatment with ursodeoxycholic acid. *Lancet* 1988; 1:1163-1164.

Von Dippe P, Ananthanarayanan M, Drain P, Levy D. Purification and reconstitution of the bile acid transport system from hepatocyte sinusoidal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1986; 862:352-360.

Wagner CI, Trotman BW, Soloway RD. Kinetic analysis of biliary lipid excretion in man and dog. *J Clin Invest* 1976; 57:473-477.

Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 1971; 132:429-462.

Ward A, Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. Ursodeoxycholic acid: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* 1984; 27:95-131.

Weibel ER, Staubli W, Gnagi HR, Hess FA. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol* 1969; 42:63-91.

Weinman SA, Graf J, Veith C, Boyer JL. Voltage-drive, taurocholate-dependent secretion in isolated rat hepatocytes couplets. *Am J Physiol* 1989; 256:G826-G832.

Wheeler HO, Ramos OL. Determinants of the flow and composition of bile in the unanesthetized dog during constant infusions of sodium taurocholate. *J Clin Invest* 1960; 39:161-170.

Wieland T, Nassal M, Kramer W, Fricker G, Bickel U, Kurz G. Identity of hepatic membrane transport systems for bile salts, phalloidin, and antamanide by photoaffinity labelling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:5232-5236.

Williams CN, Macdonald JA, Park-Dinesov H. Primary bile acid kinetics in patients with primary biliary cirrhosis and in normal subjects. *Clin Invest Med* 1979; 2:29-40.

Wisse E, Greetz A, Bouwens L, Van Boussuyt H, Vanderkerden K, Van Goethem F. Cell biological functions of sinusoidal cells. In: McIntyre N, Benhamou J-P, Bircher J, Rizzetto M, Rodes J, (eds). *Oxford textbook of clinical hepatology*, Vol. I. Oxford, Oxford University Press, 1991; 235-244.

Wong MH, Oelkers P, Craddock AL, Dawsen PA. Expression cloning and characterization of the hamster ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem* 1994; 269:1340-1347.

Yanagisawa J, Itoh M, Ishibashi M, Miyazaki H, Nakayama F. Microanalysis of bile acid in human liver tissue by selected ion monitoring. *Anal Biochem* 1980; 107:75-86.

Yoon YB, Hagey LR, Hofmann AF, Gurantz D, Michelotti EL, Steinbach JH. Effect of side-chain shortening on the physiological properties of bile acids: hepatic transport and effect on biliary secretion of 23-nor-ursodeoxycholate in rodents. *Gastroenterology* 1986; 90:837-852.

Yousef IM, Mignault D, Weber AM, Tuchweber B. Influence of dehydrocholic acid on the secretion of bile acids and biliary lipids in rats. *Digestion* 1990; 45:40-51.

Ziegler K, Frimmer M, Mullner S, Fasold H. Bile acid binding proteins in hepatocellular membranes of newborn and adult rats. Identifications of transport proteins with azidobenzamidotauro[¹⁴C]cholate ([¹⁴C]ABATC). *Biochim Biophys Acta* 1989; 980:161-168.