

2M11.2746.7

Université de Montréal

Effets comparatifs de la sulfatation et des acides biliaires hautement hydrophiles dans
la prévention de la cholestase intrahépatique induite par l'acide lithocholique.

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en pharmacologie

Par

Christian Gay Jr

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Mars 1999

© Christian Gay Jr. 1999



3M 11-27-84 4

W
4
U58
1999
V.130

Université de Montréal

Effets comparatifs de la sulfation et des acides biliaires dans le traitement hydrophile dans la prévention de la cholestase expérimentale par l'acide lithocholique

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître en sciences (M.Sc.)

en pharmacologie

Par

Christian Goy

Établissement de pharmacologie

Faculté de médecine



Monsieur Goy

Christian Goy B. Pharm.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce Mémoire intitulé :

Effets comparatifs de la sulfatation et des acides biliaires hautement hydrophiles dans
la prévention de la cholestase intrahépatique induite par l'acide lithocholique.

Présenté par Christian Gay Jr.

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Ibrahim Yousef

Dr. Mamoud Sharkawi

Dr. Pierre Haddad

Mémoire accepté le : 99-10-12

SOMMAIRE

Il a été démontré que l'infusion d'une dose de 12 μ moles/100g de poids corporel d'acide lithocholique induisait une cholestase chez le rat. Par contre, l'acide cholique sulfaté ainsi que certains acides biliars hautement hydrophiles tels que les acides ursodéoxycholique, cholique et hyodéoxycholique démontraient un effet cholérétique lorsqu'ils sont infusés à la même dose. Compte tenu du caractère anticholestatique de la sulfatation de l'acide cholique et de ces acides biliars hydrophiles, cela nous a amené à étudier leur éventuel rôle dans la prévention de la cholestase intrahépatique induite par l'acide lithocholique (ALC). Pour mettre en évidence ces hypothèses, certains groupes de rats ont été traités séparément avec chacun des acides biliars mentionnés et d'autres groupes ont reçu dans le même ordre une co-infusion de ces acides biliars et de l'acide lithocholique dans une même proportion. De plus, un groupe recevait uniquement de l'albumine et servait de contrôle. Les résultats obtenus démontraient une cholestase maximale allant jusqu'à 50% de réduction du flux biliaire 30-60 minutes après l'infusion de l'ALC. Cependant, une cholérèse avait été observée pendant ces mêmes périodes après l'infusion de l'acide cholique sulfaté. Ainsi, les résultats obtenus après l'infusion des acides ursodéoxycholique, cholique et hyodéoxycholique ne démontraient aucune cholestase comme l'acide cholique sulfaté au cours de ces mêmes périodes. De plus, la cholestase avait été prévenue lors des co-infusions respectives des acides ursodéoxycholique, cholique et hyodéoxycholique avec l'acide lithocholique. Par contre, une cholestase a été observée 30-60 minutes après la co-infusion de l'acide cholique sulfaté avec l'acide lithocholique. Ces résultats démontrent que l'hydrophilicité des acides biliars peut contribuer à augmenter leur

potentiel cholérétique; tandis que la sulfatation, en tant que mécanisme de détoxification, n'a pas toujours un effet protecteur pouvant prévenir la cholestase.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iii
TABLEAU.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xii
INTRODUCTION.....	1
1. RAPPEL ANATOMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DU FOIE.....	2
2. LA BILE.....	8
2.1 Composition de la bile.....	8
2.1.1 Acides biliaries.....	8
2.1.1.1 Généralités des acides biliaries.....	8
2.1.1.2 Biosynthèse des acides biliaries.....	11
2.1.2 Lipides biliaries.....	13
2.1.3 Effet des acides biliaries sur l'excrétion les lipides biliaries.....	14
2.2 Formation de la bile.....	15
2.2.1 Débit biliaire dépendant des acides biliaries.....	16
2.1.1.1 Capture des acides biliaries.....	18

2.2.1.2	Transport intracellulaire des acides biliaires.....	22
2.2.1.3	Sécrétion canaliculaire des acides biliaires.....	24
2.2.2	Flux biliaire indépendant des acides biliaires.....	26
2.3	Conjugaison.....	27
2.3.1	Amidation.....	27
2.3.2	Sulfatation.....	28
2.3.3	Glucuronidation.....	31
2.4	Biotransformation des acides biliaires monohydroxylés.....	32
3.	CHOLESTASE.....	33
3.1	Cholestase intrahépatique.....	34
3.2	Cholestase induite par les acides biliaires.....	36
3.3	Cholestase induite par haute concentration d'acide biliaire.....	37
3.4	Cholestase induite par ALC.....	38
4.	CHOLÉRÈSE.....	42
4.1	Effet de l'acide ursodéoxycholique sur la cholestase.....	42
4.2	Effet de l'acide cholique sur la cholestase.....	48
4.3	Effet de l'acide cholique sulfaté sur la cholestase.....	49
4.4	Effet de l'acide hyodéoxycholique sur la cholestase.....	50
5.	Objectif.....	52

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	53
1. Préparation d'acide biliaire sulfaté.....	53
2. Model et procédure chirurgicale	54
3. Mesure du flux biliaire.....	55
4. Dosages des lipides biliaires.....	55
4.1 Dosages de phospholipides.....	55
4.2 Dosage de cholestérol.....	56
5. Dosage des sels biliaires par GC/MS.....	57
5.1 Hydrolyse des acides biliaires.....	57
5.2 Formation de méthyl ester.....	58
5.3 Formation d'acétate méthyl ester.....	58
6. Préparation de standards de sels biliaires.....	59
7. Statistiques.....	59
RÉSULTATS.....	60
1. Effet des sels biliaires sur le flux biliaire.....	60
2. Effet des acides biliaires sur la sécrétion des phospholipides.....	60
3. Effet des acides biliaires sur la sécrétion du cholestérol.....	61
4. Effet de l'albumine sur la sécrétion des acides biliaires	68

5. Effet de l'acide cholique (AC) sur la sécrétion des acides biliaries.....	68
6. Effet d'ALC sur la sécrétion des acides biliaries	71
7. Effet de l'AUDC sur la sécrétion des acides biliaries	71
8. Effet de AHCD sur la sécrétion des acide biliaries.....	74
9. Effet de AC-S12 μ sur la sécrétion des acides biliaries.....	74
10. Effet de AC-S24 μ sur la sécrétion des acides biliaries.....	75
11. Effet de AC + ALC sur la sécrétion des acides biliarie.....	79
12. Effet de AUDC + ALC sur la sécrétion des acides biliaries.....	79
13. Effet de AHDC + ALC sur la sécrétion des acides biliaries.....	80
14. Effet de AC-S12 μ + ALC sur sécrétion des acides biliaries.....	84
15. Effet de AC-S24 μ + ALC sur la sécrétion des acides biliaries.....	84
DISCUSSION.....	87
CONCLUSION.....	97
BIBLIOGRAPHIE.....	99

TABLEAU.....	9
---------------------	----------

LISTE DES FIGURES

Fig1. Microcirculation et zonation de l'acinus hépatique.....	4
Fig2. Achitecture sinusoïdale du foie.....	7
Fig3. Formation de la bile dépendante et indépendante des sels biliaires.....	17
Fig4. Transporteurs membranaires impliqués dans la formation biliaire.....	21
Fig5. Effet de l'infusion de: Albumine, AC, AC-S12μ, AC-S24μ, AUDC et AHDC sur le flux biliaire.....	62
Fig6. Effet de l'infusion de: ALC, AC + ALC, AUDC + ALC, AHDC + ALC, AC-S12μ + ALC et ACS24μ + ALC sur le flux biliaire.....	63
Fig7. Effet de l'infusion de: Albumine, AC, AC-S12μ, AC-S24μ, AUDC et AHDC sur la sécrétion de Phospholipides.....	64
Fig8. Effet de l'infusion de: ALC, AC + ALC, AUDC + ALC, AHDC + ALC, AC-S12μ + ALC et AC-S24μ + ALC sur la sécrétion de phospholipides.....	65
Fig9. Effet de l'infusion de: Albumine, AC, AUDC, AHDC, AC-S12μ et AC-S24μ sur la sécrétion de cholestérol.....	66
Fig10. Effet de l'infusion de: ALC, AC + ALC, AUDC + ALC, AC-S12μ + ALC et AC-S24μ + ALC sur la sécrétion de cholestérol.....	67
Fig11. Effet de l'infusion de l'albumine sur la sécrétion des acides biliaires.....	69
Fig12. Effet de l'infusion d'AC sur la sécrétion des acides biliaires.....	70
Fig13. Effet de l'infusion d'ALC sur la sécrétion des acides biliaires.....	72
Fig14. Effet de l'infusion d'AUDC sur la sécrétion des acides biliaires.....	73

Fig15. Effet d'AHDC sur la sécrétion des acides biliaires.....	76
Fig16. Effet d'AC-S12μ sur la sécrétion des acides biliaires.....	77
Fig17. Effet d'AC-S24μ sur la sécrétion des acides biliaires.....	78
Fig18. Effet d'AC + ALC sur la sécrétion des acides biliaires.....	81
Fig19. Effet d'AUDC + ALC sur la sécrétion des acides biliaires.....	82
Fig20. Effet d'AHDC + ALC sur la sécrétion des acides biliaires.....	83
Fig21. Effet d'AC-S12μ + ALC sur la sécrétion des acides biliaires.....	85
Fig22. Effet d'AC-S24μ + ALC sur la sécrétion des acides biliaires.....	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	acide cholique
AC-S 12μ	acide cholique sulfaté 12 μmoles
AC-S 24μ	acide cholique sulfaté 24 μmoles
ALC	acide lithocholique
AUDC	acide ursodéoxycholique
AHDC	acide hyodéoxycholique
ACDC	acide chénodéoxycholique
ADOC	acide déoxycholique
ATP	adénosine triphosphate
GC	chromatographie en phase gazeuse
MS	spectrométrie de masse
MP	membrane plasmatique
MCB	membrane canaliculaire biliaire

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier d'abord mon directeur de recherche Dr. Ibrahim Yousef pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis de mener à terme ce projet. Je le remercie aussi pour sa disponibilité, ses précieux conseils tant au niveau académique que sur le plan humain, sans oublier son support financier qui m'a aidé à défrayer certains coûts. Je remercie également madame Tuchweber de m'avoir permis d'apprendre les techniques de chirurgie au département de nutrition et surtout pour ses encouragements tout au long de mon apprentissage.

Avant de passer au personnel du laboratoire de pharmacologie, j'aimerais remercier M. Maurice Audet pour sa patience, son entregent et l'habilité avec laquelle qu'il m'a transmis la bonne technique chirurgicale. Le laboratoire a été pour moi une seconde demeure et mes collègues une seconde famille. J'y passe plus de temps qu'à la maison et je remercie tous mes collègues, Diane pour l'assistance technique et sa gentillesse, Josué pour ses précieux conseils, Guylaine et Fathia pour leur encouragement, Joëlle, Myriam et Shaparak pour l'ambiance musicale.

Un remerciement à tous mes amis qui m'ont encouragé, un merci spécial à Camille Granvil. Je m'en voudrais si je terminais sans remercier ma famille surtout mes parents qui m'ont soutenu et m'ont encouragé sur une base quotidienne durant toutes mes études.

INTRODUCTION

Les maladies du foie affectent tous les groupes d'âge et peuvent se développer dès l'enfance. La Cholestase, étant définie comme une réduction de la capacité du foie à excréter la bile, est l'une des maladies hépatiques les plus courantes chez l'enfant. Elle peut être due à plusieurs facteurs tels que les médicaments, certaines hormones et les acides biliaires. Plusieurs espèces animales, incluant l'homme, synthétisent des esters d'acides biliaires sulfatés en réponse à une cholestase. Cependant, la fonction des acides biliaires sulfatés durant la cholestase n'est pas bien connue. En effet, de nombreuses études ont démontré que l'infusion de hautes concentrations d'acides biliaires induisaient une cholestase chez les animaux, alors que l'infusion de leurs analogues sulfatés n'étaient pas cholestatiques. Ce qui suggérerait que la sulfatation des acides biliaires pourrait avoir à la fois un effet physiologique sur la formation de la bile et cytoprotecteur contre les propriétés détersives de hautes concentrations intracellulaires d'acides biliaires.

1. RAPPEL ANATOMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DU FOIE

Le foie est un organe volumineux possédant la capacité de se régénérer. C'est une glande à la fois endocrine et exocrine. Sa position stratégique, au confluent des courants sanguins en provenance de l'intestin et du reste de l'organisme, lui confère un rôle important dans l'ensemble du métabolisme intermédiaire. Le foie est très vascularisé, il reçoit 25% du débit cardiaque en provenance de deux apports sanguins différents. La veine porte achemine au foie un sang pauvre en oxygène en provenance du système digestif qui est riche en nutriments et en hormones telles que glucagon, insuline ainsi que les facteurs gastrointestinaux; alors que l'artère hépatique y achemine un sang riche en oxygène (Jungerman, 1987). De plus, la veine porte assure 80% de l'irrigation du foie tandis que l'artère hépatique n'en fournit que 20% (Rappaport, 1980).

Parallèlement au système sanguin, le foie est aussi doté d'un système biliaire constitué du canal cholédoque, de la vésicule biliaire, des canaux cystiques et hépatiques ainsi que les canalicules biliaires. La bile, en provenance du foie, est emmagasinée et concentrée dans la vésicule biliaire. Suite à un stimulus post-prandial, la vésicule peut se contracter pour expulser la bile dans le canal cystique pour être acheminée jusqu'au duodénum via le canal cholédoque. Chez le rat, la vésicule biliaire est absente et la bile passe directement du foie au canal cholédoque pour se rendre ensuite au duodénum. Le pool des sels biliaires est localisé dans les intestins (Fisher et al. 1976).

Compte tenu de la microcirculation du foie, plusieurs chercheurs le subdivisent en unités fonctionnelles, appelées acini, qui sont localisées entre l'espace porto-biliaire et l'espace centro-lobulaire. Un apport sanguin riche en oxygène et en solutés est fourni aux hépatocytes de la région porto-biliaire, alors que les hépatocytes de la région centro-lobulaire sont irrigués d'un sang déjà modifié par l'activité métabolique des hépatocytes de la région portale. L'induction des gradients de substrats et d'oxygène tout au long des sinusoides par l'activité métabolique des hépatocytes a permis de subdiviser les acini en trois zones différentes. La zone 1 représente la région périportale près de l'espace porto-biliaire, la zone 3 est péricentrale près de l'espace centrolobulaire et la zone 2 est intermédiaire entre les deux premières (Fig. 1).

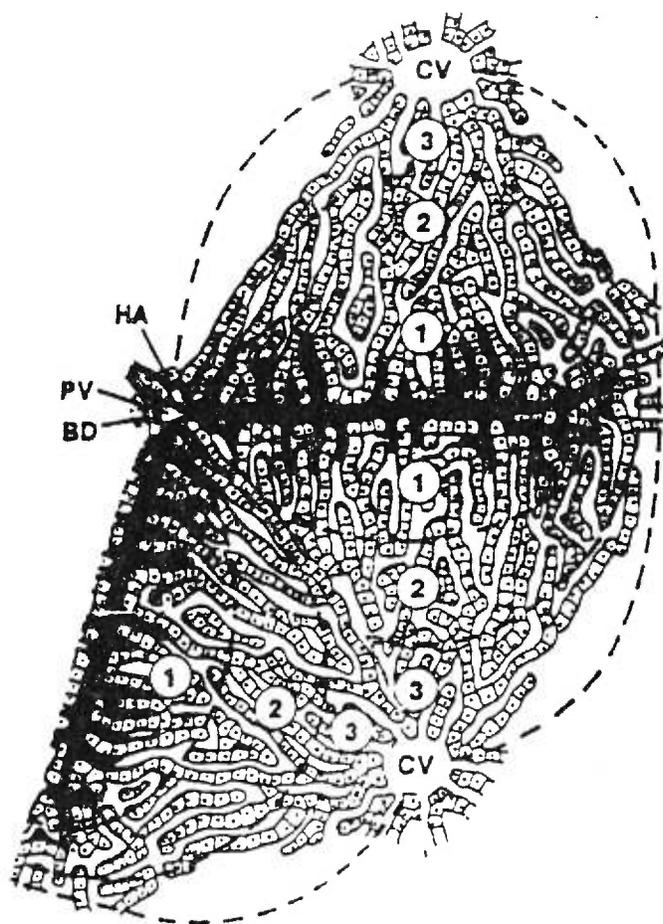


FIG.1 Microcirculation et zonation de l'acinus hépatique. La Pression d'oxygène et le niveau de nutriment dans les sinusoides vont en décroissant de la zone 1 à la zone 3. Les zones 1, 2 et 3 indiquent les volumes correspondants dans une proportion d'une unité acinaire adjacente. BD: canal biliaire; HA: artère hépatique; PV: veine portale; CV: veine centrale. (Rappaport, 1969., Jones, 1996).

On retrouve dans le foie deux types de cellules : les parenchymateuses occupant 78% du volume total du foie et les non parenchymateuses représentant environ 6% composées de cellules endothéliales, cellules de Kuppfer, cellules de Ito, cellules à granules et des cellules canaliculaires biliaires (Blouin et al. 1977). Les hépatocytes représentent les principales cellules parenchymateuses du foie et sont caractérisés par une fonction sécrétoire et une structure spécifiques (Fig 2). Ils ont une surface subdivisée en trois domaines adjacents qui se distinguent par leur morphologie et leur fonction (Evans, 1980; Quistorff, 1985). Le métabolisme, l'entreposage et la sécrétion de diverses substances endogènes et exogènes sont de multiples fonctions remplies par les hépatocytes. Le degré de polarisation de la membrane plasmique module le transport et la sécrétion des substances (Erlinger, 1982b). Les composantes biliaires traversent la membrane canaliculaire pour atteindre les canalicules biliaires, tandis que les solutés du sang pénètrent dans les hépatocytes par les membranes sinusoidales et basolatérales (Boyer, 1980).

La membrane sinusoidale représente 70% de la surface de l'hépatocyte et facilite les échanges de métabolites entre la cellule et le sang. Les cellules hépatiques sont en contact les unes avec les autres via des jonctions cellulaires au niveau de la région latérale ou basolatérale. Les jonctions serrées empêchent l'échange paracellulaire des substances entre la bile et le sang; les jonctions intermédiaires et les desmosomes assurent l'adhésion des hépatocytes voisins, alors que les jonctions communicantes facilitent la communication cellulaire (Evans, 1980; Simons, 1985; Fisher, 1991). La membrane canaliculaire représente seulement 13% de la surface et est localisée au niveau apical (Matsurat et al. 1984). Comme la surface sinusoidale, la membrane canaliculaire comprend de nombreuses microvillosités. Comparativement au domaine basolatéral, la proportion de cholestérol et de glycolipides y est

plus élevée et la composition en protéines y est différente. Son contenu en sphingolipide est augmenté par rapport aux phosphatidyl-cholines (Arias et al. 1987; Kremmer et al. 1976; Schachter, 1988; Van Meer, 1989). Les portions canaliculaires et latérales sont délimitées par une jonction serrée tandis que les domaines sinusoidal et latéral sont continus.

Les cellules endothéliales bordent les sinusoides du foie et forment un endothélium fenestré très perméable qui facilite l'échange entre le sang et les hépatocytes (Blouin et al. 1977). Les cellules de Kuppfer sont localisées principalement dans l'espace périportal (Sleyster et Knook, 1982). Elles assurent la défense de l'organisme en agissant comme présentatrices d'antigènes et phagocytent les substances étrangères, toxiques et les bactéries (Brouwer et al. 1988). Les cellules à granules sont localisées dans la zone périphérique du foie (Kaneda et al. 1983) et sont en contact avec les cellules endothéliales et les cellules de Kuppfer. Les cellules à granules, contrairement aux cellules de Kuppfer, ne phagocytent pas mais possèdent une activité immunologique naturelle en lysant spontanément les cellules infectées par des virus et les cellules tumorales (Bouwens et al. 1987). Les cellules de Ito se trouvent dans l'espace de Disse entre les cellules endothéliales et les hépatocytes. Il a été démontré que les cellules de Ito peuvent jouer un rôle dans la biotransformation et l'entreposage de la vitamine A (Goodman, 1988). D'autres études ont rapporté qu'elles sont impliquées dans la pathogénèse de la fibrose hépatique observée lors d'une cirrhose du foie (Minato et al. 1983; Friedman et al. 1985). En ce qui concerne les cellules biliaires, selon les récents travaux, elles peuvent synthétiser le cholestérol et conjuguer divers sels biliaires avec la taurine et la glycine (Hylemo et al. 1990).

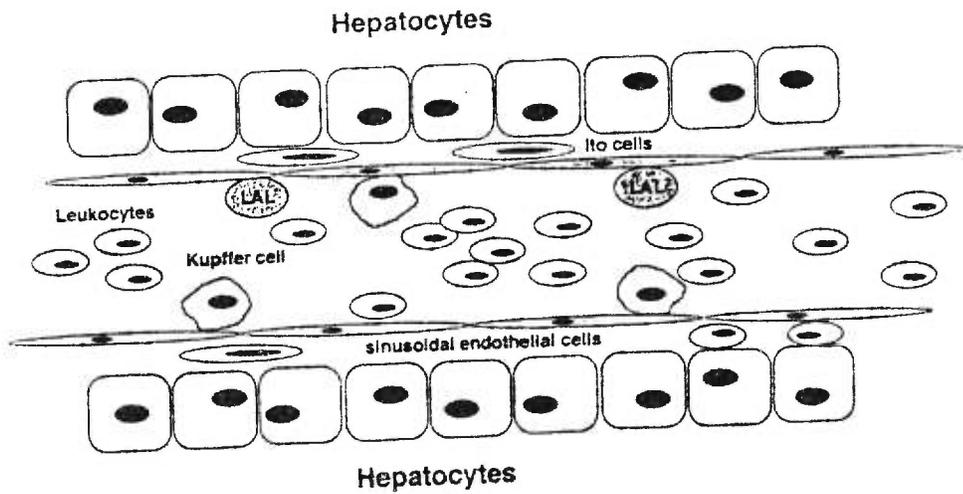


Fig.2 Architecture sinusoidale du foie (Brouwer and Wisse, 1988., Meyer Zum Büschenfelde and Gerken, 1996).

2. BILE

2.1 COMPOSITION DE LA BILE

La bile est un liquide jaune ou vert-olive, son contenu électrolytique est isotonique au plasma et sa composition diffère selon les espèces et les conditions physiologiques de l'animal. Elle est composée de 95% d'eau et de 5% de matières solides (Klaasen et Watkin, 1984). Sa fraction solide est riche en acides biliaires, en lipides, en protéines, en pigments biliaires, en acides aminés et en électrolytes (Boyer, 1986b; Carey et Cahalane, 1988).

2.1.1 Acides biliaires

2.1.1.1 Généralités des acides biliaires

Les acides biliaires sont les principaux produits terminaux du métabolisme de cholestérol. Chez les plus grands vertébrés, ils sont dérivés de l'acide cholanique, un stéroïde de 24 atomes de carbone (Voir Tableau) possédant la caractéristique d'un noyau cyclopentanophenanthrène. Différents acides biliaires sont synthétisés dans le foie par de multiples étapes enzymatiques impliquant la modification du noyau stéroïdien ainsi que la transformation et la conjugaison des chaînes latérales (Bjorkhem, 1992; Radomska et al. 1993; Javitt, 1994).

Tableau. Noms et structures des acides biliaires communs C₂₄
(acides 5 β cholanoïques) de la bile des vertébrés.

Name	Position and orientation of substituents					Side chain	Comments
	3(R ₁)	6(R ₂)	Nucleus		Other		
			7(R ₃)	12(R ₄)			
I. C ₂₄ bile acids (5 β -cholanoates) with an unsubstituted side chain							
Chenodeoxycholic acid group							
1. Chenodeoxycholic	α OH		α OH				Simplest and common primary BA
2. Ursodeoxycholic	α OH		β OH				Primary BA in bear and nutria; "BP" in other species
3. 7-Oxolithocholic	α OH		=0				Primary BA in koala and guinea pig B7-DP of 1 and 2
4. Lithocholic	α OH						
Cholic acid group							
5. Cholic	α OH		α OH	α OH			Common primary BA
6. 7-Epicholic	α OH		β OH	α OH			Can be primary BA in human
7. 7-Oxodeoxycholic	α OH		=0	α OH			Can be primary BA in human
8. Deoxycholic	α OH			α OH			B7-DP of 4
Hyochoalic group							
9. α -Hyochoalic	α OH	α OH	α OH				Primary BA in pigs
10. β -Hyochoalic	α OH	α OH	β OH				"BP" in rat; also termed ω -muricholic HHP of 3
11. Hyodeoxycholic	α OH	α OH					
Muricholic group							
12. α -Muricholic	α OH	β OH	α OH				Primary BA in rodent
13. β -Muricholic	α OH	β OH	β OH				Primary BA in rodent
14. Murideoxycholic	α OH	β OH					HHP of 3
Other trihydroxy bile acids							
15. 16 α -Hydroxychenodeoxycholic	α OH		α OH		16 α OH		Primary BA in many birds
16. 16 α -Hydroxydeoxycholic	α OH			α OH	16 α OH		Primary (?) BA in snake
17. 1 β -Hydroxychenodeoxycholic	α OH		α OH		1 β OH		Primary BA in pheasant and pigeon
18. 1 α -Hydroxychenodeoxycholic	α OH		α OH		1 α OH		Primary BA in Australian marsupials
19. 1 β -Hydroxychenodeoxycholic	α OH		α OH		1 β OH		Primary BA in pigeons
II. C ₂₄ bile acids (5 β) with a hydroxy group in the side chain							
23R-hydroxy-cholic acid group							
20. 23R-hydroxycholic	α OH		α OH	α OH		-23(R)	Primary BA in marine mammals and snakes
21. 23R-hydroxydeoxycholic	α OH			α OH		-23(R)	B7-DP of 14
Other bile acids							
22. 23R-hydroxychenodeoxycholic	α OH		α OH			-23(R)	Primary BA in marine mammals and wading birds
23. 22S-hydroxychenodeoxycholic	α OH		α OH			-22(S)	Primary BA in bony fish

BA: acide biliaire; BP: produit bactérien; B7-DP: produit de 7-dehydroxylation bactérien; HHP: produit d'hydroxylation hépatique. (Hofmann, 1994).

Les acides biliaires synthétisés dans le foie sont généralement appelés acides biliaires primaires et sont principalement composés d'acide chénodéoxycholique ou ACDC (acide biliaire dihydroxylé) et d'acide cholique ou AC (acide biliaire trihydroxylé). Les acides biliaires sont alors excrétés du foie, générant une portion majeure du flux biliaire appelé fraction dépendante des sels biliaires (Reichen et al. 1993; Hofmann, 1994). La sécrétion des acides biliaires est associée à la sécrétion biliaire de cholestérol et de phospholipides (Lowe et al. 1984; Yousef et al. 1987, 1992). Plusieurs autres molécules organiques et inorganiques sont aussi impliquées dans la formation de la fraction du flux biliaire indépendante des sels biliaires (Ballatori et Truong, 1992; Hofmann, 1994; Bouchard et al. 1994).

Les acides biliaires entrent alors dans l'intestin où ils sont nécessaires pour l'absorption des lipides et des vitamines liposolubles aussi bien que le calcium et le fer (Hofmann, 1994). Environ 5% des acides biliaires sont excrétés dans les fèces quotidiennement et remplacés par des acides biliaires nouvellement synthétisés. Les 95% restant sont retournés dans le foie par absorption passive dans le jéjunum, l'iléon, le colon et l'absorption active dans l'iléon dépend de l'acide biliaire (Hofmann, 1994). Durant le passage intestinal, les acides biliaires subissent plusieurs modifications, principalement la déconjugaison et la 1-déshydroxylation (Radomska et al. 1993; Hofmann, 1994) résultant de la formation d'une classe d'acides biliaires appelés acides biliaires secondaires. Ces acides biliaires secondaires sont composés principalement de l'acide déoxycholique ou ADOC (acide biliaire dihydroxylé) et l'acide lithocholique ou ALC (acide biliaire monohydroxylé), lesquels subissent aussi l'absorption intestinale et atteignent le foie (Hofmann, 1994).

Dans le foie, les acides biliaires en provenance de l'intestin subissent la biotransformation, laquelle peut influencer leurs propriétés physicochimiques et leur fonction physiologique (Carey et al. 1994). La circulation de l'acide biliaire passant du foie à l'intestin et de ce dernier au foie s'appelle circulation entérohépatique et les acides biliaires sont normalement restreints à ces organes. Cependant, en cas de maladie, les acides biliaires peuvent augmenter dans le sang et une certaine biotransformation hépatique peut entraîner comme conséquence une augmentation de la sécrétion de l'acide biliaire dans l'urine (Ostrow et al. 1993).

De plus, il a été suggéré que quelques acides biliaires peuvent subir l'absorption dans les canaux biliaires après leur sécrétion à partir des canalicules et leur retour au foie, de même ils peuvent subir la circulation choléhépatique avant leur sécrétion dans l'intestin (Hofmann, 1994). Les acides biliaires qui subissent cette circulation choléhépatique sont normalement hypercholérétiques et génèrent un grand flux biliaire comparativement aux acides biliaires qui n'empruntent pas cette voie (Hofmann, 1994). Il paraît que la biotransformation des acides biliaires est restreinte au foie et à l'intestin.

2.1.1.2 Biosynthèse des acides biliaires

La formation du 7α -hydroxycholestérol par la 7α -hydroxylation dans le foie constitue l'étape d'initiation de la biosynthèse des acides biliaires. Cette étape est régulée par l'activité enzymatique 7α -hydroxylase et représente la phase limitante de cette transformation impliquée dans la synthèse des acides biliaires (Duane et al. 1983). Le 7α -hydroxy-4-cholestène-3-one est le dernier intermédiaire commun dans la biosynthèse des acides biliaires

et il est formé à partir de la transformation du 7α -hydroxycholestérol par l'enzyme 3β -hydroxy- Δ -5-C27-stéroïde déshydrogénase. Par des étapes subséquentes, le 7α -hydroxy-4-cholestène-3-one est transformé en acide cholique, un acide biliaire primaire trihydroxylé, et en acide chénodéoxycholique, un acide biliaire primaire dihydroxylé, selon deux voies de biotransformation différentes. Les acides muricholiques sont aussi considérés comme des acides biliaires primaires puisqu'ils sont synthétisés dans le foie par le processus de 6-hydroxylation de l'acide chénodéoxycholique (Elliott, 1985).

Les acides biliaires qui ne sont pas réabsorbés au cours de la circulation entérohépatique sont transformés par des bactéries intestinales en acides biliaires secondaires au niveau de l'iléon distal et du côlon. Les acides biliaires secondaires sont l'acide déoxycholique, l'acide lithocholique, l'acide ursodéoxycholique (AUDC) et l'acide hyodéoxycholique (AHDC). L'enzyme bactérienne 7α -deshydroxylase transforme les acides cholique et chénodéoxycholique respectivement en acide déoxycholique qui est un acide biliaire dihydroxylé et en acide lithocholique qui est un acide biliaire monohydroxylé. Il a été démontré que l'enzyme 7α -déshydrogénase bactérienne peut transformer l'acide chénodéoxycholique en acide 7-oxo-lithocholique en proportion mineure (Carey et Cohalane, 1988) et ce dernier se transforme en acide ursodéoxycholique (Matern et Gerok, 1979). Il faut souligner également que l'ursodéoxycholique peut être synthétisé à partir de l'acide lithocholique en une proportion mineure (Suchy et al. 1985). Chez le rat, l'acide hyodéoxycholique peut être formé à partir de la 7α -déshydroxylation bactérienne de l'acide α -muricholique (Elliott, 1985) et aussi à partir de la conversion de l'acide lithocholique catalysée par une 6α -hydroxylase au niveau du foie (Schölmerich et al. 1984).

2.1.1 Lipides biliaires

Les principaux lipides biliaires sont le cholestérol (non estérifié) et les phospholipides (lécithine) (Boyer, 1986b; Erlinger, 1986). Plusieurs organes tels que le foie, la peau, l'intestin, les testicules, l'aorte, les ovaires et le cortex surrénalien contribuent à la synthèse du cholestérol, mais la synthèse extrahépatique du cholestérol chez le rat est moins importante que chez l'humain (Harper et al. 1982). Cependant, le foie demeure l'organe principal de la synthèse du cholestérol. Le cholestérol biliaire provient des lipoprotéines de haute densité (HDL) trouvées dans le plasma avec une fraction moins de 30% nouvellement synthétisée dans le foie (Swell et al. 1968; Schwartz et al. 1978; Robin et Brunengraber, 1982). De plus, il a été rapporté que la source principale des atomes de carbone dans la synthèse du cholestérol est l'acétyl-coA (Harper et al. 1982).

La lécithine forme 95% de la totalité des phospholipides et représente leur principal composant (Swell et al. 1968; Schwartz et al. 1978). L'acide phosphatidique des microsomes du foie ou le 1,2- diacylglycérol ont été suggérés comme étant les molécules à partir desquelles sont synthétisés les phospholipides biliaires (Hauton, 1975), alors qu'il a été démontré que les phospholipides nouvellement synthétisés représentent seulement une petite fraction de la totalité des phospholipides biliaires (Robins et Brunengraber, 1982). La source principale de phospholipides apparaît être un pool extrahépatique pouvant être modulé par la diète puisqu'il a été démontré que la synthèse de novo constitue une voie mineure dans la sécrétion des phospholipides biliaires (Chanussot et al. 1990; Rioux et al. 1988). De plus, il a été suggéré que les membranes canaliculaires peuvent être à l'origine des phospholipides

biliaires (Small, 1970), mais cette hypothèse semble être écartée compte tenu de la différence observée au niveau de la composition des phospholipides biliaires et membranaires (Yousef et Fisher, 1976b; Evans et al. 1976).

2.1.3 Effet des acides biliaires sur l'excrétion des lipides biliaires

Il a été suggéré que des micelles peuvent être formés dans la membrane canaliculaire à partir des sels biliaires pour favoriser la solubilisation des microdomaines lipidiques (Coleman, 1987b). Le mécanisme d'excrétion des lipides biliaires reste toutefois à élucider. Cependant, il faut souligner que les transporteurs canaliculaires peuvent jouer un rôle important dans la formation de la bile. Ainsi, l'absence d'expression de quelques protéines de la famille mdr chez certaines souris a permis d'étudier leur implication dans la formation de la bile et la cholestase intrahépatique. Mdr2 représente le membre le mieux caractérisé de la famille des glycoprotéines et ne semble pas être exprimée chez certains sujets souffrant de cholestase intrahépatique familiale progressive (Deleuze et al. 1996). Il a été démontré que les souris ayant une absence de mdr2 ne présentaient pas de signe de cholestase intrahépatique, tel qu'évalué par un flux biliaire normal (Lorenzini et al. 1986) questionnant le rôle direct de mdr2 dans la formation de la bile. Cependant, certaines études ont démontré plusieurs désordres hépatiques chez ces souris suggérant être causés par l'action toxique des acides biliaires retrouvés dans le canalicule (Lorenzini et al. 1986; Mauad et al. 1994; van Nieuwerk et al. 1997). Selon certains chercheurs, la vitesse de sécrétion des lipides biliaires peut varier en fonction du rapport hydrophobicité/hydrophilicité des acides biliaires sécrétés (Bilhartz et Dietschy, 1988). Toutefois chez certaines espèces, incluant l'humain, le porc et le boeuf possédant un haut pourcentage d'acides biliaires hydrophobes, il a été démontré que le

rapport phospholipides/acides biliaries est plus élevé comparativement à d'autres espèces telles que le mouton et le chien présentant un haut pourcentage d'acides biliaries hydrophiles (Cantafora, 1986). Cependant, d'autres études ont soutenu la possibilité d'une fusion entre les vésicules intracellulaires comprenant les lipides avec la membrane canaliculaire pour former des microdomaines lipidiques de grande fluidité pouvant être solubilisés dans la lumière canaliculaire par des acides biliaries (Lowe et al. 1984).

Il a été démontré que la sécrétion de la lécithine et du cholestérol après infusion de plusieurs acides biliaries se présente initialement sous formes de vésicules unilamellaires; cependant, une relation de proportionnalité directe a été observée entre l'hydrophobicité de chaque acide biliaire infusé et sa vitesse de sécrétion (Cohen et al. 1992). Selon ces mêmes auteurs, les acides biliaries hydrophobes permettent la fusion des vésicules pour former une structure liquide cristalline multilamellaire et résistante à la dissolution, alors que les acides biliaries hydrophiles favorisent la dissolution en micelles mixtes des vésicules lécithine-cholestérol monolamellaires.

2.2 FORMATION DE LA BILE

La bile est élaborée par le foie pour se rendre ensuite dans la vésicule biliaire. Par son pouvoir de concentration, la vésicule emmagasine la bile et sécrète une mucine qui lui confère sa viscosité. La sécrétion de la bile dans les canalicules biliaries se fait par les hépatocytes. La bile s'écoule via le canal cholédoque dans le duodénum. Durant les repas, l'entrée de graisses et de protéines dans le duodénum stimule la sécrétion de cholecystokinine par la muqueuse

intestinale qui fait contracter la vésicule biliaire et permet le déversement de la bile dans le canal cholédoque pour favoriser la digestion et l'absorption des lipides ainsi que des vitamines liposolubles (Hofmann, 1990). Chez le rat, la bile arrive du foie et s'écoule directement via le cholédoque dans le duodénum en prenant au passage les sécrétions en provenance du pancréas à cause de l'absence de vésicule biliaire. La fraction biliaire dépendante et indépendante des acides biliaires constitue les principales fractions de la bile canaliculaire.

2.2.1 Débit biliaire dépendant des acides biliaires

Les composants organiques de la bile chez les animaux vertébrés sont formés principalement d'acides biliaires dont le transport à travers les hépatocytes crée un gradient osmotique provoquant un débit d'eau dans la lumière canaliculaire (Sperber, 1965). Il a été suggéré que l'induction du mouvement d'eau trans- et paracellulaire, provoqué par chaque molécule de sel biliaire sécrétée dans le canalicule, constitue la fraction du débit dépendante des sels biliaires; alors qu'il a été également démontré que l'association d'un ion aux sels biliaires contribue aussi au débit biliaire (Hofmann, 1990).

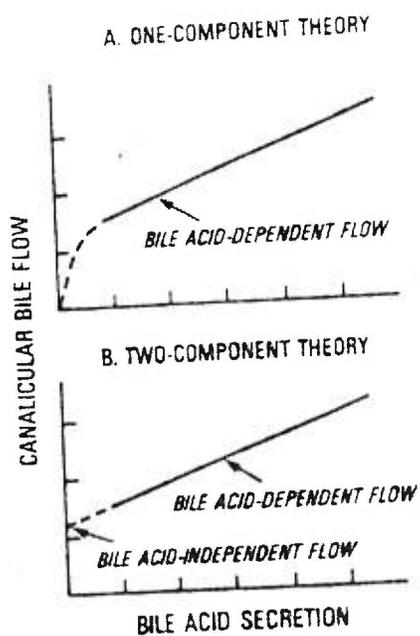


Fig.3 Flux biliaire canaliculaire. A: Le flux biliaire est dépendant des acides biliaries. B: une fraction du flux biliaire est indépendante des acides biliaries. (Erlinger and Dhumaux, 1974., Forker, 1977., Javitt, 1976).

Compte tenu de la corrélation existant entre la sécrétion des acides biliaires et le flux biliaire (Fig.3), certains auteurs suggèrent que les acides biliaires sont les principaux éléments sécrétoires impliqués dans le flux biliaire et induisent en grande partie le débit biliaire canaliculaire (Duane et al. 1983; Erlinger, 1988; Paumgatner, 1984). Par ailleurs, l'infusion d'acides biliaires peut augmenter le débit biliaire. Cependant, en s'associant sous forme de micelles, l'activité osmotique des acides biliaires peut être réduite, ce qui peut aboutir à une diminution du débit biliaire. Ainsi, il a été démontré qu'à faible concentration, les acides biliaires ont un pouvoir cholérétique plus élevé (Balabaud et al. 1977). Pour la formation du flux biliaire, il faut souligner l'implication de plusieurs mécanismes tels que la capture des acides biliaires par les hépatocytes, leur transport trans-cellulaire et leur sécrétion canaliculaire.

2.2.1.1 Capture des acides biliaires

Divers mécanismes de capture des acides biliaires ont été suggérés. Il paraît qu'une interaction du complexe albumine-acide biliaire avec quelques récepteurs de la membrane sinusoidale est impliquée dans une première étape. La dissociation de la liaison protéine-acide biliaire est facilitée par un changement de conformation de l'albumine lors de cette interaction (Forker et Luxon, 1981; Weisiger et al. 1982; Ockner et al. 1983). Le transport des acides biliaires libres à travers la membrane sinusoidale s'effectue via leur liaison avec des transporteurs membranaires ou des récepteurs (Goresky, 1980; Hofmann, 1988; Sorrentino et al. 1990). Il est important de souligner que, lors de la circulation entérohépatique, la liaison des acides biliaires avec l'albumine plasmatique représente plus de

90% de la fraction retournée au foie. Moins de 10% se lie à des lipoprotéines et la fraction libre est évaluée à moins de 1% (Kramer et al. 1979; Salvioli et al. 1985; Hofmann, 1988). De plus, il a été suggéré que les propriétés détergentes des acides biliaires ainsi que leur perte causée par la filtration rénale peuvent être réduites par leur liaison aux protéines plasmatiques (Salvioli et al. 1985; Berk et Stremmel, 1986; Coleman, 1987a).

L'utilisation des anticorps monoclonaux lors de certaines études a favorisé l'identification d'une protéine membranaire ayant un poids moléculaire de 49 KDa impliqué dans le transport des acides biliaires (Ananthanarayanan et al. 1988). D'autres études ont révélé la présence d'un polypeptide de 48 KDa impliqué dans le transport dépendant du Na^+ et d'un autre de 54 KDa dont l'implication dans le transport des acides biliaires et de plusieurs anions organiques est indépendante du Na^+ . Ces polypeptides ont été extraits de l'hépatocyte au niveau de la membrane sinusoidale (Kramer et al. 1982; Berk et al. 1987a; Friemmer et Ziegler, 1988; Sellinger et Boyer, 1990; Sorrentino et al. 1990). Ainsi, certains auteurs suggèrent que la source d'énergie impliquée dans la capture des acides biliaires semble résulter de l'établissement et du maintien du gradient de Na^+ par le système Na^+/K^+ -ATPase (Eaton et Richads, 1986; Zimmerli et al. 1989).

De récentes études ont rapporté qu'un transporteur, nommé ntcp ($\text{Na}^+/\text{Taurocholate}$ cotransporting polypeptide), dépendant de sodium et responsable du transport des acides biliaires a été cloné (Hagenbuch et al. 1991, 1994). Chez le rat, c'est une glycoprotéine de 362 acides aminés avec 7 domaines transmembranaires, une masse moléculaire apparente de

51 KDa et localisée exclusivement dans la membrane sinusoidale (Stieger et al. 1994). Cette protéine médie le transport de sodium dépendant d'acides conjugués tels que l'acide taurocholique et semble être responsable de la fraction prédominante de la capture des sels biliaires hépatiques (Meier, 1995; Meier et al. 1997). Un second transporteur, oatp (organic anion transporting protein), a été cloné du foie humain et de rat (Jacquelin et al. 1994; Kullack-Ublick et al. 1994). La capacité de transport bidirectionnel d'oatp suggère qu'il joue un rôle de pompe de sécurité dans des conditions pathologiques associées à la cholestase (Meier, 1995). (Fig.4)

Cependant, il a été mentionné par de nombreuses études qu'un changement marqué peut survenir dans la cinétique et dans le mécanisme de capture des acides biliaires naturellement modifiés. C'est ainsi qu'il a été démontré que la cinétique de transport de l'acide tauroolithocholique a été affectée par la modification de sa chaîne latérale (Anwer et al. 1985; Hardisson et al. 1988). En outre, d'autres études ont rapporté que le transport dépendant du Na^+ de l'acide glyco-cholique a été supprimé par l'addition des acides aminés tels que la tyrosine et l'histamine (Deutsch et al. 1992).

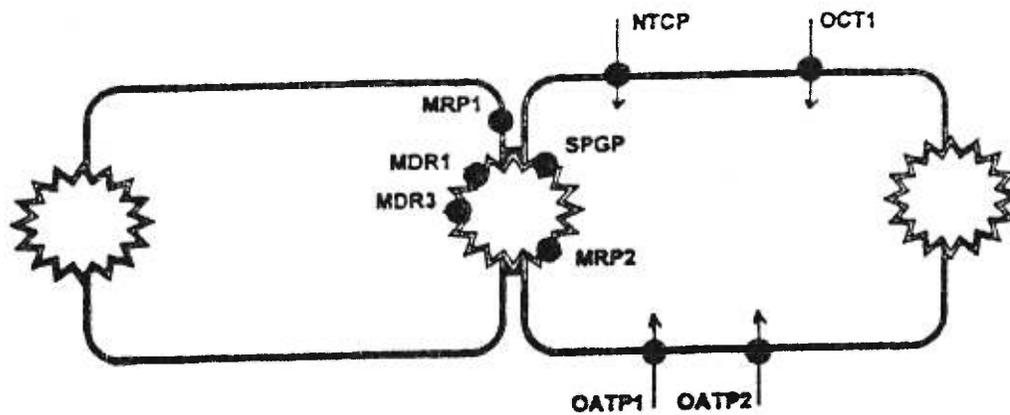


Fig.4 Transporteurs membranaires impliqués dans la formation biliaire chez l'humain (Meier, 1988., Muller et al. 1997).

Il a été suggéré que, contrairement au système de transport actif primaire impliquant l'énergie libérée de l'hydrolyse d'ATP pour assurer son fonctionnement, la capture des acides biliaires au niveau membranaire est plutôt régulée par un système de transport actif secondaire utilisant le gradient de Na^+ mise en place par la pompe Na^+/K^+ -ATPase (Berk et al. 1987; Frimmer et Ziegler, 1988; Zimmerli et al. 1989; Sellinger et Boyer, 1990). De plus, ces mêmes études sur le transport membranaire ont révélé l'existence d'un transport actif contre un gradient de concentration au niveau de la membrane sinusoidale en utilisant des marqueurs par photoaffinité ou des acides biliaires radioactifs. Cependant, il a été suggéré que les acides biliaires di- et monohydroxylés nonconjugués entrent dans les hépatocytes par une diffusion passive ou un transport indépendant du sodium, alors que l'entrée des acides biliaires trihydroxylés conjugués dans les hépatocytes s'effectue par un système de transport actif (Scharschmidt et Lake, 1989; Sorrentino et al. 1990; Boyer et al. 1992).

2.2.1.2 Transport intracellulaire des acides biliaires

Le transport intracellulaire cytosolique des acides biliaires vers la membrane canaliculaire constitue la deuxième grande étape après leur capture transmembranaire. Selon les chercheurs, deux mécanismes semblent être impliqués dans ce processus de transport. Pour certains, il s'agit d'un système de transport vectoriel qui est assuré par les vésicules membranaires (Suchy et al. 1983; Lamri et al. 1988); alors que pour d'autres, ce sont plutôt les protéines de liaison qui sont impliquées dans ce mécanisme de transport (Sugiyama et al. 1983; Stolz et al. 1984, 1989).

En effet, une prolifération des vésicules membranaires à proximité de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique lisse au niveau de la région péricanaliculaire, lors du transport transcellulaire des acides biliaires, a été observée par des études morphologiques (Erlinger, 1985; Lamri et al. 1988). Cependant, en ce qui concerne les protéines de liaison qui seraient impliquées dans le transport des acides biliaires, il a été démontré que les protéines cytoplasmiques se lient en majeure partie aux acides biliaires selon certains modèles de distribution cellulaire (Strange et al. 1979, 1981). Les protéines de liaison cytoplasmiques ont été classées en trois groupes soit Y, Y' et Z par certains auteurs (Takikawa et Kaplowitz, 1986; Stolz et al. 1987, 1989).

Chez l'humain et le rat, la glutathione-S-transférase de poids moléculaires respectifs de 50 et 44 KDa a été identifiée comme étant la protéine Y retrouvée dans le cytoplasme hépatique. Aucune activité enzymatique au niveau du métabolisme des acides biliaires n'a été révélée dans le cytosol hépatique chez l'humain pour la protéine Y' de poids moléculaire 36 KDa (Takikawa et al. 1990b). Cependant, dans le cytosol hépatique chez le rat, l'enzyme 3 α -hydroxystéroïde déshydrogénase de poids moléculaire 33 KDa, qui participe aux réactions d'oxydo-réduction en position C3 des acides biliaires et leurs précurseurs, a été identifiée comme étant la protéine Y' (Takikawa et al. 1990a). La protéine Z a été identifiée chez l'humain et le rat, elle a un poids moléculaire de 14 KDa et se lie aux acides gras de façon préférentielle comparativement aux acides biliaires et aux ions organiques (Takikawa et Kaplowitz, 1986). Toutefois, il a été rapporté que la protéine Y' démontre une plus grande affinité pour les acides biliaires mono-, di- et trihydroxylés que les autres protéines de liaison

cytoplasmique. Cette observation a été possible grâce à l'utilisation des marquages par photoaffinité (Stolz et al. 1989).

2.2.1.3 Sécrétion canaliculaire des acides biliaires

D'autres transporteurs ont été localisés dans les membranes canaliculaires (Fig.4) tels que MDR (multidrug resistance) et MRP (multidrug resistance protein). Ces transporteurs s'impliquent dans un mécanisme de transport d'acides biliaires dépendant d'ATP (Elferinkk, 1991). D'autres études ont rapporté que la sécrétion des acides biliaires dans la bile s'effectue contre un gradient de concentration et suivant un processus de saturabilité qui requiert la présence d'un transporteur (Meier et al. 1984, 1987; Erlinger, 1988). De plus, l'utilisation des anticorps monoclonaux et des marquages par photoaffinité ont permis de révéler l'existence d'une p-glycoprotéine de 110 KDa dans la membrane canaliculaire, démontrant une propriété de transport dépendant de l'ATP des acides biliaires et une capacité de se lier avec l'acide tauro lithocholique (Muller et al. 1991).

Les travaux effectués par Nishida et al. (1991) ainsi que par Adachi et al. (1991) ont démontré l'existence d'un transport actif primaire directement dépendant de l'hydrolyse de l'ATP et spécifique à la sécrétion canaliculaire des acides biliaires. Ces observations portent à croire que des changements dans ces mécanismes peuvent affecter la formation du flux biliaire, particulièrement la fraction dépendante des acides biliaires.

Cependant, certains auteurs ont suggéré que le passage des acides biliaires dans la bile au niveau de la lumière canaliculaire s'effectue selon un mécanisme d'exocytose impliquant les vésicules membranaires contenant les acides biliaires et la membrane canaliculaire (Blitzer et Boyer, 1982). Mais, il faut souligner que le mécanisme d'exocytose impliquant le transport vésiculaire ne peut expliquer à lui seul le processus d'excrétion, car la contribution du transport vésiculaire au transport transcellulaire des acides biliaires ne semble pas être très importante. Toutefois, d'autres mécanismes ont été suggérés pour expliquer le transport canaliculaire des acides biliaires. Ainsi, selon certains chercheurs, ce type de transport ne dépend pas du sodium mais implique un potentiel électrique entre la lumière du canalicule et l'hépatocyte (Weinman et al. 1989).

De plus, il a été rapporté que la concentration des acides biliaires dans la lumière canaliculaire est environ 100 fois celle dans le cytosol, alors que le potentiel minimal nécessaire pour transporter une substance contre un gradient de 10 fois sa concentration est de 58 mV (Coleman, 1987). D'autres études ont démontré que le potentiel électrique au niveau de la membrane du canalicule qui est de l'ordre de 40 mV environ s'avère inadéquat pour permettre la sécrétion des acides biliaires dans le canalicule (Graf et al. 1987). En effet, ces études ont permis de comprendre que toute modification survenue au niveau des mécanismes de transport peut influencer la formation du flux biliaire dépendant des acides biliaires.

2.2.2 Flux biliaire indépendant des acides biliaires

En dépit de nombreuses études établissant une certaine relation de proportionnalité entre la sécrétion des acides biliaires et le flux biliaire, il reste toutefois à expliquer la fraction biliaire obtenue même en absence de sécrétion d'acides biliaires. En fait, plusieurs mécanismes ont été suggérés pour expliquer le flux biliaire indépendant des acides biliaires. L'un des mécanismes fait allusion à l'implication de l'ion bicarbonate HCO_3^- qui, selon certains auteurs, peut être sécrété à travers la membrane du canalicule via un système d'échange entre un ion chlore Cl^- qui entre dans la cellule et un ion HCO_3^- qui en sort (Sellinger et al. 1988). Cela suggère qu'un canal Cl^- est requis pour permettre sa recirculation dans le système. De plus, d'autres études ont suggéré que l'excrétion de HCO_3^- dans la bile via le système $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ implique la contribution d'un système d'échange Na^+/H^+ au niveau de la membrane sinusoidale pour contrôler le pH intracellulaire et permettre la formation de HCO_3^- par l'anhydrase carbonique hépatique (Irwin et Arias, 1986; Henderson et al. 1987; Gleeson et al. 1988).

D'autres auteurs ont proposé la notion de la perméabilité de la jonction serrée au passage de l'eau et de certains électrolytes comme mécanisme pour expliquer la formation de cette fraction du flux biliaire (Boyer, 1980; Klaasen et Watkins, 1984). Il a été démontré que la sécrétion de solutés autres que les acides biliaires peut aussi être responsable de la création d'un gradient osmotique favorisant une sécrétion d'eau et la contribution de cette fraction du flux biliaire au débit biliaire total est loin d'être négligeable (Boyer, 1980). Chez l'humain, cette fraction du flux biliaire représente 40% du débit total et 50% chez le rat; cependant, il faut

souligner que, chez plusieurs espèces animales, des études ont démontré la présence du débit biliaire indépendant des acides biliaires (Erlinger, 1988).

2.3 CONJUGAISON

La conjugaison des acides biliaires est un mécanisme de détoxification impliquant des réactions de biotransformation de phase II. Ces réactions consistent à ajouter aux acides biliaires un groupe polyatomique tel que le sulfate, le glutathion, le glucuronate ou un acide aminé tel que la glycine ou la taurine (Hofmann, 1994). La conjugaison des acides biliaires implique l'amidation avec la glycine ou la taurine aussi bien que l'estérification avec le glucuronate, le sulfate, le glucose ou la N-acétylglucosamine. La glucuronidation peut survenir sur les groupes hydroxyles de la chaîne latérale ou du noyau pour former un éther glucuronidé ou sur le groupe carboxyl de la chaîne latérale pour former un ester glucuronidé. Cependant, l'estérification avec le sulfate, le glucose ou N-acétylglucosamine peut survenir uniquement sur un groupe hydroxyl. Les alcools biliaires sont communément sulfatés et peuvent être glucuronidés en des proportions plus petites (Hofmann, 1994). Les acides biliaires sont conjugués surtout avec la glycine ou la taurine avant d'être excrétés dans la bile (Hofmann 1990; Elliot 1985; Suchy et al. 1985). La glycine et la taurine sont conjugués aux acides biliaires dans un rapport qui varie selon l'espèce.

2.3.1 amidation

La réaction majeure de biotransformation en phase II des acides biliaires monohydroxylés, et en fait tous les acides biliaires, est l'amidation ou la conjugaison avec les

acides aminés. Il existe deux types d'amidation: la conjugaison avec la taurine et la glycine (Dionne et al. 1994). Cependant, Elliott (1985) a rapporté que d'autres amides mineurs étaient produits avec d'autres acides biliaires. Le type d'amidation semble être spécifique aux espèces et la disponibilité de la taurine apparaît être le facteur limitant, comme dans le cas des cobayes. Ces derniers sécrètent des acides biliaires principalement conjugués avec la glycine, mais la conjugaison à la taurine peut se produire si celle-ci est ajoutée à la diète de l'animal (Paul-Dorvil et al. 1983).

L'amidation des acides biliaires augmente leur solubilité à faible pH en réduisant le pKa. Cependant, elle n'a pas d'effet constant sur leurs concentrations micellaires critiques (Hofmann, 1994); elle influence leur capture cellulaire, leur sécrétion et leur fonction physiologique (Hofmann, 1994; Yousef, 1992). L'amidation, cependant, ne protège pas la cholestase induite par l'acide lithocholique, et en fait, l'acide tauroolithocholique induit une cholestase intrahépatique immédiate et plus sévère que l'acide lithocholique libre (Kakis et Yousef, 1978). Ceci est en accord avec le manque d'effet de l'amidation sur la solubilité de l'acide lithocholique (Carey et al. 1979; Oelberg et al. 1984).

2.3.2 Sulfatation

En général, la sulfatation est un mécanisme de protection permettant d'augmenter la solubilité des acides biliaires en les rendant plus hydrophiles et de diminuer leur potentiel cholestatique et hépatotoxique en accélérant leur excrétion (Yousef et Tuchweber, 1992; Radomska et al. 1993). La sulfatation des acides biliaires tri- et dihydroxylés prévient l'effet cholestatique de l'augmentation de la concentration des acides biliaires analogues nonsulfatés

(Radomska et al. 1993). La sulfatation de ces sels biliaires constitue une voie de biotransformation mineure chez les humains, exceptés en cholestase où l'ACDC est efficacement sulfaté et éliminé dans l'urine (Van Berge Henegouwen et al. 1976; Stielhl, 1976; Raedsch et al. 1981; Hedenborg et Norman, 1984). Chez les espèces qui font efficacement la sulfatation tel que le hamster, ce mécanisme peut contribuer à l'élimination rapide des acides biliaires en cholestase (Galeazzi et Norman, 1977).

Parmi les acides biliaires, une attention particulière a été portée sur les acides biliaires monohydroxylés à cause de leur grande capacité d'hépatotoxicité. L'efficacité de la sulfatation de l'ALC, qui est un acide biliaire monohydroxylé, varie selon les espèces. En effet, la sulfatation de l'ALC survient chez l'humain (Cowen et al. 1975), le chimpanzée (Schwenk et al. 1978), le singe rhésus (Gadacz et al. 1976) et le babouin (Palmer et Mcsherry, 1982). La sulfatation est la seconde réaction majeure de biotransformation en phase II chez l'humain (Palmer, 1967; Yousef, 1997). La sulfatation augmente la solubilité des acides biliaires monohydroxylés, leur reflux à partir des hépatocytes et leur excrétion urinaire (Carey et al. 1979; Oelberg et al. 1984).

L'excrétion de ces sels biliaires dans les fèces augmente aussi (Kuipers et al. 1986). Ainsi, ces réactions étaient considérées comme des mécanismes de détoxification des acides biliaires monohydroxylés. Probablement le mécanisme le plus commun de détoxification de l'ALC chez les mammifères est l'hydroxylation en position 6 ou 7 (Elliot, 1985; Barnes et al. 1986). Le singe rhésus possède une sulfotransférase et la faible activité de la sulfatation

observée *in vivo* suggère une inhibition de l'enzyme, possiblement par les acides biliaires 3-oxo (Barnes et al. 1986).

Cette différence observée chez les espèces quant à leur capacité à sulfater l'ALC est d'intérêt considérable, car cela explique l'hépatotoxicité induite par l'administration chronique de l'ACDC et l'AUDC chez les lapins (Cohen et al. 1986) et chez le singe rhésus (Bazzoli et al. 1982). Cependant, chez l'humain, ces agents ont été grandement utilisés pour la dissolution des calculs biliaires, mais l'hépatotoxicité est rare, elle n'a jamais été associée à l'accumulation de l'ALC dans la circulation entérohépatique probablement à cause de la capacité du foie de l'humain à sulfater et ainsi détoxifier l'ALC. Ainsi, il faut souligner que la sulfatation de l'ALC ne constitue pas toujours un mécanisme de protection. L'excrétion urinaire de l'ALC sulfaté s'avère très faible (Hofmann, 1994), ce qui suggère que sa réabsorption semble similaire à son analogue nonsulfaté (Kuipers et al. 1986) et conséquemment ne favorise pas nécessairement le processus de son élimination.

De plus, il semble que la conjugaison de l'ALC à la taurine ou la glycine affecte l'effet protecteur de la sulfatation contre le potentiel cholestatique de l'ALC. Il a été démontré que le glycolithocholate sulfaté demeurerait cholestatique et même plus cholestatique que le composé parental, l'acide glycolithocholique (Yousef, 1981). Cependant, l'acide taurolithocholique sulfaté n'est pas cholestatique chez le rat (Yousef, 1981). En fait, il a été rapporté que la diète à la taurine chez les porcs convertit la capacité de conjugaison de glycine en taurine et prévient la cholestase induite par l'acide lithocholique sulfaté (Paul-Dorvil et al. 1983; Belli et al. 1991).

Ces données semblent être en accord avec l'effet des propriétés physicochimiques comme les solubilités aqueuses de l'acide lithocholique sulfaté et de l'acide tauroolithocholique sulfaté qui étaient de 4 à 50 fois supérieurs à leurs composés parentaux, respectivement. Par contre, la solubilité de l'acide glycolithocholique sulfaté était similaire à son analogue non sulfaté (Carey et al. 1979). Il semble que l'ALC sulfaté est beaucoup moins cholestatique que l'ALC libre surtout chez les espèces à tauro- conjugaison où le tauro-ALC sulfaté est formé majoritairement (Paul-Dorvil, 1983; Takikawa et al. 1991).

Mais cette observation ne s'avère pas toujours vraie, car la sulfatation de tauro-3 β -hydroxy-5-cholenoate est aussi cholestatique que son analogue nonsulfaté chez des rats (Mathis et al. 1983). Il est important de mentionner également que la sulfatation de l'ALC chez le rat est très faible (Pattinson et Chapman, 1984; Barnes et al. 1989; Vu et al. 1992). Le rôle de protection attribué aux acides biliaires sulfatés dans la cholestase intrahépatique est dû au fait qu'ils démontrent généralement un potentiel cholérétique plus élevé que leurs analogues nonsulfatés (Yousef et al. 1992).

2.3.3 Glucuronidation

L'une des secondes réactions majeures de biotransformation en phase II est la glucuronidation chez le rat (Vu et al. 1992). Une augmentation de l'excrétion de ces acides biliaires dans les fèces a été observée (Kuipers et al. 1986). Ainsi, ces réactions étaient considérées comme des mécanismes de détoxification pour les acides biliaires monohydroxylés. Les lithocholates glucuronidés étaient démontrés hautement cholestatiques malgré qu'une augmentation de leur solubilité aqueuse par 3 à 50 fois a été observée

comparativement au composé parental (Oelberg et al. 1984; Takikawa et al. 1989). La sécrétion d'ALC précédant l'effet cholestatique, lors de son administration aiguë, suggère que la glucuronidation joue un rôle soit dans l'initiation ou dans la potentialisation de la cholestase induite par ALC (Dionne et 1994; Vu et al. 1992).

2.4 Biotransformation des acides biliaires monohydroxylés

Il est connu depuis plusieurs années que les acides biliaires monohydroxylés, produits secondairement par la déshydroxylation intestinale des acides biliaires tels que ACDC et AUDC, induisent une cholestase intrahépatique lorsqu'ils sont infusés ou injectés par voie intraveineuse chez toutes les espèces animales étudiées (Roy et al. 1989). Puisque la majeure partie des acides biliaires monohydroxylés sont produits dans l'intestin et sont toxiques pour le foie et d'autres cellules, on s'attend à ce qu'ils subissent plusieurs réactions de biotransformation. Cependant, il faut mentionner que cette biotransformation, incluant les réactions de phase I et II, peut être spécifique aux espèces, par exemple elle peut survenir chez le rat et non chez l'humain et vice versa.

La biotransformation majeure des acides biliaires monohydroxylés est leur hydroxylation qui est spécifique aux espèces. Les humains n'hydroxylent pas les acides biliaires monohydroxylés. Ainsi le métabolisme en phase II est l'unique transformation chez l'humain pour ces acides biliaires. Chez les rats, cependant, les acides biliaires monohydroxylés sont hydroxylés en positions 6 et 7 produisant l'acide chénodéoxycholique et une série d'acides muricholiques. La voie exacte pour la transformation des acides biliaires

monohydroxylés en acides muricholiques n'est pas établie; cependant, il a été suggéré qu'elle est médiée par l'oxydation du groupe hydroxyl 7α (Pattinson et Chapman, 1984; Zimniak et al. 1989).

Quand l'acide biliaire monohydroxylé est administré en une dose aiguë, il induit une cholestase mais l'animal se rétablit 90 minutes ou 1 heure après l'effet cholestatique maximum (Vu et al. 1992). Le rétablissement est précédé par la sécrétion des métabolites de l'acide biliaire monohydroxylé qui continue d'augmenter durant cette phase de récupération. Ainsi, l'hydroxylation semble jouer un rôle majeur dans le rétablissement ou la prévention de la cholestase induite par l'acide biliaire monohydroxylé. En fait, l'hydroxylation des acides biliaires monohydroxylés chez les rats est très efficace et inductible, car lorsque l'acide lithocholique est administré chroniquement, tous les acides biliaires sécrétés sont hydroxylés et aucune cholestase n'est produite (Gratton et al. 1987). L'importance de l'hydroxylation dans la prévention de la cholestase induite par l'acide lithocholique est suggérée par une évidence indirecte, telle que l'absence de cholestase induite par la perfusion d'acide tauroolithocholique qui est associée à une augmentation de sécrétion des acides biliaires hydroxylés (Baumgartner et al. 1987).

3. CHOLESTASE

Le terme cholestase a été introduit par Popper et Schaffner (1970). Littéralement, cela signifie stagnation de la bile dans le foie. Il y a une diminution des quantités normales de bile devant atteindre le duodénum. La cholestase est dite extrahépatique quand il y a une

obstruction mécanique des voies biliaires et intrahépatique lorsqu'une lésion obstructive ne peut être montrée compte tenu du fait que le défaut est dans l'hépatocyte ou dans les canaux biliaires microscopiques du foie (Popper et Schaffner, 1970). Le syndrome de cholestase inclut les critères histopathologique, fonctionnel, clinique et biochimique. Du point de vue fonctionnel, les changements observés dans les hépatocytes reflètent des perturbations dans la sécrétion de la bile (Loria et al. 1991).

3.1 Cholestase intrahépatique

Pour expliquer la cholestase intrahépatique, plusieurs études ont été effectuées pour essayer de démontrer les différents mécanismes qui sont impliqués dans le développement de cette pathologie. Il a déjà été démontré qu'une partie du flux biliaire dépendait des acides biliaires. En effet, certaines études ont rapporté que certains médicaments comme la cyclosporine, l'endotoxine, les antibiotiques et des substances comme les stéroïdes peuvent inhiber le transporteur impliqué dans la capture sinusoidale des acides biliaires et ainsi affecter l'écoulement de la bile (Nathanson et Boyer, 1991; Zimmerli et al. 1989).

De plus, il a été mentionné qu'une diminution du débit biliaire peut être due à un blocage de la Na^+/K^+ -ATPase provoquant une perturbation dans le gradient de Na^+ transmembranaire lequel est impliqué dans le système de capture sinusoidale des acides biliaires. Toutefois, il a été suggéré que certaines formes de cholestase seulement sont reliées à cette inhibition qui n'est qu'une modification secondaire (Meier, 1990). D'autres études ont fait état de l'affectation du système de transport canaliculaire lors d'une cholestase causée par l'éthinyl-oestradiol et les glucuronidés (Kukongviriyapan et Stacey, 1991).

Plusieurs chercheurs ont rapporté que certaines substances comme les cytochalasines, la chlorpromazine, la noréthandrolone et la phalloïdine affectent l'activité du cytosquelette et réduisent le débit biliaire par différents mécanismes (Philips et al. 1983, 1986). Ainsi, il a été démontré qu'il existe une perturbation de l'activité du cytosquelette de la région péricanaliculaire dans diverses formes de cholestase. En effet, une certaine organisation du cytosquelette est nécessaire pour favoriser la sécrétion des lipides, pour maintenir la structure des jonctions serrées, de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique dont l'implication dans la formation de la bile a été rapportée (Grégory et al. 1978; Madara et al. 1986; Teresaki, 1990).

Certains laboratoires ont utilisé des substances telle que l'éthinyl-oestradiol comme étant un produit capable d'affecter la fluidité membranaire des hépatocytes en augmentant le niveau de cholestérol membranaire et le rapport cholestérol/phospholipide pour produire l'effet cholestatique (Boelsterli et al. 1983; Storch et Schachter, 1983; Rosario et al. 1988). Ainsi, cette cholestase induite peut s'expliquer par une altération de l'organisation du cytosquelette et une perturbation de l'activité contractile due à l'incorporation de cholestérol membranaire provoquant ainsi une réduction de la fluidité de la membrane (Van Ginkel et al. 1989).

Il a été démontré que le calcium est impliqué dans le maintien du fonctionnement du cytosquelette au niveau de la perméabilité paracellulaire, dans la contraction des canalicules biliaires ainsi que dans la sécrétion de la bile. Cela suggère un autre mécanisme de cholestase advenant une perturbation dans la concentration intracellulaire du calcium (Kan et Coleman,

1988; Llopis et al. 1991). En effet, une augmentation de la perméabilité de la jonction serrée a été révélée dans divers modèles de cholestase induite par l'éthinyl-oestradiol, la phalloïdine et la combinaison manganèse-bilirubine (Elias et al. 1980; Ayotte et Plaa, 1986).

Compte tenu de l'implication de la voie paracellulaire dans la sécrétion biliaire indépendante des acides biliaires, certains auteurs suggèrent qu'une altération dans la perméabilité de la jonction serrée peut provoquer un reflux biliaire plasmatique et une réduction de la formation biliaire suite à une baisse de la concentration des substances osmotiques de la bile (Robenek et al. 1981; Boyer, 1983). D'autres remarques ont été rapportées sur l'hyperbilirubinémie et le débit biliaire qui diminue de moitié chez les rats mutants TR⁻ présentant un défaut de sécrétion des anions organiques comparativement aux rats normaux (Jansen et al. 1985). Un défaut génétique au niveau du transport canaliculaire des anions organiques peut expliquer ce mécanisme impliqué dans cette cholestase.

3.2 Cholestase induite par acides biliaires

Les acides biliaires apparaissent être des médiateurs importants de cholestase. En fait, de nombreux chercheurs considèrent les acides biliaires comme étant les initiateurs majeurs de cette condition (Fromm, 1994). La diminution de l'efficacité de la circulation entérohépatique et de la sécrétion biliaire est associée à l'augmentation des concentrations des acides biliaires hépatiques et systémiques qui produisent de nombreux défauts secondaires et aggravent la pathologie (Ostrow, 1993; Stiehl, 1994; Luketic et Sanyal, 1994). Des perturbations dans l'homéostasie d'acides biliaires peuvent aussi initier la cholestase observée

lors de l'infusion intraveineuse des doses croissantes d'acides biliaires (Hardison et al. 1981; Barnwell et al. 1987; Roy et al. 1989).

3.3 Cholestase induite par haute concentration d'acide biliaire

Les acides biliaires relativement plus hydrophiliques tels que AC sont cholérétiques à des doses qui résultent en une cholestase avec des acides biliaires mono- et dihydroxylés. Lors de l'infusion des doses croissantes d'AC, la sécrétion biliaire atteint son taux de sécrétion maximal et subséquemment produit une diminution du taux de sécrétion des sels biliaires. La formation biliaire et la sécrétion des lipides sont réduites, mais l'écoulement biliaire des protéines comme l'albumine, la lactate deshydrogénase, la phosphatase alcaline et la 5-nucléotidase est augmenté (Hardison et al. 1981; Kanai et Kitani, 1983; Kitani et al. 1985; Barnwell et al. 1987; Fukumoto et al. 1994). La cholestase peut être produite in vivo (Hardison et al. 1981; Kanai et Kitani, 1983; Barnwell et al. 1987) et in vitro par la perfusion du foie isolé (Durham et Vore, 1986). Bien que AC montre un taux de sécrétion maximal beaucoup plus élevé que les autres acides biliaires, le changement dans la formation biliaire se produisant subséquemment apparaît être tout à fait similaire à la cholestase induite par l'infusion des doses croissantes d'autres acides biliaires.

Dans une étude de cholestase induite par AC, la sécrétion de phospholipides atteignait son taux de sécrétion maximal avant celui des acides biliaires (Barnwell et al. 1987; Yousef et al. 1987; Rioux et al. 1994). Un changement dans la composition des phospholipides biliaires est observé à ce point, la diminution du pourcentage habituel de phosphatidyl-choline étant associée à une augmentation des niveaux de sphingomyéline et de

phosphatidyléthanolamine. Cela s'expliquerait par l'instabilité du taux de sécrétion maximal des acides biliaires qui peut être modifié significativement par la disponibilité des acides biliaires. Le taux de sécrétion maximal augmentait avec une réserve d'acides biliaires en expansion, mais apparaît être beaucoup plus limité chez les animaux dont les réserves en acides biliaires ont été déplétées (Adler et al. 1977; Rioux et al. 1994).

3.4 Cholestase induite directement par ALC

La pathogénèse de la cholestase des acides biliaires monohydroxylés a été étudiée pendant plusieurs années parce que l'ALC est présent normalement dans la bile chez l'humain en quantité de trace et son potentiel cholestatique a été démontré chez diverses espèces étudiées. Cette cholestase est dose-dépendante et réversible (Priestly et al., 1971). Il a été suggéré que l'ALC, à cause de sa solubilité lente, peut précipiter dans le canal biliaire pour provoquer le blocage du flux biliaire et la cholestase. Néanmoins, le manque d'effet cholestatique de l'acide tauroolithocholique sulfaté, qui est 50 fois plus soluble que l'ALC, peut appuyer cette hypothèse (Yousef et al. 1981). Toutefois, une autre étude a démontré que le lithocholate glucuronidé, qui est plus soluble que l'ALC, était plus cholestatique ce dernier (Oelberg et al. 1984).

Le travail de Kuipers et al. (1985, 1992) sur la pathogénèse de la cholestase induite par l'acide glycolithocholique sulfaté, utilisant des rats avec un défaut dans le transport canaliculaire de l'acide glycolithocholique, suggère que la cholestase induite par cet acide biliaire requiert une sécrétion canaliculaire et possiblement une précipitation avec le calcium dans les canaux biliaires. Ces mêmes auteurs mentionnent que la capture d'acide

glycolithocholique sulfaté, selon le caractère héréditaire des rats, n'est pas clairement établie ainsi que le manque d'effet cholestatique. Ainsi, le manque d'effet cholestatique de l'acide glycolithocholique sulfaté peut être aussi dû à une capture lente par les hépatocytes. Compte tenu de la liaison des acides biliaires monohydroxylés au calcium, il a été suggéré que les changements dans l'homéostasie du calcium cellulaire peuvent être responsables de leur effet cholestatique (Thibault et al. 1993). Cependant, cette hypothèse a été contestée puisque d'autres composés changent effectivement l'homéostasie du calcium cellulaire et n'induisent pas de cholestase (Vu et al. 1992).

D'après certains laboratoires, les membranes plasmiques et canaliculaires des cellules du foie subissent une modification majeure en rapport à l'augmentation de leur contenu en cholestérol durant le développement de la cholestase induite par l'ALC, cette hypothèse restant inexplicée (Kakis et Yousef, 1978). Il a été suggéré que de telles modifications affectent la perméabilité membranaire à l'eau et réduisent le flux biliaire (Kakis et al. 1980). D'autres études subséquentes ont démontré que l'acide lithocholique est incorporé dans la membrane, causant possiblement le dommage de la structure membranaire (Yousef et al. 1984). La membrane peut se réparer par incorporation de cholestérol, résultant d'un rapport cholestérol/phospholipide élevé et ainsi causant la rigidité de la membrane et réduisant sa perméabilité (Kakis et Yousef, 1978).

D'autres essais ont été expérimentés pour identifier la première étape dans l'initiation de la cholestase. Ces essais incluaient l'inhibition de la synthèse de cholestérol après avoir montré que le cholestérol nouvellement synthétisé faisait partie du cholestérol incorporé dans les canalicules. Ces expériences ne prévenaient que partiellement l'effet cholestatique de l'acide biliaire monohydroxylé (Yousef et al. 1988). Par ailleurs, certaines expériences in vitro ont montré que le transfert de cholestérol microsomal à la membrane canaliculaire ne requiert pas seulement l'acide lithocholique mais est aussi dépendant de la présence de protéines cytosoliques (Yousef et al. 1984). Un autre essai a été réalisé pour réduire le transport cellulaire de cholestérol à la membrane canaliculaire. Ainsi, le traitement préalable des rats avec le cycloheximide prévenait complètement la cholestase induite par le lithocholate (Yousef et Tuchweber, 1983) et le cytosol de foie obtenu des rats traités avec le cycloheximide empêchait la liaison de l'ALC aux protéines cytosoliques ou l'augmentation du transfert de cholestérol des microsomes aux canalicules.

Pour mettre en évidence le rôle de la protéine cytosolique dans la pathogénèse de la cholestase induite par l'ALC, il a été montré que les nouveaux-nés étaient résistants à l'effet cholestatique de l'ALC (Lewittes et al. 1984), mais cette résistance n'était pas reliée à un manque de capture, elle augmentait plutôt la biotransformation ou l'hydroxylation. Plus récemment, il a été montré qu'une grande partie de l'ALC se lie à un peptide de 48 KDa (Yousef et al. 1997). Il serait souhaitable qu'une étude soit orientée vers la compréhension de l'implication ce peptide dans la pathogénèse de la cholestase induite par le lithocholate et voir si cette liaison joue un rôle dans la pathogénèse cholestatique induite par d'autres acides biliaires monohydroxylés.

Une augmentation de la sécrétion d'acides biliaires hydroxylés a été observée durant la phase de rétablissement après la cholestase induite par l'ALC aussi bien que par la prévention de la cholestase suite à la co-ifusion de l'ALC avec d'autres acides biliaires hydroxylés (Kakis et Yousef, 1980). L'accumulation de l'ALC dans le foie avant l'hydroxylation peut activer d'autres voies de biotransformations telles que la glucuronidation, qui augmente l'effet cholestatique et possiblement par d'autres mécanismes tel que l'affectation du flux biliaire indépendant des sels biliaires (Ballatori, 1992; Bouchard et al. 1994).

Bien que ce modèle soit suggéré à partir des études utilisant principalement l'ALC comme acide biliaire monohydroxylé, mais des mécanismes similaires pouvant s'appliquer à d'autres acides biliaires devraient être mentionnés, au moins aux stades d'initiation. Le degré de changement dans la structure membranaire pourrait être différent dépendamment du degré et du type de liaison de l'acide biliaire à la membrane. Il est important aussi de mentionner que, bien que la liaison de l'acide taurocholique ne soit pas détectée in vivo durant la cholestase, l'augmentation en contenu en cholestérol dans la membrane canaliculaire était évidente (Kakis et Yousef, 1978).

Il reste à démontrer que d'autres acides biliaires monohydroxylés agissent de manière similaire. Ce modèle, cependant, n'expliquerait pas les autres effets pour les acides biliaires monohydroxylés qui peuvent s'avérer cholestatiques, par exemple leur influence sur le

flux biliaire indépendant des sels biliaires, sur les microfilaments canaliculaires (Tuchweber et al., 1990), sur les changements dans la perméabilité de la jonction serrée (Ballatori et Truong, 1990; Thibault et al. 1993) et dans l'homéostasie du calcium cellulaire aussi bien que dans la précipitation dans les canalicules.

4. CHOLÉRÈSE

4.1 Effet de l'acide ursodéoxycholique (AUDC) sur la cholestase

L'AUDC sous forme non conjuguée possède la propriété d'induire une cholérèse plus importante que celle attendue en fonction de son taux de sécrétion dans la bile, lorsqu'il est infusé chez le rat (Dumont et al. 1980). Cependant, cet effet peut être aboli par la conjugaison à la glycine ou à la taurine (Erlinger, 1990). Cette hypercholérèse a été associée à une hypersécrétion de bicarbonate. Le mécanisme de cette hypercholérèse n'est pas encore élucidé à ce jour. Deux théories ont été proposées. La première fait intervenir un mécanisme d'échange Na^+/H^+ stimulé par l'AUDC qui induit une sécrétion de bicarbonate dans le canalicule biliaire par l'hépatocyte (Dumont et al., 1980; Renner et al. 1989). Cependant, certaines évidences expérimentales n'appuient pas ce mécanisme proposé selon lequel l'échangeur Na^+/H^+ membranaire est activé par AUDC (Anwer et al. 1989). Selon ces mêmes auteurs, l'hypercholérèse riche en bicarbonate n'est pas associée à un accroissement de l'efflux biliaire en H^+ dans le foie perfusé isolé ni à une diminution du pH cytosolique dans les hépatocytes isolés. La seconde fait intervenir une sécrétion de l'AUDC dans le canalicule biliaire par l'hépatocyte en partie sous forme conjuguée suivie d'une transformation sous forme protonée dans la lumière biliaire. Cette hypothèse s'appelle shunt choléhépatique. La

forme protonée de l'AUDC est liposoluble; elle subirait une réabsorption au niveau de l'épithélium biliaire vers les plexus vasculaires péri-biliaires et retournerait au foie pour être excrétée à nouveau dans la bile. La dissociation d'un acide carbonique fournit un proton pour générer à chaque cycle un ion bicarbonate. Une cholérèse par l'effet osmotique de l'ion bicarbonate est induite, tandis que l'acide ursodéoxycholique n'apparaît pas dans la bile (Yoon et al. 1986). L'acide ursodéoxycholique protoné serait réabsorbé par l'épithélium biliaire de manière passive non ionique, sans être stimulé par un transporteur acidobasique avant d'être sécrété à nouveau par l'hépatocyte dans le canalicule (Strazzabosco et al. 1994).

L'AUDC semble avoir une action bénéfique sur les lésions des cellules biliaires induites par la cholestase, outre son effet sur les hépatocytes. La diminution de l'activité sérique de l'enzyme gamma-glutamyl transférase (GGT) chez des sujets traités par l'AUDC serait une preuve évidente de cet effet. De plus, lorsque l'AUDC est administré par voie intraveineuse à des rats portant une fistule biliaire, une amélioration de la cholestase induite par d'autres acides biliaires toxiques, a été observée (Scholmerich et al. 1990; Heuman et al. 1991). Cette observation est appuyée par l'augmentation de l'excrétion canaliculaire des acides biliaires toxiques, responsables de la cholestase expérimentale (Heuman et al. 1991; Loria et al. 1994).

L'utilisation des techniques d'immunomarquage enzymatique par des anticorps anti-acide ursodéoxycholique a permis de démontrer que l'AUDC subissait une réabsorption au niveau du pôle apical des cellules épithéliales biliaires (Lamri et al. 1992). En dépit de la

démonstration de cette hypercholérèse chez l'animal, il reste toutefois à prouver chez l'homme son existence et son effet bénéfique au point de vue physiopathologique (Knyrim, 1989). Dans la mucoviscidose, le mode d'action de l'AUDC est possiblement associée à sa capacité d'augmenter l'excrétion biliaire par l'hypercholérèse et aurait un effet sur la viscosité du mucus intracanaliculaire selon certains auteurs (Colombo et al. 1992). Il a été suggéré que dans cette situation, des doses thérapeutiques de l'AUDC plus élevées sont requises afin d'atteindre l'effet désiré (Cotting et al. 1990; Setchell et al. 1994).

En effet, il a été démontré que l'AUDC augmente la synthèse hépatique des acides biliaires primaires chez des sujets atteints d'une lithiase vésiculaire (Frenkiel et al. 1986) et la conversion du cholestérol en acides biliaires chez ceux atteints d'une cholestase chronique (Beuers et al. 1992; Rudolph et al. 1993; Mazella et al. 1993). L'inhibition de l'excrétion des acides biliaires endogènes dans la bile par l'AUDC n'a pas été observée; mais lors d'un traitement par l'AUDC, aucune augmentation de la concentration plasmatique de ces acides biliaires n'a été rapportée (Crosignani et al. 1991). En outre, il a été démontré que l'administration de l'AUDC a permis d'améliorer la diminution d'excrétion des acides biliaires dans la bile (Jazrawi et al. 1994).

Par ailleurs, à cause d'une augmentation de l'extraction hépatique et d'une biotransformation colique moindre, les conjugués à la taurine de l'AUDC permettent une diminution de la proportion d'acides biliaires hydrophobes contenus dans le pool (Rodrigues et al. 1995). Donc, il a été suggéré que la structure chimique joue un rôle important dans la

sécrétion des acides biliaires dans la bile (Poupon et al. 1988). Cependant, le mécanisme impliqué dans l'augmentation de cette excrétion induite par l'AUDC reste à élucider. En effet, plusieurs mécanismes tels que l'inhibition de l'absorption iléale des acides biliaires, les effets cytoprotecteur et immunitaire ont été suggérés pour expliquer les effets bénéfiques de l'AUDC dans la prévention de la cholestase.

Selon le premier mécanisme, il a été rapporté dans les affections cholestatiques que le transport actif iléal est augmenté en cas de diminution de la concentration des acides biliaires dans la lumière intestinale; tandis que ce transport est diminué en cas d'augmentation de la concentration intraluminaire, comme lors d'un traitement par l'AUDC (Lillienau et al. 1993). En outre, lors d'une cholestase récurrente bénigne, affection qui serait associée à une baisse du pool des acides biliaires (Bijleveld et al. 1989), certains auteurs suggèrent que l'enrichissement du pool par l'administration de l'AUDC ne semble pas être efficace pour prévenir les épisodes ictériques à lui seul (Crosignani et al. 1991). Ainsi, lorsqu'un malade atteint d'une affection cholestatique est traité par l'AUDC, les variations des concentrations sériques des acides biliaires endogènes ne semblent pas être les seuls bénéfiques.

En ce qui concerne le deuxième mécanisme faisant intervenir la notion de cytoprotection de l'AUDC, c'est un mécanisme de protection membranaire qui reste inexplicé. Selon Gldtuna et al. (1993), il pourrait dépendre de la capacité des conjugués de l'AUDC à changer la structure et la polarité de la membrane cellulaire. Cependant, dans un modèle expérimental de cholestase induite par le 17 α -thinyl-oestradiol, l'effet de protection

de l'AUDC nonconjugué administré per os ne paraissait pas être associé à des changements de la composition ni de la fluidité membranaire de l'hépatocyte et était indépendant du flux biliaire (Bouchard et al. 1993). Selon ces mêmes auteurs, dans ce modèle, la forme nonconjuguée de l'AUDC offre une meilleure prévention de la cholestase que la forme conjuguée. Ils suggèrent que cet effet de protection pourrait s'expliquer par des mécanismes qui interviennent avant la conjugaison au foie. D'autres études ont démontré que l'AUDC rétablit mieux que ses conjugués la perméabilité de la membrane mitochondriale, inhibée par l'action toxique de l'acide glycochénoxycholique (Botla et al. 1995).

En outre, l'AUDC assure une meilleure protection que ses conjugués à la membrane mitochondriale contre la toxicité portant sur le métabolisme oxydatif mitochondrial, de façon dose-dépendante (Krahenbuhl et al. 1994). Plusieurs autres études ont permis de mettre en évidence les effets cytoprotecteurs de l'AUDC. Il a été démontré que l'AUDC peut protéger de la toxicité et réduire l'hémolyse induites par les acides biliaires hydrophobes, prévenir la rupture de la membrane canaliculaire lors des affectations cholestatiques et les lésions des hépatocytes causées par l'ACDC (Kanai et al. 1983; Scholmerich et al. 1984; Tanikawa et al. 1986; Galle et al. 1990; Heuman et al. 1991). D'autres chercheurs ont utilisé des substances hydrophobes comme la cyclosporine (Queneau et al. 1993) ou l'éthinylestradiol (Utili et al. 1990; Bouchard et al. 1993) pour démontrer l'effet protecteur de l'AUDC contre la toxicité de ces molécules. La capacité de l'AUDC à éliminer les molécules hydrophobes pourrait expliquer ses effets sur les cholestases induites par les médicaments telle que celle causée par l'amiodarone (Reshef et al. 1994).

Il a été démontré que l'AUDC peut exercer son effet cytoprotecteur en augmentant le calcium intracellulaire de façon dose-dépendante (Bouscarel et al. 1993) compte tenu de l'altération de la mobilisation transmembranaire du calcium extracellulaire durant la cholestase (Beuers et al. 1993). Ainsi, une augmentation prolongée de la concentration de calcium cytoplasmique libre, impliqué dans la réactivation des mécanismes d'exocytose vésiculaire dépendants du calcium et responsables de la sécrétion des acides biliaires, peut expliquer l'effet préventif de l'AUDC dans les affections cholestatiques (Beuers et al. 1993). En effet, la mobilisation du calcium extracellulaire serait associée à une réponse caractérisée par sa longue durée (Beuers et al. 1993). Cependant, il est important de souligner que les acides lithocholique et tauroolithocholique peuvent aussi produire un relargage transitoire du calcium intracellulaire en le mobilisant à partir du réticulum endoplasmique et en agissant de façon sélective sur la perméabilité de la membrane microsomiale (Anwer et al. 1988; Combettes et al. 1988, 1989, 1990; Beuers et al. 1993).

L'effet sur le système immunitaire constitue un troisième mécanisme important pour expliquer le caractère cytoprotecteur de l'AUDC. Il semble que l'effet protecteur de l'AUDC sur le système immunitaire n'intervient que dans le traitement des affections cholestatiques pour lesquelles un mécanisme immunitaire est requis au moins partiellement. Il peut s'agir de l'effet de l'AUDC sur l'expression des IgM dans la cirrhose biliaire primitive ou sur la modulation de l'expression du système HLA en cas de transplantation hépatique (Poupon et al. 1991; Friman et al. 1992). Les différents modes d'action de ce mécanisme ne seront pas détaillés ici, car ils n'entrent pas dans le cadre de ce projet.

4.2 Effet de l'acide cholique(AC) sur la cholestase

Chez le rat, il a été démontré que l'AC peut abolir la réponse cholestatique due aux effets toxiques des acides biliaires monohydroxylés comme l'ALC et son conjugué à la taurine lorsque ceux-ci sont co-infusés avec l'AC (Fisher et al. 1971; Miyai et al. 1974, 1975, 1977; Kakis et Yousef, 1978). Cependant, il n'y a pas de mécanisme adéquat pour expliquer cet effet protecteur. L'hypothèse prédominante et originale émise par certains auteurs est que l'effet protecteur de l'AC est dû à sa capacité d'augmenter le flux biliaire dépendant des sels biliaires (Preisig et al. 1962; Sperber, 1963; Boyer et Bloomer, 1974; Miyai et al. 1977). Cette hypothèse a été mise en doute par plusieurs chercheurs parce que l'induction de cholestase a précédé une réduction dans la sécrétion des sels biliaires suggérant qu'une réduction du flux biliaire dépendant des sels biliaires était secondaire à la lésion clé cholestatique (Layden et Boyer, 1977; Boyer et al. 1977).

Compte tenu de l'effet biologique et les caractéristiques de l'AC, divers autres mécanismes sont possibles et ont été examinés. Il a été rapporté que les acides biliaires cholérétiques modifient la sécrétion biliaire non seulement par leurs effets osmotiques mais aussi en modifiant les lipides et les enzymes dans la membrane plasmique des cellules du foie (Nemchausky et al. 1977). (1978). En outre, Kakis et Yousef (1978) ont rapporté que le lithocholate cause une cholestase en altérant la composition, principalement en contenu de cholestérol, de la membrane plasmique cellulaire du foie (LCPM) et de la membrane canaliculaire biliaire (BCM).

Lors d'une autre étude, l'importance d'infuser au moins un rapport molaire 1:1 des acides biliaires, formant des micelles avec le lithocholate afin de renverser l'effet cholestatique chez les rats, a été suggérée (Javitt et Emerman, 1968). Une explication possible de la nécessité de ce rapport pourrait être que la molécule de lithocholate soit incorporée dans un complexe avec l'acide biliaire cholérétique et ainsi son effet toxique sur la membrane canaliculaire biliaire (BMC) soit masqué. Cette hypothèse a été proposée par Miyai et al. (1977) et appuyée par Layden et Boyer (1977). Pour le premier groupe, l'évidence de cette hypothèse dérivait de la comparaison entre l'effet d'un agent qui forme des micelles ou non sur le flux biliaire et sur la morphologie du foie; alors que Layden et Boyer étudiaient les paramètres sur les changements de la perméabilité de l'arbre biliaire. Il a été suggéré par ces derniers que les changements de la perméabilité biliaire pourraient être reliés aux changements morphologiques au niveau du canalicule. C'est aussi possible que les acides biliaires cholérétiques réduisent la capture de l'acide lithocholique et ainsi réduisent son potentiel cholestatique.

4.3 Effet de l'acide cholique sulfaté (AC-S) sur la cholestase

Il a été démontré que l'AC-S comme son analogue nonsulfaté a un effet non cholestatique lorsqu'il est infusé aux rats à certaines doses. Lors d'une étude réalisée sur la sulfatation des acides biliaires, le potentiel cholérétique de l'AC-S était plus élevé que son analogue nonsulfaté et une augmentation du flux biliaire indépendant des sels biliaires a été aussi observée (Yousef et al. 1987). Cependant, des études effectuées sur la solubilité des acides biliaires polyhydroxylés sulfatés et leur interaction avec le cholestérol et les phospholipides ont révélé que ces esters d'acides biliaires sont solubles sous leur formes libres

et ont une concentration micellaire critique plus élevée que leurs analogues nonsulfatés (Yousef, 1987). Ainsi, ils ne solubilisent ni le cholestérol ni les phospholipides, ce qui suggère que la sulfatation abolit les propriétés détergentes des acides biliaires. En outre, il a été suggéré que la réduction de la sécrétion biliaire de phospholipide et de cholestérol est associée à la sécrétion d'acides biliaires endogènes et serait en accord avec les propriétés physicochimiques des acides biliaires sulfatés (Yousef et al. 1987). En effet, l'une des actions préventives de l'AC-S sur la cholestase peut être due à sa capacité d'augmenter le flux biliaire via un haut potentiel cholérétique et de stimuler le flux biliaire indépendant des acides biliaires.

4.4 Effet de l'acide hyodéoxycholique (AHDC) sur la cholestase

Selon certains auteurs, l'AHDC est un acide biliaire hydrophilique faisant partie des acides biliaires démontrant une activité hypercholérétique probablement due à ses propriétés physicochimiques (Khan et O'Maille, 1987). Cependant, Des études réalisées chez des hamsters ont démontré que l'AHDC induisait un changement complet dans la composition des lipides biliaires. Le cholestérol biliaire était significativement augmenté après le traitement des animaux à l'AHDC. Les mêmes effets étaient observés au moins chez les hamsters recevant une diète avec un supplément d'AHDC (Khan et O'Maille, 1987). Selon ces mêmes auteurs, malgré l'augmentation considérable du cholestérol biliaire, l'acide hyodéoxycholique pouvait prévenir la cholelithiase chez les hamsters. Dans une récente étude in vitro, il a été rapporté que l'hydrophobicité des sels biliaires joue un rôle déterminant dans la formation cristalline du cholestérol (Cohen-Solal, 1995). Apparemment, les acides biliaires

hydrophiliques ont une faible capacité à transformer des vésicules cholestérol/phospholipides en micelles. Ainsi, ils ne produisent pas, comme les acides biliaires hydrophobes, une augmentation du rapport cholestérol/phospholipide en extrayant préférentiellement les phospholipides des vésicules. En effet, les hamsters traités avec l'acide hyodéoxycholique démontraient une grande proportion de 67% de cet acide biliaire hydrophilique qui n'existe qu'à l'état de trace chez les animaux non traités (Khan et O'Maille, 1987). Ceci conduit à un remplacement des acides biliaires hydrophobes par ceux hydrophiliques, ce qui explique la prévention d'un effet lithogénique.

Par ailleurs, les effets d'administration de l'AHDC sur l'emmagasinage et la biosynthèse du cholestérol hépatique étaient aussi marqués. L'AHDC induisait une diminution de la concentration d'ester de cholestérol hépatique et une augmentation de l'activité HMGCoA réductase (Khan et O'Maille, 1987). Ces fortes perturbations suggèrent un besoin en cholestérol considérable par l'hépatocyte et l'induction de mécanismes capables de restaurer une concentration de cholestérol physiologique. Apparemment, le récepteur LDL n'est pas associé à un tel mécanisme compensatoire, comme chez les humains, probablement à cause d'un niveau de LDL typiquement plus bas chez les hamsters (Cohen-Solal et al. 1995).

Objectif

Plusieurs études ont démontré que l'acide lithocholique peut induire une cholestase à faible dose, tandis que l'acide cholique sulfaté, par son effet cholérétique, augmente le flux biliaire lorsqu'il est infusé seul à la même dose chez le rat. Le but de ce projet consiste à vérifier si la sulfatation de l'acide cholique peut jouer un rôle protecteur et prévenir la cholestase induite par l'acide lithocholique en donnant une co-infusion de ces deux produits. Pour vérifier cette hypothèse, des expériences in vivo seront effectuées sur plusieurs groupes de rats. Ils seront traités avec différents acides biliaires, comparés entre eux et ensuite à groupe contrôle recevant l'albumine. La proportion de la dose infusée à chaque rat sera la même pour tous les produits. L'effet de cette co-infusion sur la sécrétion des sels biliaires sera évalué par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Le dosage des lipides biliaires (phospholipides, cholestérol) sera réalisé par spectrophotométrie.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. Préparation d'acide biliaire sulfaté

L'ester sulfaté d'acide biliaire était préparé en mélangeant l'acide biliaire avec un excès de sulfure trioxyde triméthylamine et le tout a été dissout dans un mélange de benzène, de pyrimidine et d'acide acétique (10:1:1, vol/vol/vol). La concentration finale du sulfure trioxyde triméthylamine était de 7% (wt/vol). Le mélange a été chauffé et agité à l'aide d'un barreau magnétique pendant 3 heures puis refroidi à la température de la pièce. L'excès de sulfure trioxyde triméthylamine a été enlevé par l'addition d'un volume égal de 0,5 NaOH dans du méthanol. La solution a été mélangée pendant 10 minutes et conservée dans une chambre froide pendant toute la nuit. Le lendemain, elle a été filtrée sous vide, un volume de diéthyl éther froid en excès a été ajouté au filtrat. Ce mélange a été gardé dans la chambre froide pour laisser précipiter l'acide biliaire. Une fois la solution devenue claire et le surnageant enlevé, l'éther a été évaporé sous N₂. Le culot séché a été resuspendu dans une solution de NaOH-méthanol pour éliminer tout excès de sulfure trioxyde soit par centrifugation ou par filtration. Un volume de diéthyl éther froid en excès a été ajouté au filtrat pour précipiter les cristaux et le surnageant a été éliminé. Le culot a été lavé deux fois avec de l'éther froid. Après une heure d'attente, le surnageant a été enlevé et le culot a été séché sous N₂ pour éliminer l'éther. Le culot séché a été resuspendu dans l'eau distillée, congelé ensuite dans la glace sèche pour être lyophilisé. La pureté du produit a été vérifiée par chromatographie sur couche mince (TLC), en utilisant un système de solvant butanol, acide acétique et eau (10:1:1,

vol/vol/vol). Pour développer la couleur de la plaque chromatographique, elle a été vaporisée par un réactif composé de 5g d'acide phosphomolybdique dissout dans 100ml d'acide acétique et 7,5ml d'acide sulfurique. Elle était ensuite placée dans un four à 100°C pendant 15 minutes pour être séchée. Une tache a été observée avec une mobilité chromatographique significativement moindre que le composé parental.

2. Model animal et procédure chirurgicale

Des rats Sprague-Dawley pesant 200-250 grammes (Charles River, Saint-Constant, Canada) étaient maintenus dans un environnement à température constante (22°C), libre accès aux nourritures et à l'eau avant l'expérimentation. Ils étaient anesthésiés avec du pentobarbital (48mg/Kg de poids corporel, par voie intrapéritonéale). Un cathéter No.50 de polyéthylène était inséré dans la veine jugulaire interne droite pour l'infusion des acides biliaires et le canal biliaire était canulé avec un cathéter No.10 de polyéthylène pour recueillir la bile. La température corporelle, mesurée avec un thermomètre rectal, était maintenue à 37°C au cours de l'expérience en utilisant une lampe contrôlée thermostatiquement. La longueur du cathéter était ajustée à 20 cm du point de canulation. La bile était recueillie pendant 90 minutes après canulation à des périodes successives de 30 minutes. Les animaux étaient infusés ensuite avec 2 ml de 3,5% d'albumine dans 0,9% NaCl sur une période de 10 minutes et la bile a été recueillie pendant 30 minutes dans des aliquots à des intervalles de 15 minutes pour évaluer le flux biliaire (BF) basal, les lipides biliaires (phospholipides et cholestérol) et l'excrétion des acides biliaires avant infusion des acides biliaires. Plusieurs groupes de rats ont été traités avec différents acides biliaires et ont tous été infusés à une même dose sauf les groupes traités avec l'acide cholique sulfaté

où deux doses différentes ont été utilisées. Sur un total de 12 groupes, celui traité avec l'albumine était le groupe contrôle et chacun des 11 autres groupes a été traité avec une dose d'acide biliaire de 12 μ moles/100g de poids corporel pendant 10 minutes d'infusion sauf dans le cas de l'acide cholique sulfaté où une dose de 24 μ moles/100g de poids corporel a aussi été utilisée. Les acides biliaires utilisés sont les suivants: acide cholique (AC), acide lithocholique (ALC), acide ursodéoxycholique (AUDC), acide hyodéoxycholique (AHDC), acide cholique sulfaté (AC-S), AC + ALC, AUDC + ALC, AHDC + ALC, AC-S + ALC . Ces acides biliaires ont été infusés 30 minutes après l'infusion de l'albumine et la bile a été recueillie pendant 60 minutes à des intervalles de 15 minutes et pendant 120 minutes à des intervalles de 30 minutes.

3. Mesure du flux biliaire

Le flux biliaire était mesuré gravimétriquement, assumant une densité de 1g/ml.

4. Dosage des lipides biliaires

4.1 dosage de phospholipides

Les phospholipides étaient déterminés par la technique de Barlett (1959) après digestion avec l'acide perchlorique. Des tubes Kimax, rincés préalablement à l'eau distillée déionisée et séchés au four, ont été utilisés. Une fois les tubes refroidis, 8 d'entre eux ont été utilisés comme standards. La solution de standards était préparée de la façon suivante: 38 mg de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ étaient pesés avant d'être dissouts dans 100 ml H_2O et la solution a été gardée dans une bouteille brune au réfrigérateur. Les standards étaient préparés en duplicata et les tubes contenaient respectivement des solutions de 100 μ l, 50 μ l,

25 μ l et 0 μ l. Dans chacun des autres tubes, 10 μ l de bile de chaque échantillon y étaient déposés. Ensuite, 0,5 ml d'acide perchlorique a été ajouté à chacun des tubes. Tous les tubes étaient mélangés au vortex, coiffés d'une bille pour être placés ensuite dans un bac de sable chauffé à 160°C. Les tubes placés dans le bain sec y restaient pendant 3 heures ou plus jusqu'à l'obtention d'un liquide clair comme de l'eau. Après digestion complète, les tubes étaient refroidis. La digestion permet de libérer le phosphore inorganique. À chaque tube, ont été ajoutés 4,6 ml de Molybdate d'ammonium à 0,22% et 0,2 ml de réactif de Fiske et Subbarow. La solution de Molybdate d'ammonium était préparée de la façon suivante: 2,20 g de $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ étaient pesés et dissouts dans un litre d'eau bi-distillée. Pour la solution de Fiske et Subbarow, 1 g d'acide 1-amino-2-naphthol-4-sulfonique était dissout dans 6,3 ml H_2O . Tous les tubes ont été ensuite mélangés au vortex, coiffés d'une bille et plongés dans un bain marie bouillant à 100°C pendant 8. Les tubes étaient ensuite refroidis pendant 20 minutes et les solutions lues au spectrophotomètre à 800 nm dans un délai d'une heure, car la couleur est stable pour cette période.

4.2 Dosage de cholestérol

Le cholestérol était mesuré par la méthode de la cholestérol oxydase (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN, USA). Les échantillons de bile ont été décongelés, conservés sur la glace et mélangés ensuite au vortex. Dans des tubes de verre, ont été déposés 20 μ l de bile de chacun des échantillons. Les tubes ont été ensuite placés sous une lampe fluorescente pour la nuit. Le lendemain, une quantité nécessaire de réactif de cholestérol (1 ml/échantillon) a été préparé en ajoutant 32 ml H_2O distillée déionisée dans chaque flacon de réactif. Le flacon contenant l'eau et le réactif a été mélangé pour obtenir

une solution utilisable après une période de 10 minutes. À d'autres tubes de verre propres préparés en duplicata, ont été ajoutés respectivement 20 μ l de chaque solution standard. Ensuite, dans chacun des tubes (échantillons et standards), a été déposé 1ml de réactif. Deux solutions blancs ont aussi été préparés avec le réactif seulement. Après avoir mélangé tous les tubes au vortex, ils étaient ensuite incubés dans un bain rempli d'eau chauffée à 37°C pendant 5 minutes. Les tubes étaient refroidis à la température de la pièce pendant 10 minutes et les solutions lues au spectrophotomètre dans un délai d'une heure.

5. Dosage des sels biliaires par GC/MS

Dans des tubes Kimax propres, ont été déposés 100 μ l de bile et 100 μ l de standard interne: 5 β -cholannique (1 ug/ μ l). A chacun des tubes, 5 ml d'éthanol-méthanol (95:5) ont été ajoutés pour faire précipiter les protéines. Les tubes ont été chauffés pendant 5 à 10 minutes à 80°C tout en les recouvrant de leurs bouchons sans les visser. Ils ont été ensuite bouchés complètement, équilibrés et centrifugés pendant 15 minutes à 4°C (3000 RPM). Suite à la centrifugation, les solutions d'éthanol sont transférées dans d'autres tubes pour être séchées sous N₂ à 60°-80°C.

5.1 Hydrolyse des acide biliaires

L'étape suivante consiste à hydrolyser les acides biliaires pour enlever les conjugués. A chacun des tubes séchés précédemment, 2 ml de NaOH 2,5N ont été ajoutés. Ils étaient ensuite bouchés et scellés avec du parafilm. Chaque tube a été mélangé au vortex avant d'être installé sur une plaque chauffante pour la nuit à 120°-130°C. Le lendemain matin, les tubes étaient refroidis dans la glace et 3 ml d'HCl 2,5N y étaient ajoutés. Après avoir

mélangé chaque solution au vortex, le pH de chaque échantillon a été ensuite vérifié pour voir s'il était inférieur ou égal à 1. A chacun des tubes contenant les échantillons, 5 ml de diéthyl éther ont été ajoutés et mélangés ensuite pendant 20 minutes sur une plaque agitatrice. La phase d'éther a été transvidée dans d'autres tubes pour être séchée sous N_2 à 60°-80°C. Une deuxième extraction a été effectuée avec 3 ml d'éther et ajoutée à la phase d'éther de la première extraction pour être ensuite séchée sous N_2 .

5.2 Formation de méthyl ester

A chacun des tubes, ont été ajoutés 1 ml de méthanol pur, 1 ml de 2,2 diméthoxypropane et 5 gouttes d'HCl. Les tubes étaient bouchés et refroidis ensuite à la température de la pièce pendant une heure. Dans chacun d'eux, ont été déposés 2 ml de diéthyl éther. Ils étaient ensuite mélangés au vortex et séchés sous N_2 .

5.3 Formation d'acétate méthyl ester

Une solution d'acétylation a été préparée de la façon suivante: 7 ml d'acide acétique cristallisable + 5 ml acide acétique anhydre + 5 gouttes d'acide perchlorique (60-72%). À l'extrait méthylé contenu dans chacun des tubes, a été ajouté 0,5 ml de la solution d'acétylation. Les tubes étaient ensuite bouchés, mélangés au vortex, refroidis à la température de la pièce pendant 1 heure et ensuite placés sur la glace. À chacun des tubes, ont été ajoutés 5 ml d'eau et 5 ml d'éther. Ils étaient ensuite déposés sur un plaque agitatrice pendant 20 minutes. La phase supérieure d'éther de chacun des tubes a été prélevée, transférée dans d'autres tubes et séchée sous N_2 . Une deuxième extraction a été effectuée avec 3 ml d'éther et ajoutée à la phase d'éther de la première extraction pour

être ensuite séchée sous N_2 à 60°-80°C. L'extrait sec a été resuspendu dans 200 μ l de chloroforme et la solution est prête à analyser au GC/MS. Avant d'injecter les échantillons au GC/MS, une solution standard contenant les différents sels biliaires à analyser, dans une proportion égale, a subi les mêmes traitements que les échantillons. Ces échantillons sont injectés dans un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 5890 muni d'un détecteur à ionisation de flamme, d'une colonne capillaire de 0.22 mm de diamètre intérieur et relié à un détecteur sélectif de masse Hewlett-Packard 5971A. Le GC/MS a permis de séparer les sels biliaires, de les identifier et de les quantifier.

6. Préparation de standards de sels biliaires

Environ 10 mg de chacun des sels biliaires standards ont été pesés dans des vials propres. La quantité pesée a été ensuite dissoute dans une même quantité de volume de méthanol en ml. La concentration finale de sel biliaire était donc de 1 μ g/ μ l. Ces sels de sodium d'acides biliaires suivants: 5 β -cholanique, ALC. Na⁺ (Lithocholate), ADOC. Na⁺ (Déoxycholate), ACDC. Na⁺ (Chénodéoxycholate), AC. Na⁺(Cholate), AUDC. Na⁺ (Ursodéoxycholate) et AHDC. Na⁺ (Hyodéoxycholate) utilisés comme standards provenaient de Calbiochem (La Jolla, Calif.). Leur pureté était absolue. Aucune contamination n'était détectée par chromatographie sur couche mince ou par chromatographie en phase gazeuse lors de l'analyse des échantillons.

7. Statistiques

Une analyse par régression linéaire et un test d'anova ont été utilisés pour déterminer les différences entre les groupes. Les résultats obtenus étaient considérés significatifs à $p < 0.05$.

RÉSULTATS

Effet des sels biliaires sur le flux biliaire

L'infusion de l'albumine n'affectait pas le flux biliaire pendant les 150 premières minutes, mais une diminution du flux a été observée durant les 60 dernières minutes (Fig5. A). L'ALC réduisait jusqu'à un maximum de 50% le flux biliaire 60 minutes après l'infusion de 12 μ moles/100g de poids corporel, mais l'écoulement de la bile revient à la normale dans les 150 dernières minutes (Fig6. A). L'AUDC, l'AC et l'AC-S augmentaient le flux biliaire 60 minutes après leur infusion, tandis que l'AHDC l'augmentait seulement pendant les 30 premières minutes après son infusion (Fig5. B, C, D, E et F). La co-infusion de l'AUDC, l'AC et l'AHDC avec l'ALC, à des doses égales, prévenaient la cholestase induite par ce dernier (Fig6. D, E et F). Cependant, la co-infusion de l'AC-S avec l'ALC, à une dose égale ou au double de la dose de l'ALC, ne prévenait pas l'effet cholestatique de ce dernier (Fig6. B et C).

Effet des acides biliaires sur la sécrétion des phospholipides

L'infusion de l'albumine n'affectait pas la sécrétion des phospholipides pendant les 60 premières (Fig7. A). L'ALC réduisait jusqu'à un maximum de 60% la sécrétion des phospholipides 60 minutes après son infusion (Fig8. A). L'AUDC, l'AC et l'AHDC augmentaient de façon significative la sécrétion des phospholipides 30 minutes après leur infusion (Fig7. D, E et F). L'AC-S diminuait de 24 à 34 % la sécrétion des

phospholipides 30-45 minutes après son infusion (Fig7. B et C). La co-infusion de l'AUDC, l'AC et l'AHDC avec l'ALC, à des doses égales, prévenaient la réduction de la sécrétion des phospholipides induite par ce dernier en cas de cholestase 15-60 minutes après son infusion (Fig8. D, E et F). L'AC-S, co-infusé avec l'ALC, à une dose égale ou au double de la dose de l'ALC, ne prévenait pas la réduction de la sécrétion des phospholipides induite par l'infusion de ce dernier (Fig8. B et C).

Effet des acides biliaires sur la sécrétion du cholestérol

L'albumine n'affectait pas la sécrétion de cholestérol pendant 90 minutes après son infusion (Fig9. A). L'ALC réduisait de 40% la sécrétion de cholestérol 30-60 minutes après son infusion (Fig10. A). L'AUDC n'affectait pas la sécrétion de cholestérol 15-45 minutes après son infusion, tandis que l'AC et l'AHDC l'augmentaient pour ces mêmes périodes (Fig9. D, E et F). L'AC-S réduisait d'environ 40% la sécrétion de cholestérol 15-30 minutes après son infusion (Fig9. B et C). La co-infusion de l'AUDC, l'AC et l'AHDC avec l'ALC, à des doses égales, prévenaient la réduction de la sécrétion de cholestérol induite par ce dernier en cas de cholestase 15-60 minutes après son infusion (Fig10. D, E et F). L'AC-S, co-infusé avec l'ALC, à une dose égale ou au double de la dose de l'ALC, réduisait d'environ 60% la sécrétion de cholestérol 30-60 minutes après la co-infusion (Fig10. B et C).

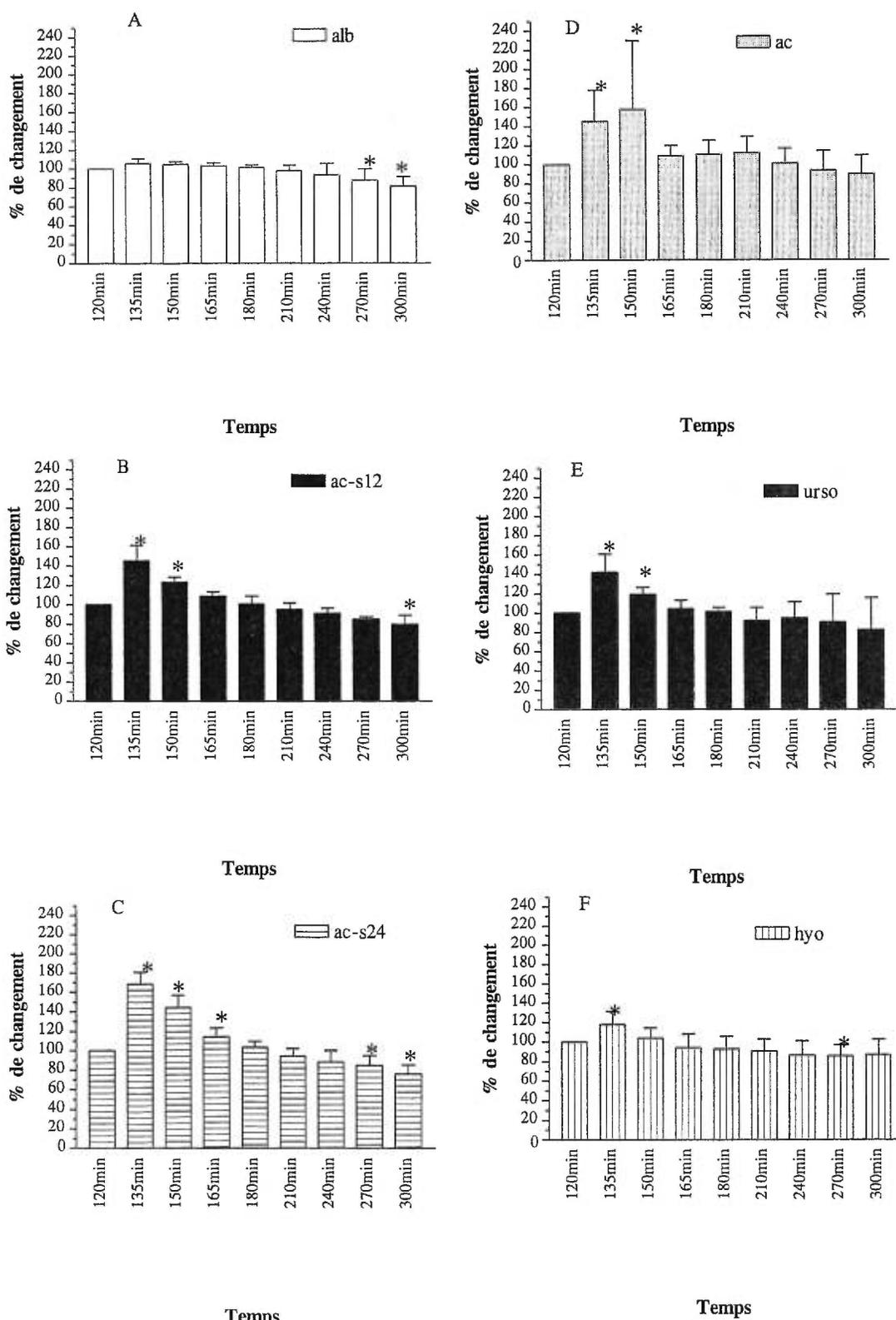


Fig.5 Effet de l'infusion de: Albumine, AC, AC-S12, AC-24, AUDC et AHDC sur le flux biliaire chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types du pourcentage de variation du flux biliaire après infusion des acides biliaires par rapport au contrôle (albumine) 120minutes.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle ($P < 0.05$).

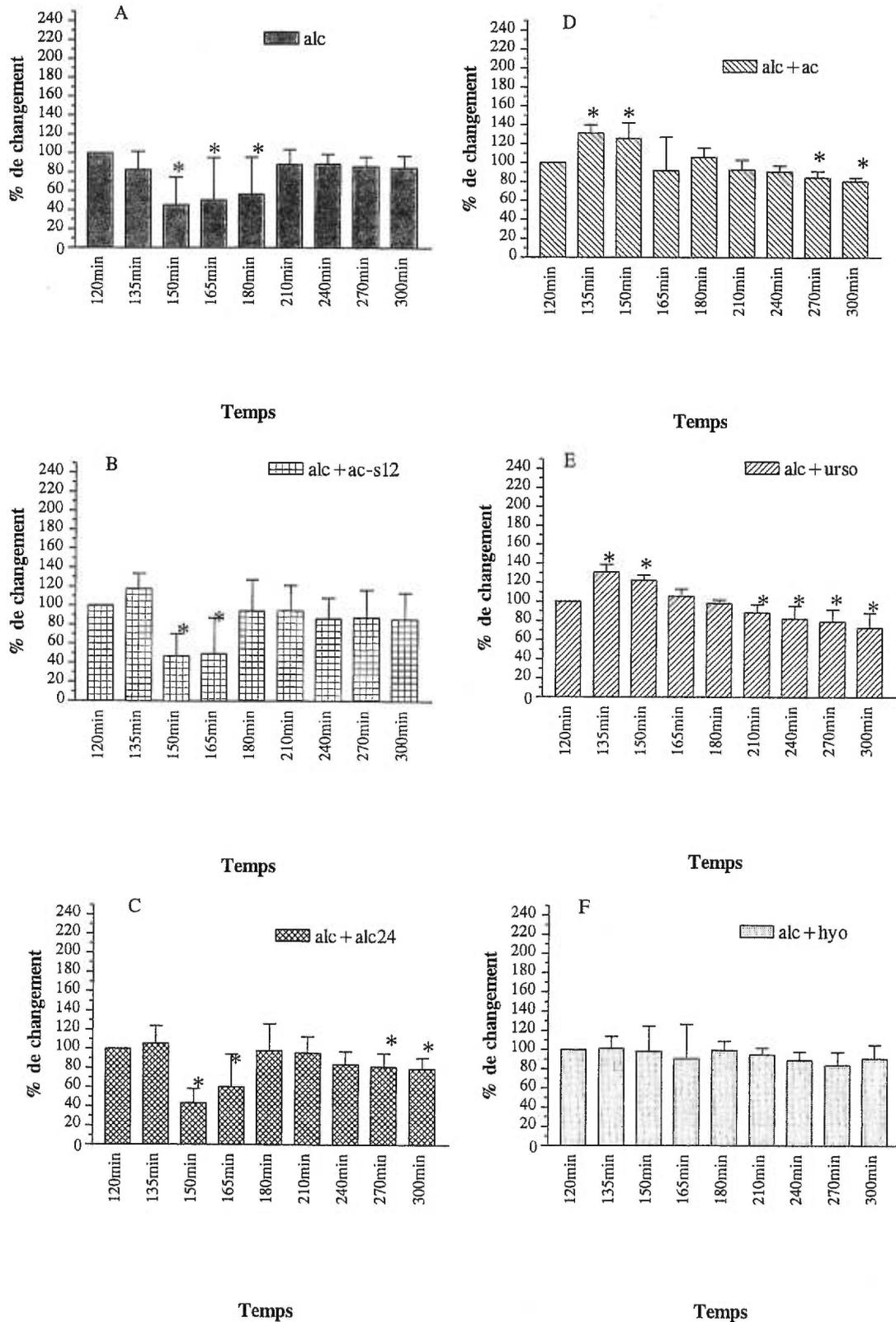


Fig.6 Effet de l'nfusion de: ALC, AC + ALC, AUDC + ALC, AHDC + ALC, AC-S12 + ALC et AC-S24 + ALC sur le flux biliaire chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types du pourcentage de variation du flux après infusion des acides biliaries par rapport au contrôle (albumine) 120 minutes.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle ($P < 0.05$).

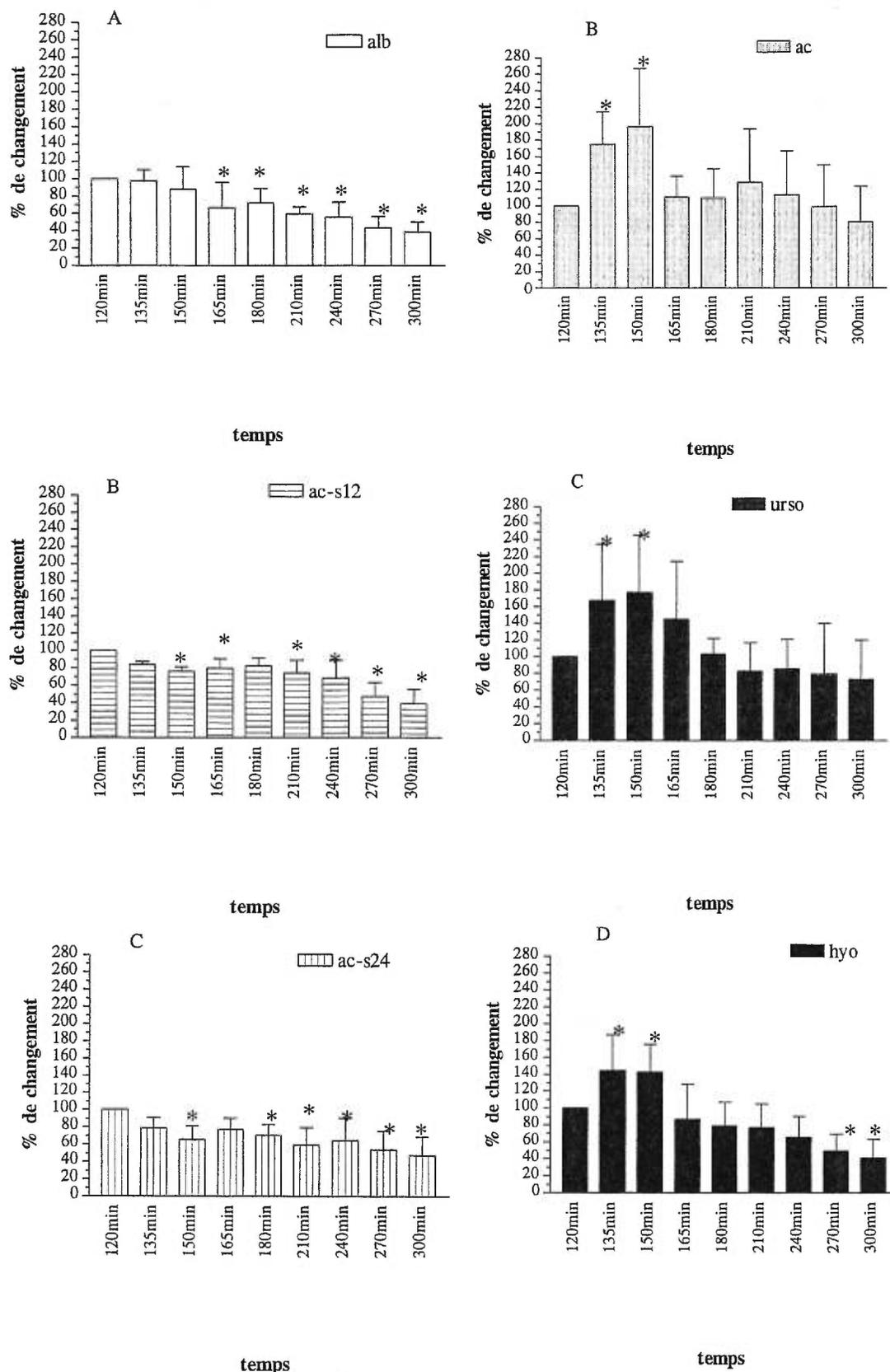


Fig.7 Effet de l'infusion de: Albumine, AC, AC-S 12, AC-S 24, AUDC et AHDC sur la sécrétion de phospholipides chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types du pourcentage de variation de phospholipides après infusion des acides biliaires par rapport au contrôle (albumine) 120 minutes.

Valeurs significativement différentes de celles du contrôle ($P < 0.05$).

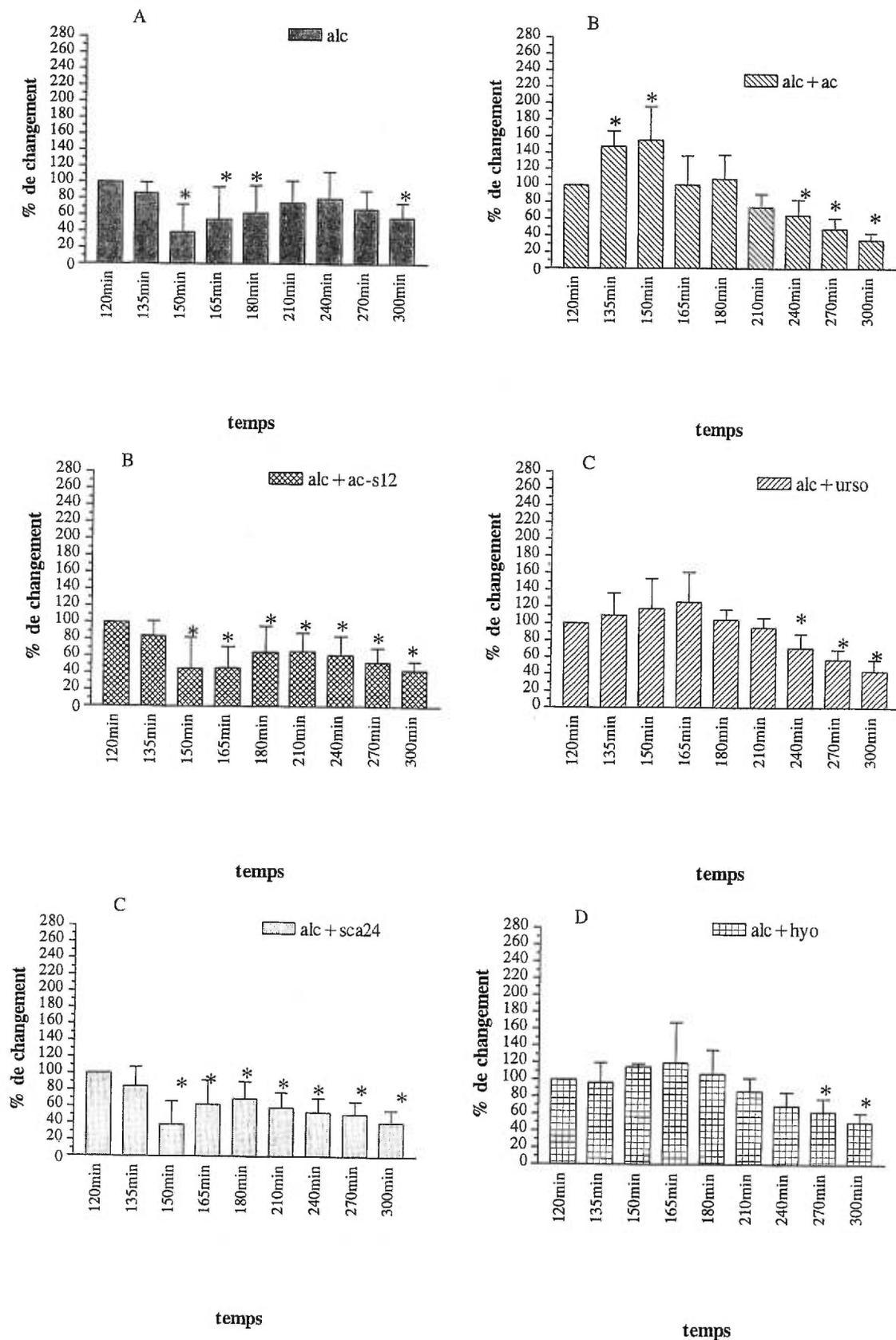


Fig.8 Effet de l'infusion de: ALC, AC + ALC, AUDC + ALC, AHDC + ALC, AC-S12 + ALC et AC-S24 + ALC sur la sécrétion de phospholipides chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types du pourcentage de variation de phospholipides après infusion des acides biliaires par rapport au contrôle (albumine) 120 minutes.

*valeurs significativement différentes de celles du contrôle ($P < 0.05$).

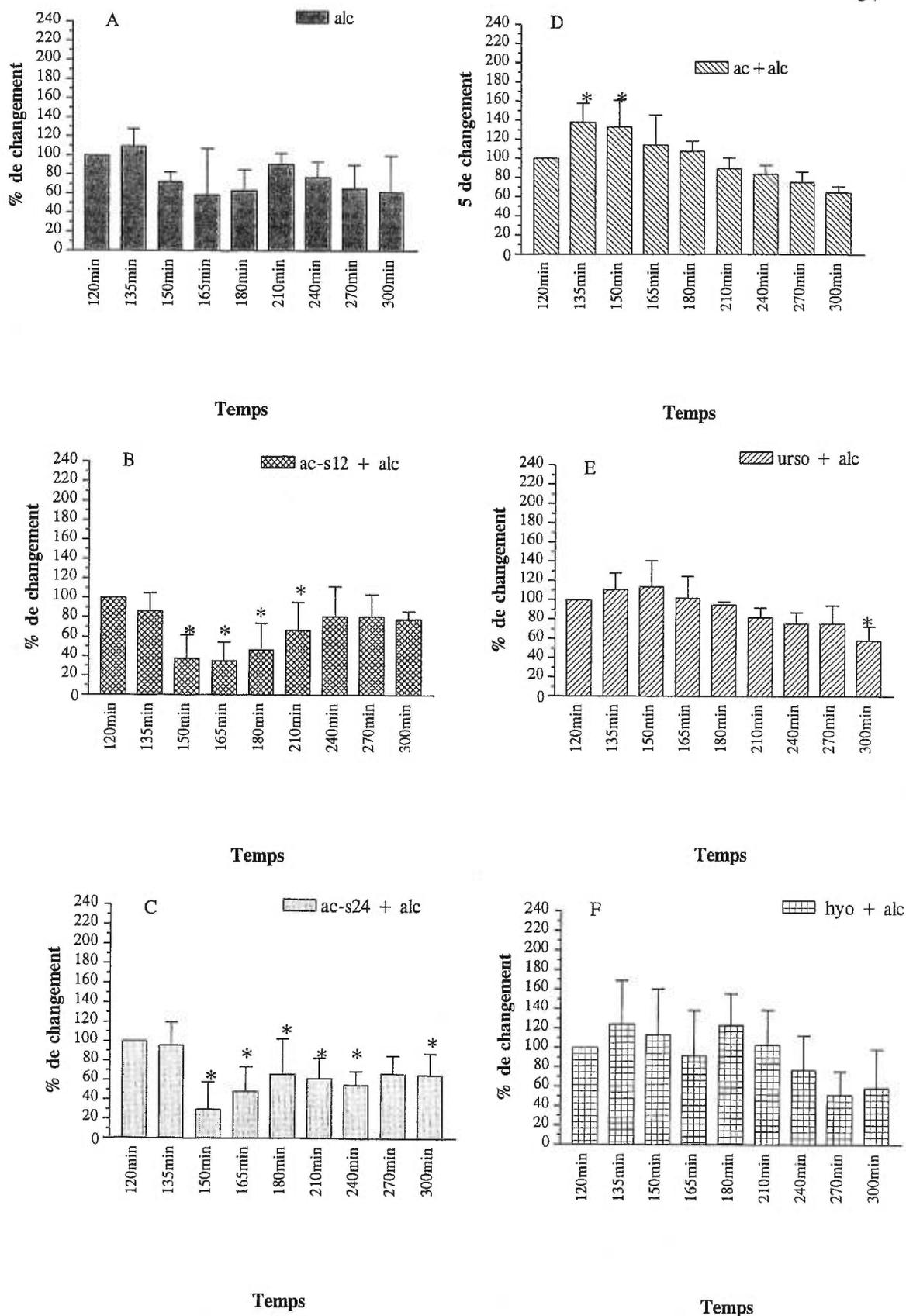


Fig.10 Effet de l'infusion de: ALC, AC + ALC, AC-S12 + ALC, AC-S24 + ALC, AUCD + ALC et AHDC + ALC sur la sécrétion de cholestérol chez le rat.

Ces valeurs représentent le pourcentage de variation de cholestérol après infusion des acides biliaires par rapport au contrôle (albumine) 120 minutes.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle ($P < 0.05$).

Effet de l'albumine sur la sécrétion des acides biliaires

L'excrétion de l'ALC est absente après l'infusion de l'albumine (Fig11). L'albumine n'affectait pas la sécrétion de l'acide déoxycholique (ADOC) (Fig11. B, C, D, E et F). La sécrétion de l'acide chénodéoxycholique (ACDC) augmentait seulement 30 minutes après infusion de l'albumine (Fig11. B) et diminue par la suite. La sécrétion de l'acide cholique n'augmentait pas significativement 30 minutes après infusion de l'albumine et diminue ensuite (Fig11. B). L'albumine n'affectait pas de façon significative la sécrétion des acides hyodéoxycholique (AHDC) et ursodéoxycholique (AUDC) (Fig11. B, C, D, E et F). Une diminution de la sécrétion de l'acide muricholique a été observée 60-180 minutes après infusion de l'albumine (Fig11. C, D, E et F).

Effet de l'acide cholique (AC) sur la sécrétion des acides biliaires

Il n'y a pas de sécrétion de l'ALC après infusion de l'AC (Fig12). L'infusion de l'AC n'affectait pas la sécrétion de l'ADOC et celle de l'ACDC (Fig12. C, D, E et F), mais la sécrétion de l'AC a été augmentée 30 minutes après son infusion (Fig12. C) suivie d'une diminution. Elle n'affectait ni la sécrétion de l'AUDC ni celle de l'AHDC (Fig12. C, D, E et F). La sécrétion de l'acide muricholique a été diminuée seulement 120 minutes après infusion de l'AC (Fig12. E)

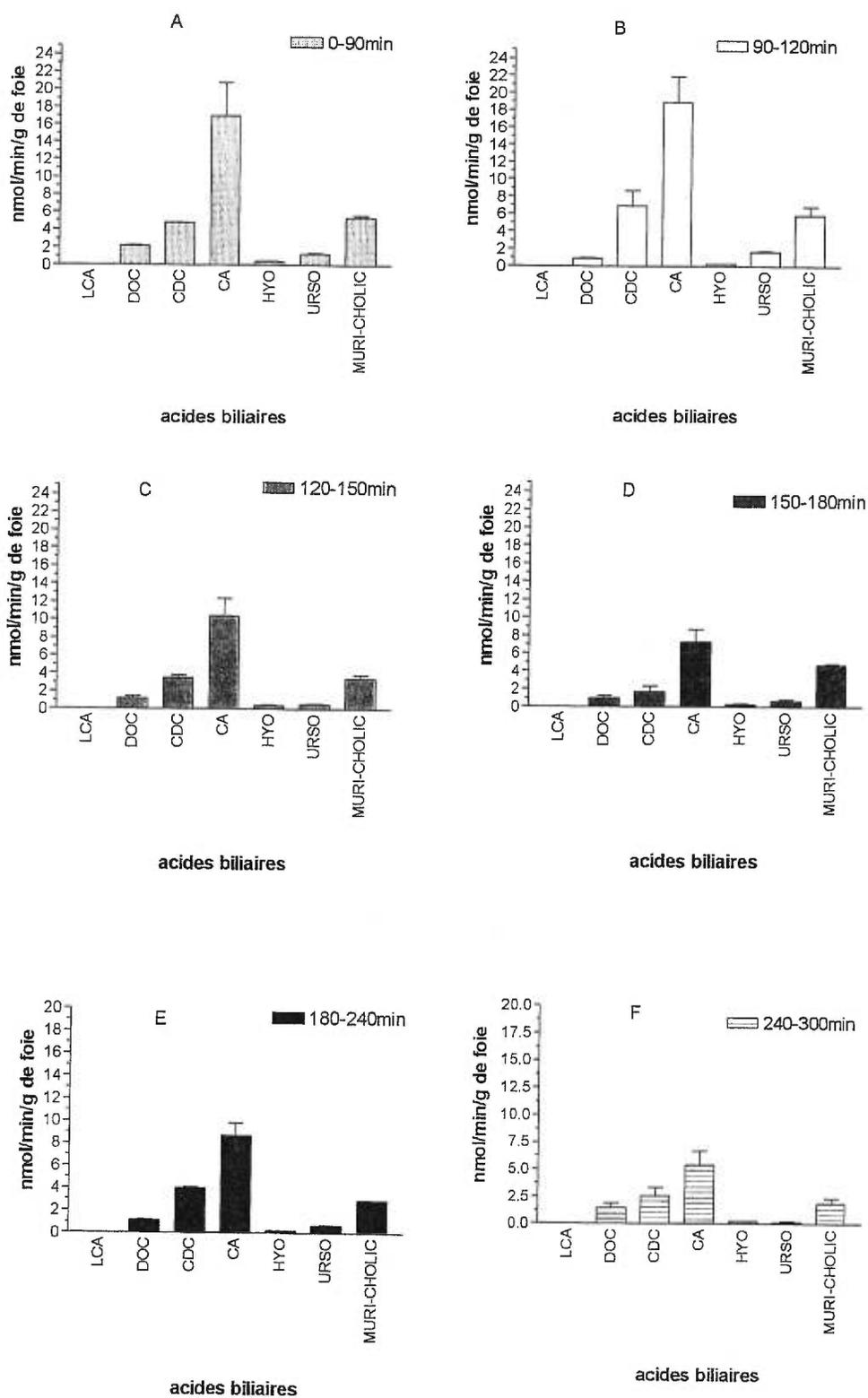


Fig.11 Effet de l'infusion de l'albumine sur la sécrétion des acides biliaires chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de sécrétion d'acides biliaires après infusion d'albumine.

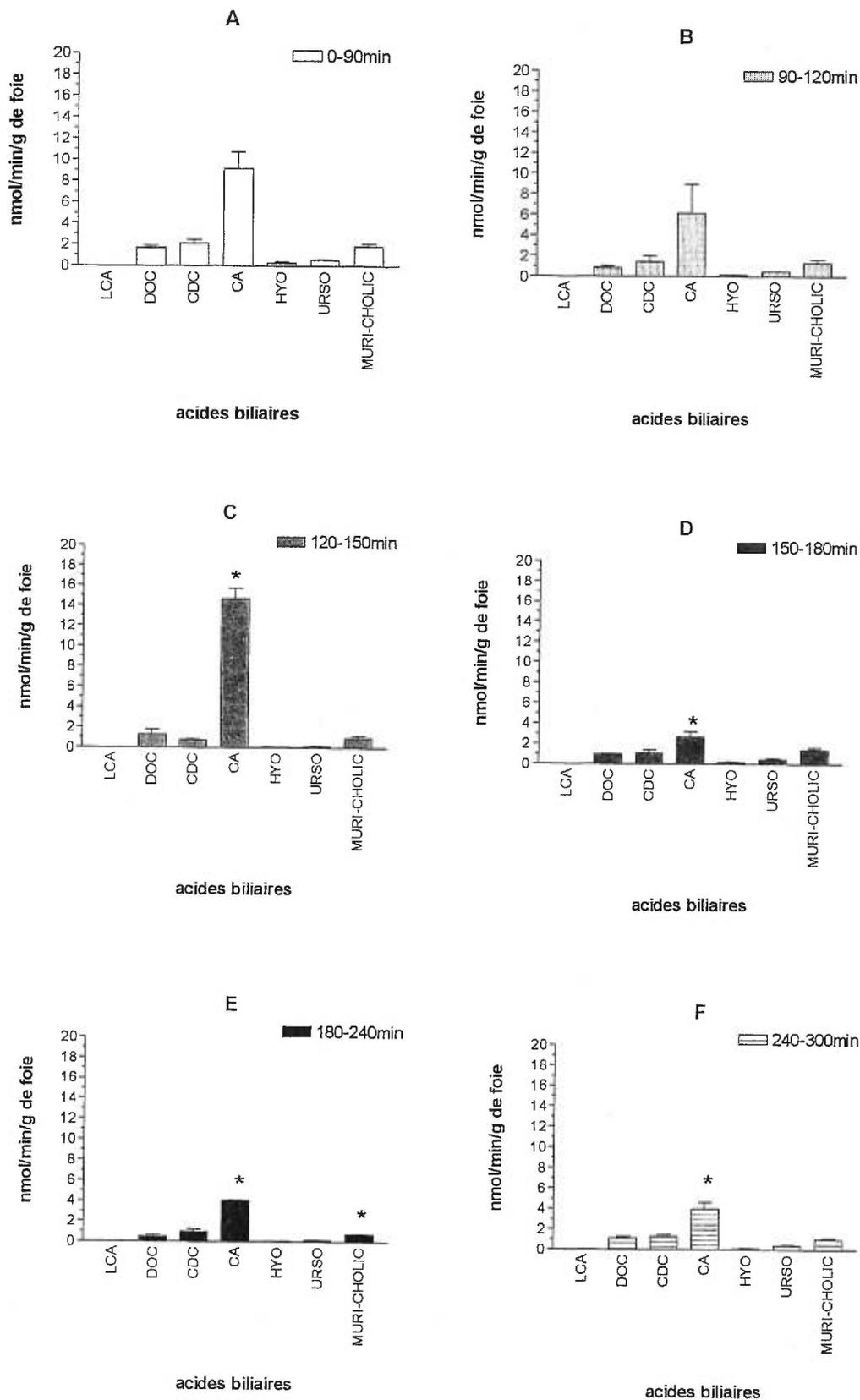


Fig.12 Effet de l'infusion d'AC sur la sécrétion des acides biliaires chez le rat. Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de sécrétion d'acides biliaires.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion d'AC.

Effet de l'acide lithocholique (ALC) sur la sécrétion des acides biliaires

La sécrétion de l'ALC était augmentée significativement 30 minutes (Fig13. C) après son infusion suivie d'une diminution graduelle. L'infusion de l'ALC n'augmentait pas de façon significative la sécrétion de l'ADOC et celle de l'ACDC (Fig13. C, D, E et F). La sécrétion de l'AC était réduite seulement 60 minutes après l'infusion (Fig13. D). L'infusion de l'ALC augmentait la sécrétion de l'AHDC et de l'AUDC (Fig13. C, D, E et F), cependant une diminution significative de la sécrétion de l'acide muricholique a été observée 30 et 180 minutes après infusion de l'ALC (Fig13. C et F).

Effet de l'acide ursodéoxycholique (AUDC) sur la sécrétion des acides biliaires

Une absence de sécrétion d'ALC a été observée après infusion de l'acide ursodéoxycholique (Fig14). L'infusion de l'AUDC n'affectait pas de façon significative la sécrétion de l'ADOC et celle de l'ACDC (Fig14. C, D, E et F). Cependant, la sécrétion de l'AC a été augmentée 60-120 minutes après infusion de l'AUDC (Fig14. D, E et F). L'AUDC augmentait de façon significative la sécrétion de l'AHDC 30 minutes après son infusion (Fig14. C). Une augmentation de la sécrétion de l'AUDC 30-120 minutes après son infusion a été observée (Fig14. C, D et E). Une diminution significative de l'acide muricholique a été observée 120-180 minutes après l'infusion de l'AUDC (Fig14. E et F).

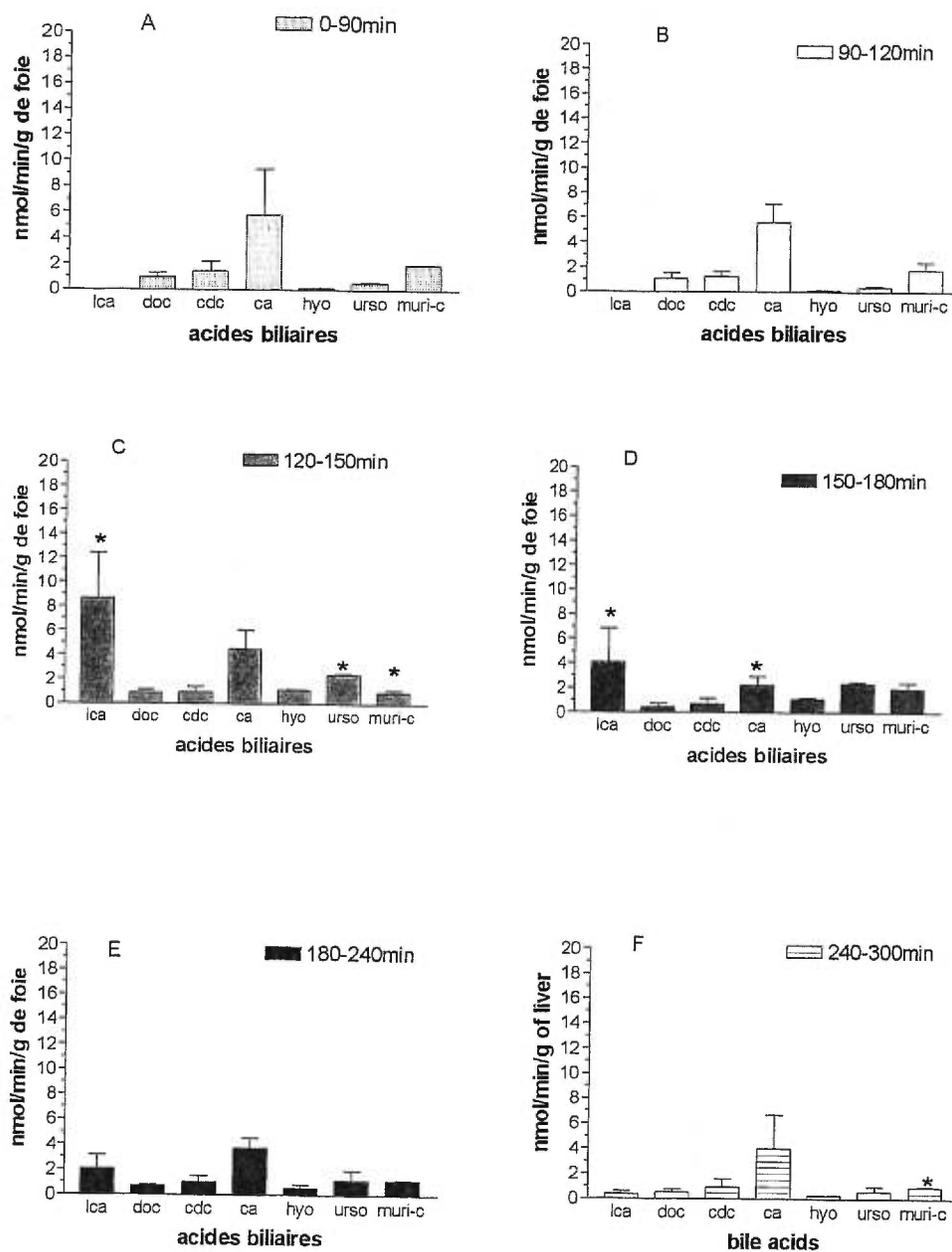


Fig.13 Effet de l'infusion d'ALC sur la sécrétion des acides biliaires chez le rat. Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de sécrétion d'acides biliaires.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion d'ALC ($P < 0.05$).

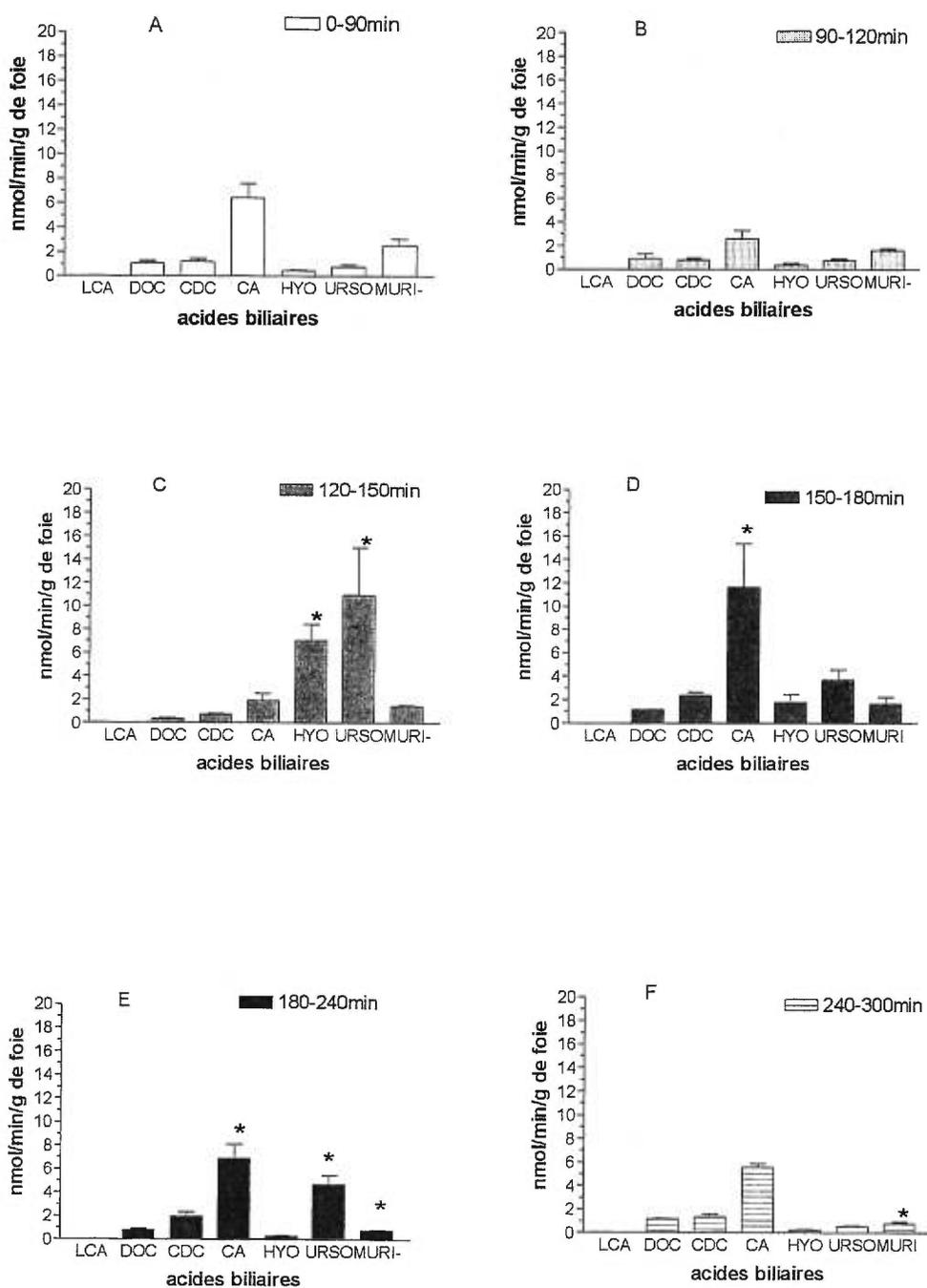


Fig.14 Effet de l'infusion de l'AUDC sur la sécrétion des acides biliaires chez le rat. Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de sécrétion d'acides biliaires.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion d'AUDC ($P < 0.05$).

Effet de l'acide hyodéoxycholique (AHDC) sur la sécrétion des acides biliaires

La fusion de l'AHCD ne favorise pas la sécrétion de l'ALC (Fig15). La fusion de l'AUDC n'affectait ni la sécrétion de l'ADOC ni celle de l'ACDC (Fig15. C, D, E et F). La sécrétion de l'AC n'a pas été affectée après l'infusion de l'AHDC (Fig15. C, D, E et F). Une augmentation significative de la sécrétion de l'AHDC a été observée 30 minutes (Fig15 C) après son infusion suivie d'une diminution, cependant la sécrétion de l'AUDC n'a pas été affectée de façon significative après l'infusion de l'AHDC pour cette même période (Fig15. C). Une augmentation significative de la sécrétion de l'acide muricholique a été observée 60 minutes de l'AHDC (Fig15 D).

Effet de l'acide cholique sulfaté (AC-S12_μ) sur la sécrétion des acides biliaires

Aucune trace de l'ALC n'a été observée après infusion de l'AC-S12_μ (Fig16). L'infusion de l'AC-S12_μ n'affectait pas de façon significative la sécrétion de l'ADOC ni celle de l'ACDC (Fig16), cependant, une augmentation significative de la sécrétion de l'AC a été observée 60-120 minutes après infusion de l'AC-S12_μ (Fig16. D et E). La sécrétion de l'AHDC ainsi que celle de l'AUDC n'ont pas été affectées de façon significative après infusion de l'AC-S12_μ (Fig16). Une augmentation significative de la sécrétion de l'acide muricholique a été observée 60 minutes après infusion de l'AC-S12_μ (Fig16. D) et elle diminuait significativement après 180 minutes (Fig16. F).

Effet de l'acide cholique sulfaté (AC-S24_μ) sur la sécrétion des acides biliaires

Il n'y avait aucune trace de l'ALC après infusion de l'AC-S24_μ (Fig17). La sécrétion de l'ADOC et celle de l'ACDC n'ont pas affectées par l'infusion de l'AC-S24_μ (Fig17). La sécrétion de l'AC était augmentée de façon significative 60 et 180 minutes après infusion de l'AC-S24_μ (Fig17. D et F). L'infusion de l'AC-S24_μ n'affectait pas de façon significative ni la sécrétion de l'AHDC ni celle de l'AUDC (Fig.17). Une diminution significative de la sécrétion de l'acide muricholique 30 et 120-180 minutes après infusion de l'AC-S24_μ (Fig17).

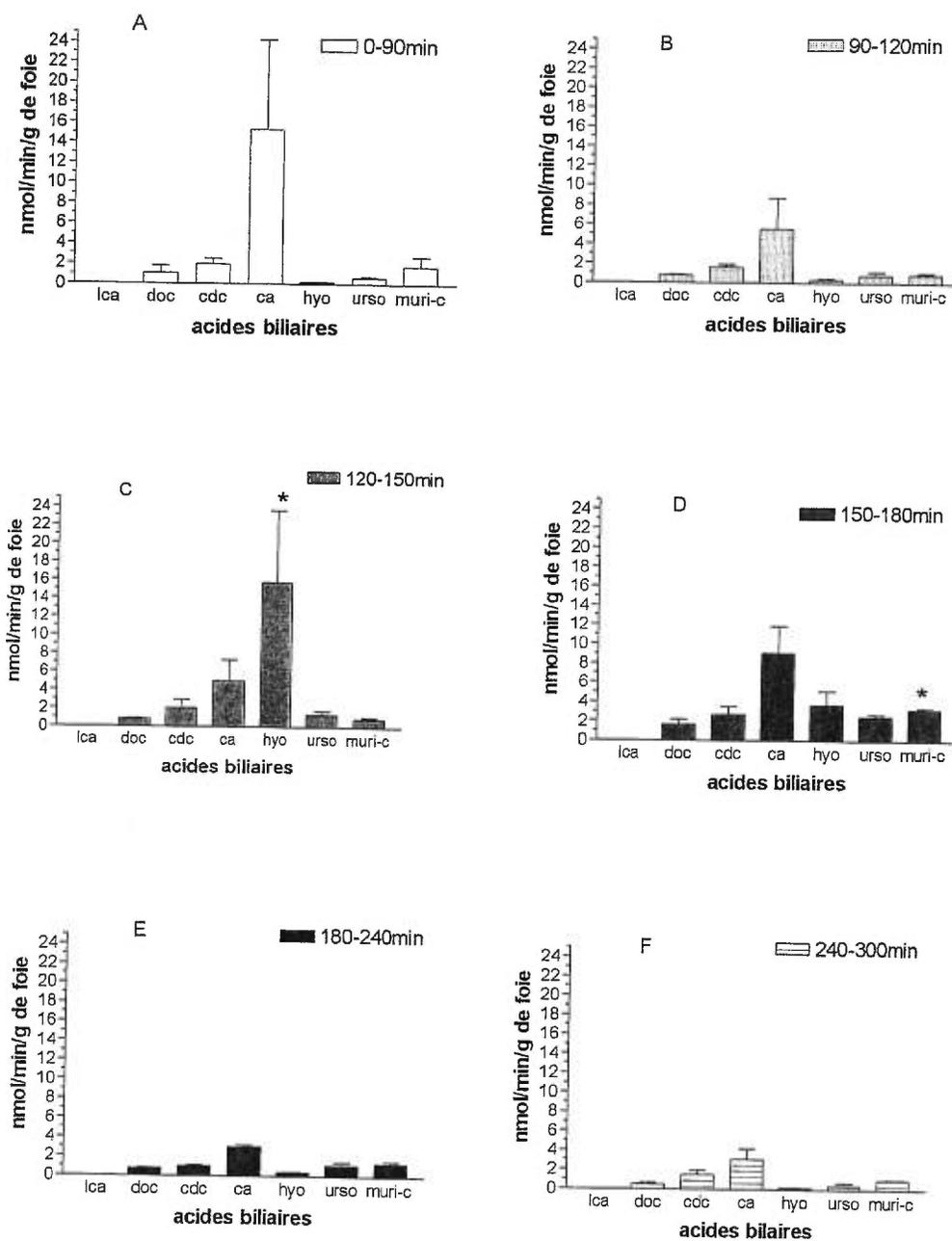


Fig.15 Effet de l'infusion d'AHDC sur la sécrétion des acides biliaires chez le rat. Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de sécrétion d'acides biliaires.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion d'AHDC ($P < 0.05$).

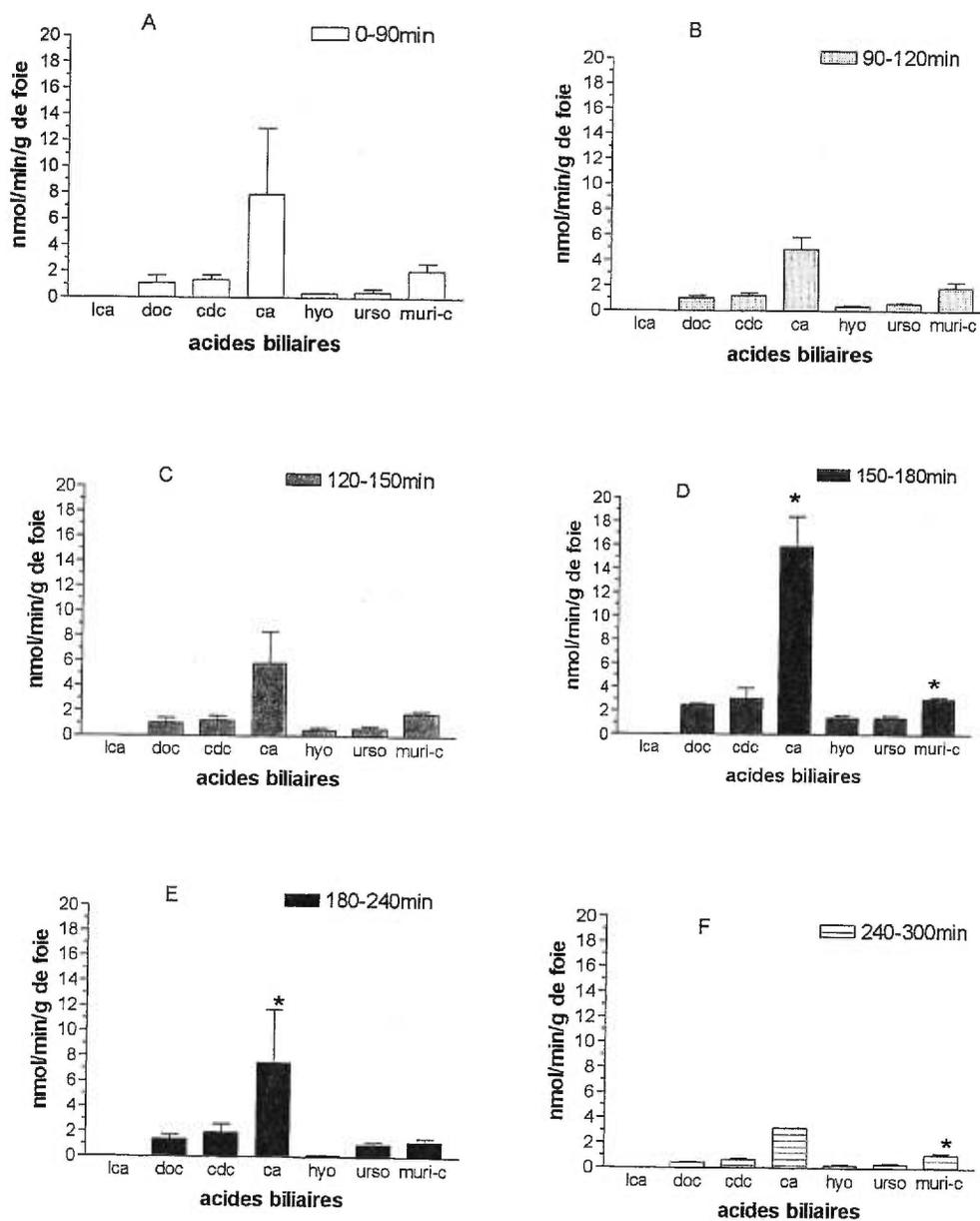


Fig.16 Effet de l'infusion d'AC-S 12μ moles sur la sécrétion des acides biliaires chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de sécrétion d'acides biliaires.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion d'AC-S 12μ moles ($P < 0.05$).

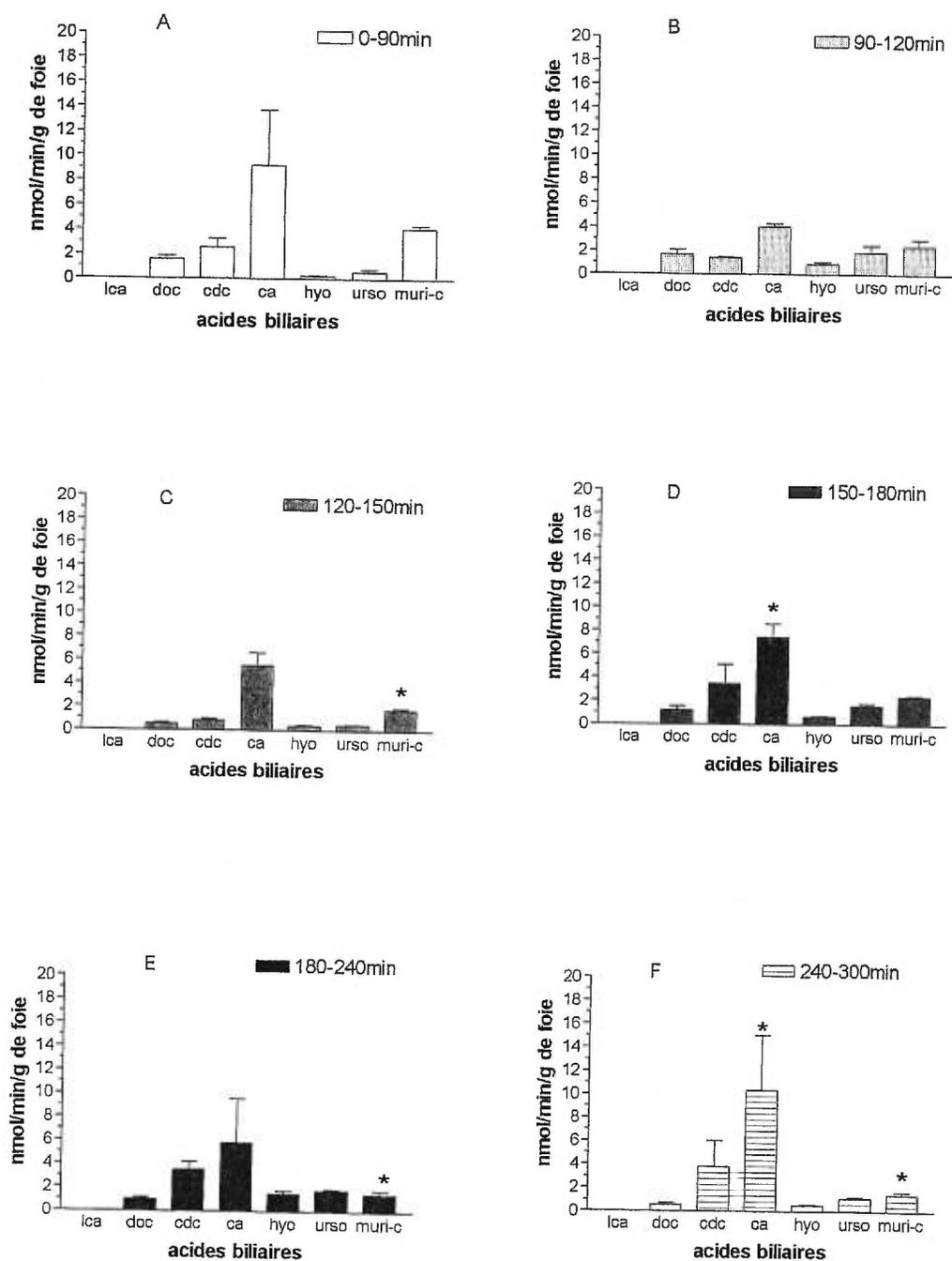


Fig.17 Effet de l'infusion d'AC-S 24 μ moles sur la s cretion des acides biliaires chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de s cretion d'acides biliaires.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion d'AC-S 24 μ moles (P < 0.05).

Effet de AC + ALC sur la sécrétion des acides biliaires

La sécrétion de l'ALC augmentait de façon significative 30-60 minutes après l'infusion de l'AC + ALC suivie d'une diminution (Fig18. C et D). La sécrétion de l'ADOC et celle de l'ACDC n'étaient pas affectées par l'infusion de l'AC + ALC (Fig18). Cependant, la sécrétion de l'AC augmentait de façon significative 30-60 minutes après l'infusion de l'AC + ALC (Fig18 C et D), tandis que l'augmentation de l'AHDC n'était pas significative pendant ces mêmes périodes après l'infusion du même produit. La sécrétion de l'AUDC augmentait 30-60 minutes après infusion de l'AC + ALC (Fig18 C et D), mais l'augmentation était significative seulement 30 minutes après l'infusion (Fig18 C). Une diminution de la sécrétion de l'acide muricholique a été observée 120-180 minutes après infusion de l'AC + ALC (Fig18 E et F).

Effet de AUDC + ALC sur la sécrétion des acides biliaires

L'infusion de l'AUDC + ALC augmentait de façon significative la sécrétion de l'ALC après 30 minutes suivie d'une diminution (Fig19 C). La sécrétion de l'ADOC et celle de l'ACDC n'étaient pas affectées de façon significative par l'infusion de l'AUDC + ALC (Fig19 C, D, E et F). La sécrétion de AC n'était pas affectée de façon significative 30-120 minutes après l'infusion de l'AUDC + ALC (Fig19 C, D et E). La sécrétion de l'AHDC augmentait significativement 30 minutes après l'infusion de l'AUDC + ALC (Fig19 C), alors que la sécrétion de l'AUDC augmentait de façon significative 30-120 minutes après infusion du même produit (Fig19 C, D et E). Une augmentation significative de la sécrétion de l'acide muricholique a été aussi observée 30-120 minutes après infusion de l'AUDC + ALC (Fig19 C, D et E).

Effet de AHDC + ALC sur la sécrétion des acides biliaires

La sécrétion de l'ALC était augmentée 30-60 minutes après infusion de l'AHDC + ALC (Fig20 C et D). La sécrétion de l'ADOC et celle de l'ACDC n'étaient pas affectées de façon significative après infusion de l'AHDC + ALC (Fig20 C, D et E). Une augmentation de la sécrétion de AC a été observée 60 minutes après infusion de l'AHDC + ALC (Fig20 D) suivie d'une diminution après 120-180 minutes (Fig20 E et F). La sécrétion de l'AHDC était augmentée 30-60 minutes après infusion de l'AHDC + ALC (Fig20 C et D) suivie d'une diminution. Une augmentation significative de AUDC a été observée 60 minutes après infusion de l'AHDC + ALC (Fig20 D) suivie d'une diminution. La sécrétion de l'acide muricholique était diminuée de façon significative seulement 180 minutes après infusion de l'AHDC + ALC (Fig20 F).

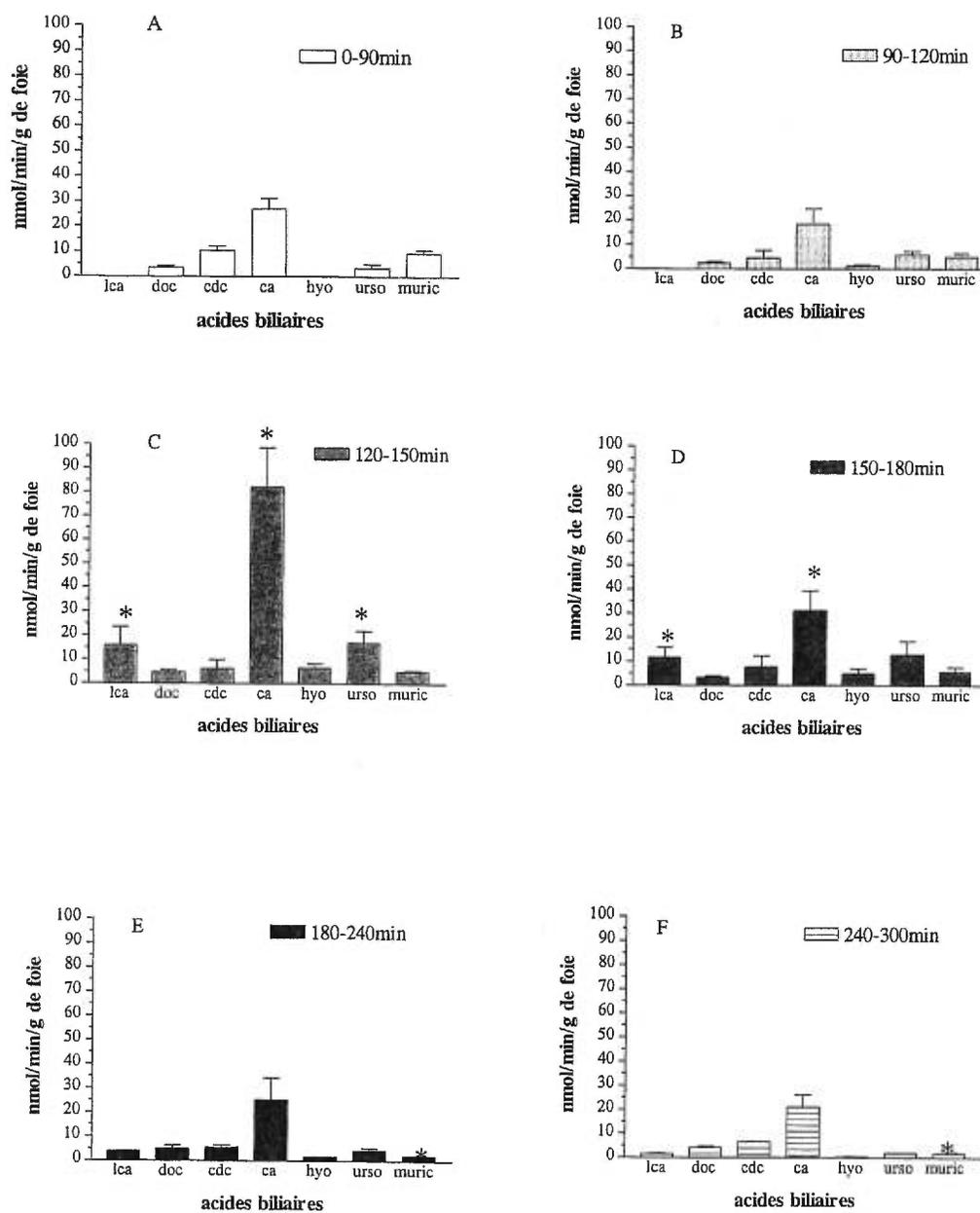


Fig.18 Effet de la coinfusion de l'AC+ ALC sur la sécrétion des acides biliaries chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de sécrétion d'acides biliaries.

* Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion de l'AC + ALC.

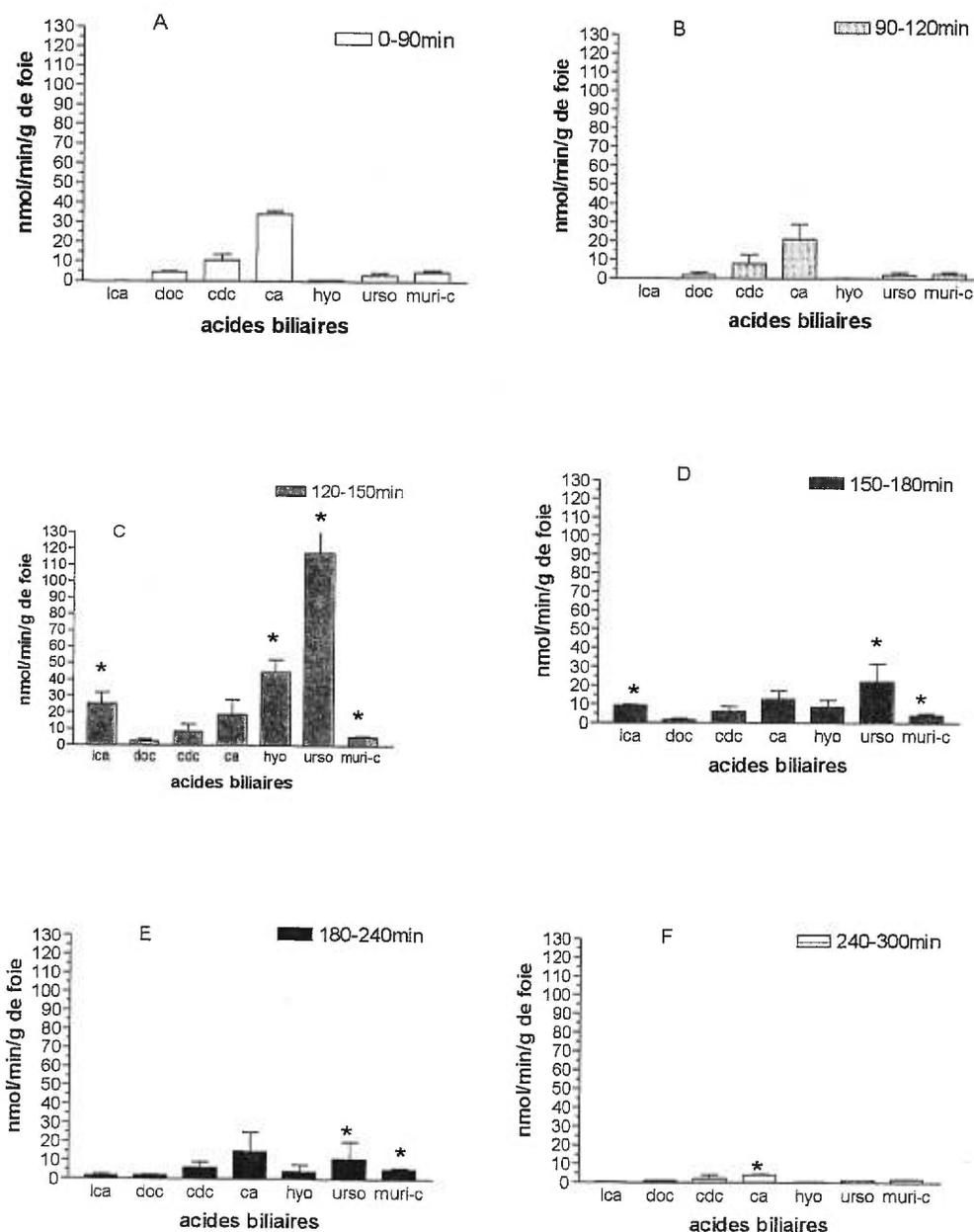


Fig. 19 Effet de l'infusion d'AUCD + ALC sur la sécrétion des acides biliaires chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de sécrétion d'acides biliaires.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion d'AUCD + ALC ($P < 0.05$).

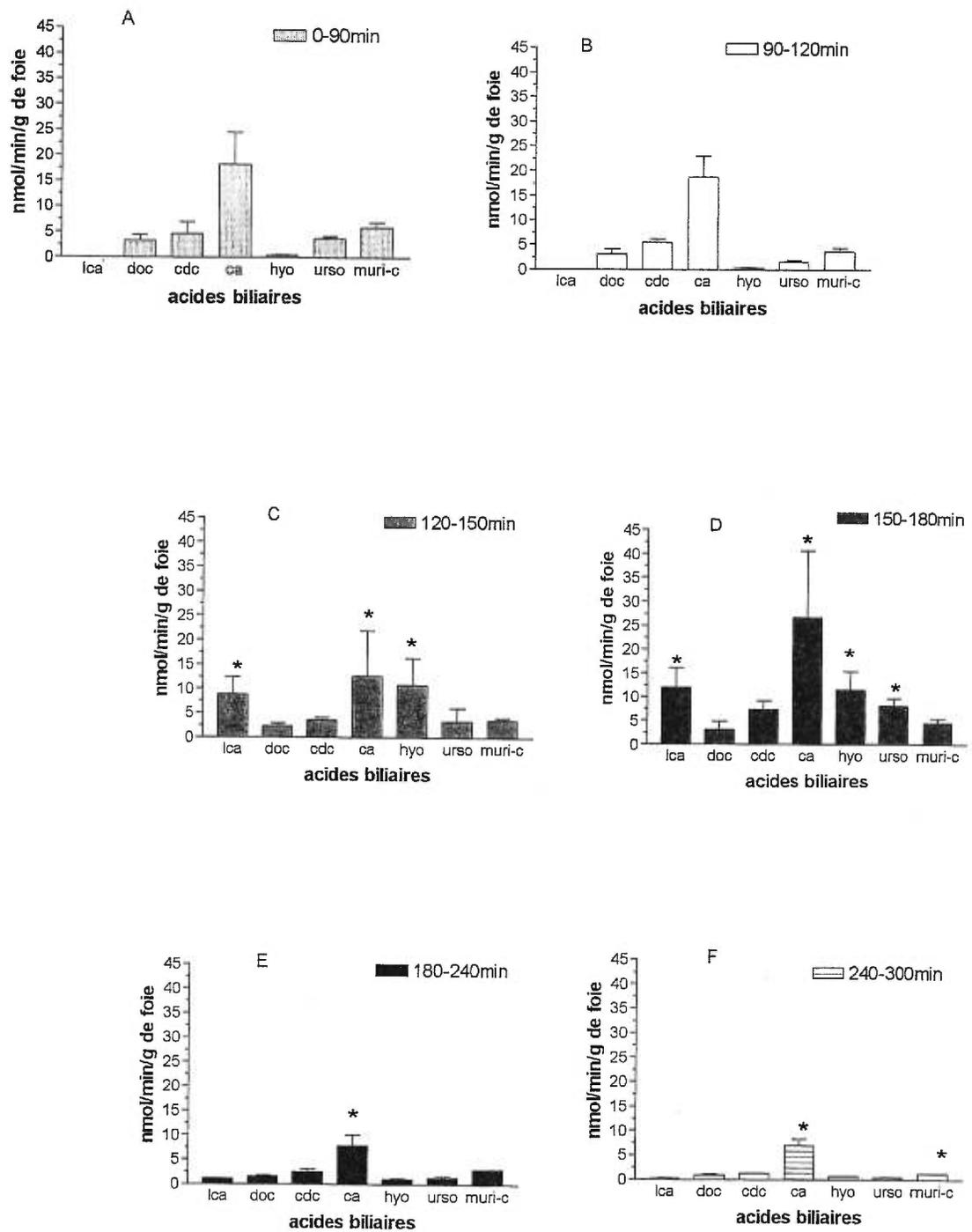


Fig.20 Effet de l'infusion d'AHDC + ALC sur la sécrétion des acides biliaires chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de sécrétion d'acides biliaires.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion d'AHDC + ALC ($P < 0.05$).

Effet de AC-S12_μ + ALC sur la sécrétion des acides biliaires

Une augmentation significative de la sécrétion de l'ALC a été observée 30 minutes après infusion de l'AC-S12_μ + ALC (Fig21. C). L'infusion de l'AC-S12_μ + LCA n'affectait pas de façon significative ni la sécrétion de l'ADOC ni celle de l'ACDC (Fig21). Une diminution significative de l'AC a été observée 120-180 minutes après infusion de l'AC-S12_μ + ALC (Fig21. E et F). Une augmentation non significative de la sécrétion de l'AHDC a été observée 30-60 minutes après infusion de l'AC-S12_μ + ALC, mais une augmentation significative de la sécrétion de l'AUDC a été observée durant ces mêmes périodes (Fig21. C et D). Une diminution significative de la sécrétion de l'acide muricholique a été observée 120-180 minutes après infusion de l'AC-S12_μ + ALC (Fig21. E et F).

Effet de AC-S24_μ + ALC sur la sécrétion des acides biliaires

Une augmentation de la sécrétion de l'ALC a été observée 30-120 minutes après l'infusion de l'AC-S24_μ + ALC (Fig22. C, D et E). L'infusion de l'AC-S24_μ + ALC n'affectait pas la sécrétion de l'ADOC (Fig22), mais une diminution de l'ACDC a été observée 180 minutes après l'infusion du même produit (Fig22. F). Une diminution de l'AC a été aussi observée 30-180 minutes après infusion de l'AC-S24_μ + ALC (Fig22. C, D, E et F). Cependant, une augmentation significative de la sécrétion de l'AHDC et de celle de l'AUDC ont été observées 60 minutes après infusion de l'AC-S24_μ + ALC (Fig22. D). Une diminution significative de la sécrétion de l'acide muricholique a été observée 30 et 120-180 minutes après infusion de l'AC-S24_μ + ALC (Fig22. C, E et F).

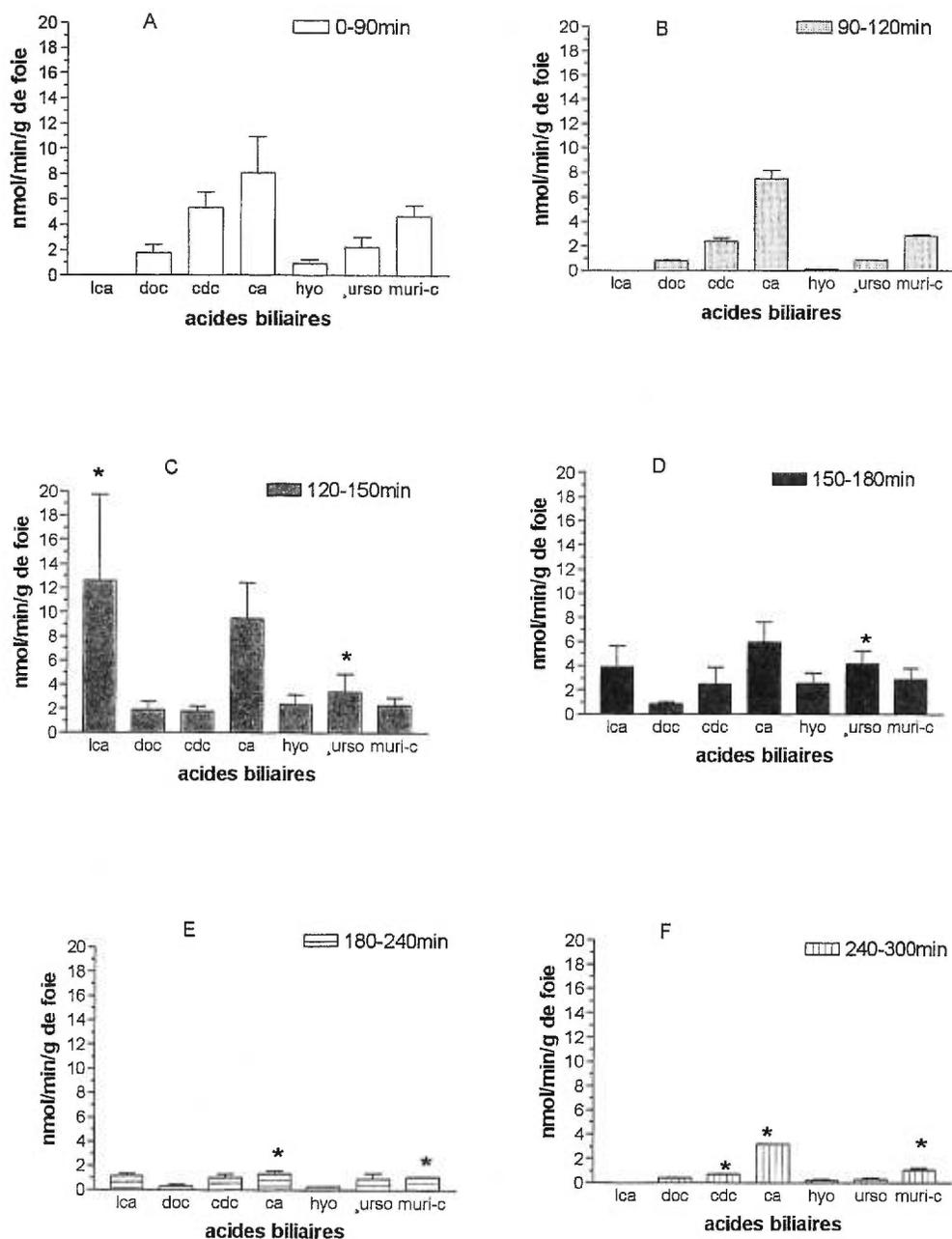


Fig.21 Effet de l'infusion d'AC-S 12 μ moles + ALC sur la s cretion des acides biliaires chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de s cretion d'acides biliaires.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion d'AC-S 12 μ moles + ALC (P < 0.05).

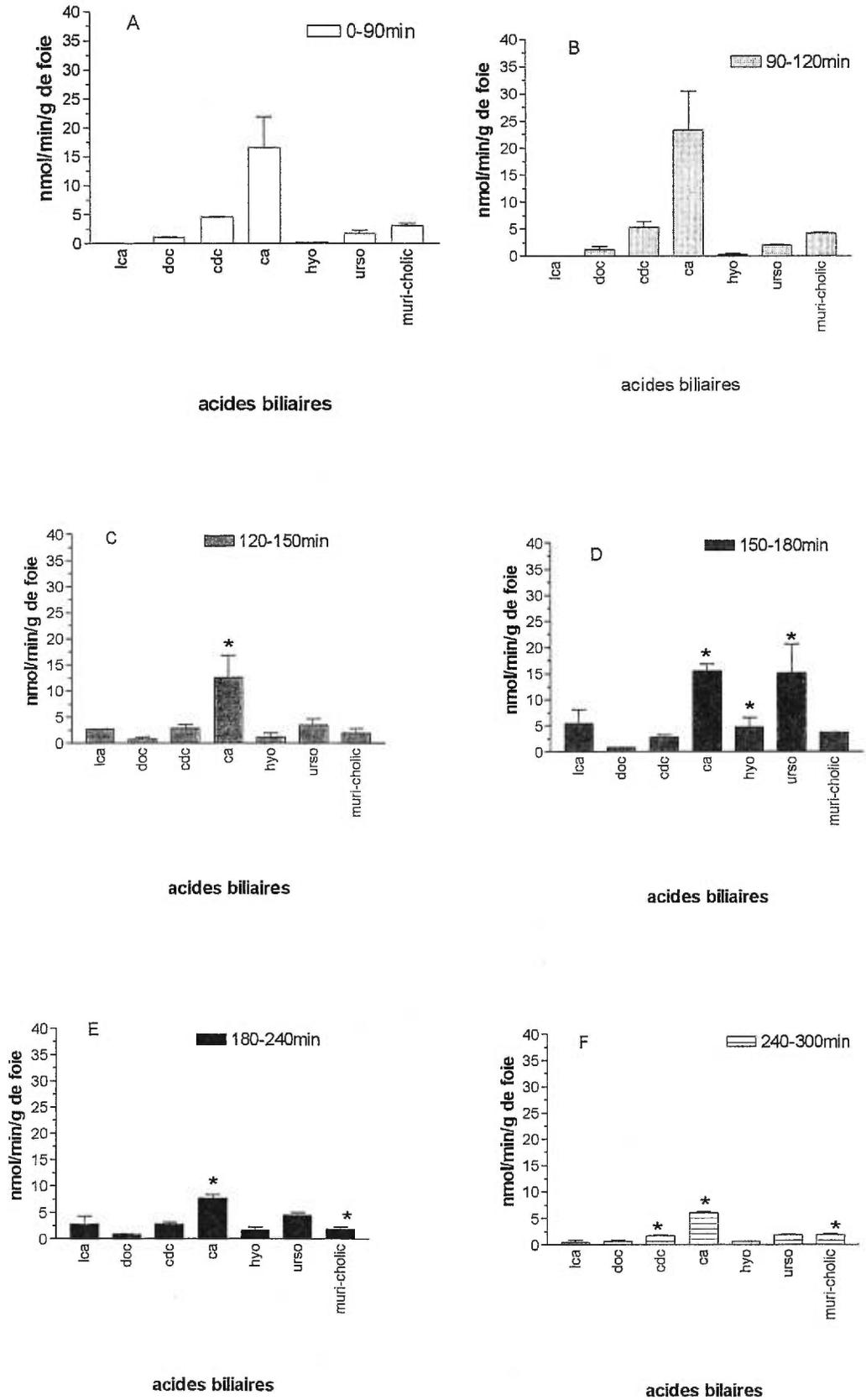


Fig.22 Effet de l'infusion d'AC-S 24 μ moles + ALC sur la s cretion des acides biliaires chez le rat.

Ces valeurs représentent les moyennes et écart-types en nmol/min/g de foie de s cretion d'acides biliaires.

*Valeurs significativement différentes de celles du contrôle (albumine) 120 minutes après infusion d'AC-S 24 μ moles + ALC (P < 0.05).

DISCUSSION

Les résultats obtenus ont montré que l'infusion d'une dose de 12 μ moles /100 g de poids corporel de l'ALC par voie intraveineuse induit une cholestase chez le rat en diminuant le flux biliaire à son plus bas niveau après 30-60 minutes (Fig. 6A). Le débit biliaire revient après ces périodes au niveau basal 90 minutes après infusion de cet acide biliaire. L'ALC réduisait le flux biliaire jusqu'à un maximum de 50% et cette réduction correspond à la cholestase maximale (Fig. 6A). Ces résultats démontrent la réversibilité de la cholestase induite par l'ALC et sont en accord avec ceux obtenus par Vu et al. (1992) montrant un rétablissement du flux biliaire après infusion d'une dose similaire de l'ALC chez le rat. Pour expliquer la diminution du flux biliaire par l'ALC, certains auteurs ont proposé un modèle représentatif de nombreux mécanismes impliqués dans le développement de la cholestase induite par l'ALC (Tuchweber et al., 1986; Roy et al., 1989). Une augmentation de la synthèse de novo du cholestérol a été suggérée comme étant l'étape initiale impliquée dans cette cascade d'évènements. Selon Yousef et al. (1984), cette augmentation du cholestérol nouvellement synthétisée serait causée par une interaction de l'ALC avec les fractions microsomiales hépatiques. Cependant, il faut souligner également une autre étape importante qui consiste en un transport de l'ALC et du cholestérol au pôle canaliculaire pour s'incorporer dans la membrane du canalicule biliaire. Pendant la période cholestatique, la sécrétion de phospholipides et de cholestérol diminue parallèlement au flux biliaire (Fig. 6A, 8A, 10A), mais une augmentation de la sécrétion de l'ALC a été observée (Fig. 13A). Ce qui suggère que, contrairement à la condition

normale, les mécanismes de sécrétion du cholestérol et de phospholipides ne sont pas associés à ceux des acides biliaires dans les conditions cholestatiques. Cette importante sécrétion de l'ALC pendant les périodes de cholestase pourrait être simplement un mécanisme de détoxification naturelle de l'organisme pour éliminer cette substance toxique. Ainsi, la diminution de la sécrétion du cholestérol, observée lors de la cholestase maximale ainsi que son retour au niveau basal durant le rétablissement du débit biliaire, suggère que son accumulation membranaire pourrait être un facteur responsable de la diminution du flux biliaire.

De plus, il semble que la présence de protéines cytosoliques soient impliquées dans le transport du cholestérol vers le pôle canaliculaire, car il a été démontré qu'une inhibition de leur synthèse normale empêche l'augmentation du cholestérol membranaire ainsi que la cholestase induite par l'ALC (Yousef et al. 1983; Vu et al. 1992). Il a été également démontré que l'incorporation et l'accumulation du cholestérol et de l'ALC dans la membrane canaliculaire font augmenter le rapport cholestérol/phospholipides membranaires (Yousef et al., 1984; Vu et al. 1992). D'une part, l'accumulation du cholestérol dans la membrane canaliculaire pourrait entraîner des changements importants tels que la dilatation du canalicule, la perte des microvillosités, la diminution de la fluidité et de la perméabilité membranaire. D'autre part, une perturbation de la perméabilité des jonctions serrées pourrait être induite par l'ALC pour provoquer un reflux des substances biliaires dans la circulation sanguine. Cela suggère que tous ces mécanismes peuvent contribuer à réduire le flux biliaire. En effet, il a été démontré aussi que le rapport cholestérol/phospholipides est inversement proportionnel à la fluidité de diverses

membranes biologiques (Van Blitterswijk et al., 1987). Ce qui est tout à fait en accord à l'augmentation de la synthèse de novo du cholestérol ainsi que son transport vers le pôle canaliculaire rapporté par Yousef et al. (1984). Selon ces derniers auteurs, l'accumulation de l'ALC et du cholestérol dans la membrane canaliculaire pourrait faire augmenter la viscosité membranaire conduisant à la cholestase.

Enfin, pour mieux comprendre le mécanisme de la cholestase induite par l'ALC, Vu et al. (1992) a évalué les compositions lipidiques membranaires à différentes périodes après infusion de l'ALC, dans la fraction totale des membranes plasmiques (MP) et dans la fraction enrichie en des membranes canaliculaires (MCB). Ces travaux ont rapporté que le niveau de phospholipides membranaires ne varient pas par rapport aux valeurs basales, tandis que le niveau de cholestérol dans ces deux fractions membranaires augmente significativement pendant les périodes de 30 et 60 minutes après infusion de l'ALC. Ainsi, toujours dans cette même étude, l'auteur a montré que la fluidité de la fraction MP ne varie pas après infusion de l'ALC, alors que celle de la fraction MCB est diminuée 30 et 60 minutes après infusion de cet acide biliaire. Cela suggère que le niveau de cholestérol augmente et la fluidité de la membrane canaliculaire diminue pendant le stade d'induction de la cholestase par l'ALC. Il faut souligner également que d'autres études ont démontré que les changements dans la fluidité membranaire sont associés depuis longtemps à la cholestase induite par les oestrogènes (Rosario et al., 1988; Smith et Gordon, 1988). Toutefois, les travaux de Vu et al. (1992) ont montré que la diminution de la fluidité membranaire a été observée seulement dans la fraction canaliculaire pendant les périodes cholestatiques induites par l'ALC, malgré une augmentation du cholestérol dans les

fractions MP et MCB. Selon ces mêmes auteurs, l'augmentation du cholestérol et du rapport cholestérol/phospholipides est beaucoup plus importante dans la fraction MCB que dans celle de MP. Cela suggère que la fraction de la membrane canaliculaire semble être le site le plus susceptible à ce changement.

Les résultats obtenus après l'infusion d'une dose de 12 umoles/100g de poids corporel de l'AC ou l'AC+ALC montrent un effet cholérétique et une prévention de la cholestase induite par l'ALC 30-60 minutes après l'infusion de ce dernier chez le rat (Fig. 5D et 6D).

Pour expliquer les mécanismes de protection de l'AC contre la cholestase induite par l'ALC, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Il a été démontré qu'une réduction du flux biliaire dépendant des sels biliaires ne pourrait pas être la cause de la cholestase induite par l'ALC parce que la sécrétion des sels biliaires dans la bile est augmentée même durant l'initiation de cette cholestase (Vu et al. 1992). Ce qui indique que la diminution éventuelle de la sécrétion des sels biliaires résulte de la diminution du flux biliaire et non l'inverse (Kakis et Yousef, 1980). Ainsi, Cela suggère que l'augmentation de la sécrétion des sels biliaires observés durant la co-infusion d'AC+ALC ne soit pas la cause première de l'effet protecteur de l'AC (Fig. 18C, 18D). La seconde hypothèse est que la co-infusion d'AC+ALC cause des changements dans les fractions MP et MCB pour s'opposer à l'action de l'ALC sur la membrane. Certaines études ont démontré que l'infusion de l'AC seul était capable d'augmenter les phospholipides membranaires et de réduire ainsi le rapport cholestérol/phospholipides (Kakis et Yousef, 1980). Ce mécanisme pourrait s'opposer à l'action de l'ALC; cependant, selon ces auteurs, cette possibilité est invraisemblable parce que le contenu de phospholipides membranaires (MP+MCB) n'était

pas augmenté. Toujours, selon eux, une très grande augmentation de ce paramètre serait requis pour s'opposer à l'augmentation drastique en contenu de cholestérol membranaire (MP+MCB).

Puisque ces données suggèrent que le mécanisme de protection de l'AC n'est pas relié à l'augmentation en contenu de cholestérol membranaire (MP+MCB), il est possible que le site clé pour la protection de l'AC précède l'exposition des membranes (MP+MCB) à l'ALC. IL est probable que l'AC prévienne l'hépatotoxicité de l'ALC en compétitionnant avec ce dernier pour sa capture hépatique et en réduisant ainsi sa concentration dans la cellule du foie. Cependant, il a été démontré que la quantité de l'ALC présente dans le sang après une co-infusion de l'AC+ALC était similaire à celle obtenue après une infusion de l'ALC seul (Kakis et Yousef, 1980). De plus, des travaux menés par ces mêmes auteurs montraient qu'il n'existait pas une différence significative entre la somme de l'ALC sécrétée dans la bile et celle retenue dans le foie suite à une co-infusion de l'AC + ALC ou à une infusion de l'ALC seul (Kakis et Yousef, 1980). Ces résultats suggèrent que la différence observée au niveau du transport de l'ALC entre les groupes traités avec l'AC+ALC et ceux avec l'ALC seul réside dans la sécrétion biliaire de ce dernier et non dans sa capture hépatique Paumgartner (1977).

L'augmentation de la sécrétion de l'ALC observée, suite à une co-infusion de ce dernier avec l'AC, suggère plusieurs possibilités. D'une part, un complexe soluble dans l'eau peut être formé entre l'ALC et l'AC favorisant leur sécrétion dans la bile (Fig. 18C, 18D). Puisque l'ALC est sécrété sous sa forme libre, cela suggère que l'ALC est

complexé avec l'AC d'une manière similaire au complexe cholestérol-acide biliaire (Kakis et Yousef, 1980; Small et Admirand, 1971). Ainsi, il est probable que ce complexe soit un micelle AC-ALC. D'autre part, il est possible que l'AC augmente la sécrétion des vésicules riches en ALC ou les canaux de sécrétion de l'ALC. Cependant, selon Kakis et Yousef (1980), cette dernière hypothèse est invraisemblable, car le rôle de ces vésicules ou ces canaux dans la formation de la bile n'a pas été adéquatement démontré. Selon ces mêmes auteurs, il est d'intérêt que la sécrétion de cholestérol soit augmentée après l'infusion de l'AC+ALC (Fig. 10D), car cela suggère que l'excès d'accumulation de cholestérol dans la membrane (MP+MCB) est aussi incorporé dans les micelles AC-ALC et sécrété dans la bile. Ainsi, ces micelles peuvent être formés dans la région péricanaliculaire ou dans la membrane MCB elle-même.

De plus, ces études suggèrent que l'AC prévient l'effet cholestatique de l'ALC en formant des micelles AC-cholestérol-ALC dans la région canaliculaire. Pour Kakis et Yousef (1980), cette micellarisation prévient la cholestase induite par l'ALC en solubilisant et en déplaçant ce dernier et l'excès de cholestérol à partir du canalicule et de la région péricanaliculaire. Selon ces auteurs, les changements dans les membranes canaliculaires biliaires sont les principales étapes d'initiation de la cholestase intrahépatique induite par l'ALC.

Les figures 5E et 6E montrent que l'AUDC, comme l'AC, a un effet cholérétique chez le rat lorsqu'il est infusé seul ou avec l'ALC. La co-infusion de l'AUDC avec l'ALC prévenait la diminution du flux biliaire, des phospholipides et du cholestérol (Fig. 6E, 8E

et 10E) induite par l'ALC après 30-60 minutes lorsque ce dernier est infusé seul. D'autres études expérimentales ont démontré que lorsque l'AUDC est administré par voie intraveineuse à des rats ayant une fistule biliaire, c'est-à-dire sans passage de bile dans le tube digestif, une amélioration de la cholestase induite par d'autres acides biliaires toxiques a été observée (Heuman et al., 1991; Schölmerich et al., 1990). De plus, une augmentation de la sécrétion canaliculaire des acides biliaires toxiques, responsables de la cholestase expérimentale, a été aussi rapportée (Heuman et al., 1991; Loria et al., 1994). Ces études sont en accord avec les obtenus aux figures 19C et 19D démontrant la sécrétion de l'ALC lors de sa co-infusion avec l'AUDC après 30-60 minutes. De plus, il a été rapporté que l'infusion de l'AUDC sous sa forme non conjuguée possède la propriété d'induire chez le rat une cholérèse plus importante que celle attendue en fonction de son taux de sécrétion dans la bile (Lévy et al., 1996; Dumont et al., 1980).

Une augmentation du flux biliaire et de l'excrétion biliaire de l'AUDC a été observée après l'infusion de ce dernier seul ou avec l'ALC (Fig. 5E, 6E, 14C, 14D, 14E, 19C, 19D, 19E). Pour expliquer ces résultats, certaines hypothèses ont été émises. Selon la première hypothèse, ces résultats peuvent s'expliquer par une sécrétion de bicarbonates par l'hépatocyte dans le canalicule biliaire suite à un échange Na^+/H^+ stimulé par l'AUDC (Lévy et al. 1996; Dumont et al. 1980; Renner et al. 1989). La deuxième hypothèse fait intervenir une sécrétion de l'AUDC par l'hépatocyte dans le canalicule biliaire en partie sous forme non protonée puis sous sa forme protonée (Lévy et al., 1996). Selon ces derniers auteurs, la forme protonée de l'AUDC est liposoluble, elle est réabsorbée par l'épithélium biliaire vers les plexus vasculaires péri-biliaires et est retournée au foie afin

d'être à nouveau excrétée dans la bile. D'autres études soutiennent que le passage continu de l'AUDC à travers l'épithélium biliaire fait diminuer les concentrations intracellulaires d'acides biliaires toxiques (Hofmann, 1994; Lévy et al. 1996).

Cependant, l'action cholérétique de l'AUDC ne peut pas expliquer à elle seule la protection contre l'ALC. L'AUDC non seulement a une action cholérétique, mais a aussi un effet cytoprotecteur permettant de stabiliser les membranes cellulaires (Lévy et al., 1996). In vitro, l'AUDC protège de la toxicité induite par les acides biliaires hydrophobes (Galle et al., 1990; Heuman et al., 1991). Des observations en microscopie électronique ont montré que l'AUDC prévient la rupture de la membrane canaliculaire trouvée dans les affections cholestatiques (Heuman et al., 1991; Lévy et al., 1996). In vivo, d'autres études ont montré que l'AUDC prévient la toxicité induite par des molécules hydrophobes comme la cyclosporine (Queneau et al., 1993) ou l'éthinyl-oestradiol (Bouchard et al., 1993; Utili et al., 1990). De plus, il a été rapporté que l'adjonction de l'AUDC stabilise la bicouche lipidique et réduit la solubilisation des micelles induites par les acides biliaires hydrophobes (Heuman, 1993). Cela a été démontré in vitro 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). En agissant sur la membrane, l'AUDC faciliterait l'élimination des molécules hydrophobes, responsables de la cholestase par accumulation intramembranaire. Chez l'homme, cette propriété pourrait expliquer les effets de l'AUDC sur des cholestases médicamenteuses comme celles dues à la cyclosporine (Kallinowski et al., 1991) ou l'amiodarone (Reshef et al., 1994).

Les résultats obtenus après l'infusion de l'AHDC seul ou avec l'ALC ont montré que l'AHDC a un effet cholérétique, prévient la cholestase induite par l'ALC après 30-60 minutes lorsque ce dernier est infusé seul (Fig. 5F et 6F). La co-infusion de l'AHDC empêche la réduction de phospholipides et de cholestérol induite par l'ALC (Fig. 8F et 10F). Cette activité cholérétique de l'AHDC chez le rat est probablement due à ses propriétés physicochimiques puisqu'il s'agit d'un acide biliaire hydrophilyque (Kham et O'Maille, 1987). Apparemment, le caractère hydrophilique de l'AHDC lui confère une faible capacité de transformer des vésicules cholestérol/phospholipides en micelles. Ce qui suggère que l'AHDC ne produit pas comme l'ALC une augmentation du rapport cholestérol/phospholipide, mais peut extraire préférentiellement les phospholipides des vésicules (Cohen-Solal et al., 1995). Cette hypothèse peut expliquer la protection de l'AHDC contre la cholestase induite par l'ALC lorsque les deux sont co-infusés. De plus, il a été rapporté que des hamsters traités avec l'AHDC démontraient une grande proportion de 67% de cet acide biliaire hydrophilique dans la bile, alors il n'existe qu'à l'état de trace chez les animaux contrôles (Cohen-Solal et al., 1995). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans ce travail où l'excrétion de l'AHDC est augmentée lorsqu'il est infusé seul ou avec l'ALC chez le rat (Fig. 15C, 15D, 20C, 20D). Cela peut suggérer un remplacement des acides biliaires hydrophobes par ceux hydrophiles, ce qui pourrait être un mécanisme expliquant la prévention de l'AHDC contre la cholestase induite par l'ALC.

Les résultats obtenus (Fig. 5B, 5C, 16D, 17D) ont montré une augmentation du flux

biliaire et de la sécrétion de l'AC après l'infusion des doses de 12 et de 24 μ moles/100 g de poids corporel de l'acide cholique sulfaté seul (AC-S). Cette augmentation du flux biliaire peut s'expliquer par le fait que la sulfatation augmente la sécrétion d'une forte concentration de monomère d'ester d'acide biliaire sulfaté et favorise une plus grande entrée d'eau dans la bile (Yousef et al. 1987). De plus, ces mêmes auteurs ont démontré que la sulfatation peut augmenter le potentiel cholérétique de tous les acides biliaires. Cependant, la sulfatation altère les propriétés physicochimiques des acides biliaires en abolissant leurs propriétés détersives et peut influencer la formation biliaire. Il a été démontré que les esters sulfatés sont librement solubles dans l'eau, possèdent une concentration micellaire critique élevée, mais ne solubilisent pas le cholestérol et très peu les phospholipides (Yousef et al., 1987). Ces études sont en accord avec les résultats obtenus (Fig. 7B, 7C, 9B, 9C) lorsque l'AC-S est infusé seul aux doses mentionnées. La sulfatation de l'AC réduit la sécrétion de cholestérol biliaire comparativement à l'AC non sulfaté, ce qui suggère que le relargage du cholestérol requiert les propriétés détergentes des acides biliaires. Donc, ces résultats ont montré que l'infusion de l'AC-S n'augmente ni le cholestérol ni les phospholipides, mais produit un effet cholérétique.

Cependant, d'autres résultats (Fig. 6B et 6C) démontrent que la co-infusion de l'AC-S avec l'ALC ne prévient pas la cholestase induite 30-60 minutes après l'infusion de ce dernier seul. Pendant la période cholestatique, la sécrétion de phospholipides et de cholestérol (Fig. 8B, 8C, 10B et 10C) diminue parallèlement au flux biliaire, mais la sécrétion d'ALC est élevée (Fig. 21C, 21D, 21C et 22D) 30-60 minutes après la co-

infusion de l'AC-S avec l'ALC. Ce qui suppose que, contrairement à la condition normale, le mécanisme de sécrétion du cholestérol et des phospholipides ne s'associe pas à ceux des acides biliaires dans les conditions cholestatiques. Cela suggère aussi qu'une diminution de la sécrétion des sels biliaires résulte de la diminution du flux et non l'inverse (Kakis et Yousef, 1980). Cette cholestase peut être due au fait que l'AC-S ne compétitionne pas avec l'ALC pour sa capture hépatique, ce qui favorise l'augmentation de l'ALC dans la cellule du foie et cause l'hépatotoxicité. De plus, il est probable que l'AC-S ne protège pas l'effet cholestatique de l'ALC parce qu'il n'y a pas de formation de micelles entre l'AC-S, le cholestérol et l'ALC dans la région canaliculaire. Ainsi, l'absence d'une telle micellarisation ne prévient pas la cholestase induite par l'ALC parce qu'elle favorise l'insolubilisation, l'accumulation d'ALC et du cholestérol en excès dans le canalicule. Ces hypothèses sont corroborées celle émise par Kakis et Yousef (1980). Selon ces auteurs, la cholestase intrahépatique induite par l'ALC peut être initiée par des changements au niveau des membranes canaliculaires biliaires.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans ce projet permettent de conclure que l'AUDC, l'AC et l'AHDC préviennent la cholestase induite par l'ALC lorsqu'ils sont co-infusés avec ce dernier à une dose égale de 12 μ moles/ 100 g de poids corporel chez le rat. Ainsi, l'infusion de l'AC-S chez le rat augmente le flux biliaire, car il apparaît avoir un haut potentiel cholérétique. En effet, la perte de la propriété détersive de l'AC-S et ses effets

sur la sécrétion de la bile peuvent suggérer que la sulfatation de cet acide biliaire est un mécanisme protecteur contre la cholestase. Cependant, quand cet acide biliaire sulfaté est co-infusé avec l'ALC à dose égale ou au double de la dose de ce dernier, il ne prévient pas la cholestase induite par l'ALC. Cela suggère que la sulfatation ne constitue pas toujours un mécanisme de protection et comporte des limites. Il serait peut-être important d'évaluer d'autres paramètres tels que la liaison de l'ALC avec les protéines cytosoliques et membranaires dont la caractérisation de celles-ci permettrait d'améliorer la compréhension du mécanisme impliqué dans la cholestase et éventuellement l'approche thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, Y., Kobayashi, H., Kurumi, Y., Shouji, M., Kitano, M., Yamamoto, T. (1991). ATP dependent taurocholate transport by rat liver canalicular membrane vesicles. *Hepatology* 14: 655-659.
- Aldler, R.A., Wannagat, F.J., Ockner, R.K. (1977). Bile secretion in selective biliary obstruction. Adaptation of taurocholate transport maximum to increased secretory load in the rat. *Gastroenterology* 73: 129-136.
- Ananthanarayanan, M., Von Dippe, P., Levy, D. (1988). Identification of hepatocyte Na^+ dependant bile acid transport protein using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 263: 8338-8343.
- Anwer, M.S., Hondalus, M.K., Atkinson, J.M. (1989). Ursodeoxycholate-induced changes in hepatic Na^+/H^+ exchange and biliary HCO_3^- excretion. *Am J. Physiol.* 257: G371-G379.
- Anwer, M.S., Emgelking, L.R., Nolan, K., Sullivan, D., Zimniak, P. and Lester, R. (1988). Hepatotoxic bile acids increase cytosolic Ca^{++} activity in isolated rat hepatocytes. *Hepatology*, 8: 887-891.
- Anwer, M.S., Clayton, L.M. (1985). Role of extracellular Ca^{++} in hepatic bile formation and tauro lithocholate transport. *Am. J. Physiol.* 249: 711-718.
- Arias, I.M., Gatmaitan, Z., Mikkelsen, R., Zahniser, D., Rice, J., Tung, A., Raphael, N., Copeland, D. (1987). On the structural and functional polarity in the liver. In: *Modulation of liver cell expression* (Reuter, W., Popper, H., Arias, I.A., Heinrich, P.C., Keppler, D., Landmann, L. Eds.) MTP Press, Lancaster, pp. 83-93.
- Balabaud, C., Kron, K.A., Gumucio, J.J. (1977). The assessment of the bile salt-nondependent fraction of canalicular bile water in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 89: 393-399.
- Ballatori, N. and Truong, A.T. (1992). Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am. J. Physiol.* 263: G617-G624..
- Ballatori, N. and Truong, A.T. (1990). Cholestasis, altered junctional permeability, and inverse changes in sinusoidal and biliary glutathione release by vasopressin and epinephrine. *Mol. Pharmacol.* 38: 64-71.
- Barlett, G.R. (1959). Phosphorous assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234: 466-468.
- Barnes, S., Buchina, E.S., King, R.J., Mc Burnett, T., Taylor, K.B. (1989). Bile acids sulfotransferase from rat liver sulfates bile acids and 3-hydroxyysteroids: purification, N-terminal amino acid sequence, and kinetic properties. *J. Lipid Res.* 30: 529-540.

- Barnes, S, Waldrop, R., Crenshaw, J., King, R.J., Taylor, K.B. (1986). Evidence for an ordered reaction mechanism for bile salt 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate : sulfotransferase from rhesus monkey liver that catalyses the sulfation of the hepatotoxic glycolithocholate. *J Lipid Res.* 27: 1111-1123.
- Barnwell, S.G., Yousef, I.M., Tuchweber, B. (1987). Biliary secretion in rats during infusion of increasing doses of unconjugated bile acids. *Biochim. Biophys. Acta* 992: 221-233.
- Baumgartner, U., Hardison, W.G. and Miyai, K. (1987). Reduced cholestatic potency of tauroolithocholate during backward perfusion of the rat liver. *Lab Invest.* 56: 576-82.
- Bazzoli, F., Roda, A., Fromm, H., Sarva, R.P., Roda, E., Barbara, L. (1982). Relationship between serum and biliary bile acids as an indicator of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid -induced hepatotoxicity in the rhesus monkey. *Dig Dis Sci.* 27 : 417-424.
- Belli, D.C., Roy, C.C., Fournier, L.A., Tuchweber, B., Giguere, R., Yousef, I.M. (1991). The effect of taurine on the cholestatic potential of sulfated lithocholate and its conjugates. *Liver* 1081: 39-44.
- Berk, P.D., Potter, B.J., Stremmel, W. (1987). Role of plasma membrane ligand-binding proteins in hepatocellular uptake of albumin-bound organic anions. *Hepatology* 7: 165-176.
- Berk, P.D., Stremmel, W. (1986). Hepatocellular uptake of organic anions. Dans: Popper, M. et Schaffner, F. (Eds.). *Progress in Liver Disease*, Vol. VIII, Grune Stratton Ltd., Orlando, p. 125-144.
- Beuers, U., Nathanson, M.H., Boyer, J.L. (1993). Effects of tauroursodeoxycholic acid on cytosolic Ca^{++} signals in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* 104: 604-612.
- Beuers, U., Spengler, U., Zwiebel, F.M., Pauletski, J., Fisher, S. and Baumgartner, G. (1992). Effect of ursodeoxycholic acid on the kinetics of the major hydrophobic bile acids in health and chronic cholestatic liver disease. *Hepatology* 15: 603-608.
- Bijleveld, C.M.A., Vonk, R.J., Kuipers, F., Havinga, R., Beverhof, R., Koopman, B.J. et al. (1989). Benign recurrent intrahepatic cholestasis: altered bile acid metabolism. *Gastroenterology* 97: 427-432.
- Bilhartz, L.E., Dietschy, J.M. (1988). Bile salt hydrophobicity influences cholesterol recruitment from rat liver in vivo when cholesterol synthesis and uptake are constant. *Gastroenterology* 95: 771-779.
- Bjorkhem, I. (1992). Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of the bile acids. *J. Lipid Res.* 33: 455-471.

- Blitzer, B.J., Boyer, J.L. (1982). Cellular mechanisms of bile formation. *Gastroenterology* 82: 346-357.
- Blouin, A., Bolender, R.P., Weibel, E.R. (1977). Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and non hepatocytes in the rat liver parenchyme. *J. Cell. Biol.* 52: 261-268.
- Boelsterli, U.A., Gopa, R., Balaz, T. (1983). Modulation by S-adenosyl-L-methionine of hepatic Na^+/K^+ -ATPase, membrane fluidity, and bile flow in rats with ethinyl oestradiol-induced cholestasis. *Hepatology* 3: 12-17.
- Botla, R., Spivey, JR., Aguilar, H., Bronk, S.F., Gores, G.J. (1995). Ursodeoxycholate inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 272: 930-938.
- Bouchard, G., Yousef, I.M. and Tuchweber, B. (1994). Decreased biliary glutathione content is responsible for the decline in bile salt-independent flow induced by ethinyl estradiol in rats. *Toxicol. Lett.* 74: 221-233.
- Bouchard, G., Yousef, I.M., Tuchweber, B. (1993). Influence of oral treatment with ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acids on oestrogen-induced cholestasis in rats: effects on bile formation and liver plasma membranes. *Liver*, 13: 193-202.
- Bouscarel, B., Fromm, H., Nussbaum, R. (1993). Ursodeoxycholate mobilizes intracellular Ca^{++} and activates phospholipase A in isolated hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 264: G243-G251.
- Bouwens, L., Wisse, E. (1987). Natural killer cells of rat liver. *Transplant. Proc.* 19: 3129-3130.
- Boyer, J.L., Graf, J., Meier, P.J. (1992). Hepatic transport systems regulating pH, cell volume, and bile secretion. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 418-438.
- Boyer, J.L. (1986b). Mechanism of bile secretion and transport. Dans: Popper, M. et Schaffner, F. (Eds.). *Progress in liver disease*. Grune and Stratton Ltd., Orlando, p.849-855.
- Boyer, J.L. (1983). Tight junctions in normal and cholestatic liver: does the paracellular pathway have functional significance? *Hepatology* 3: 614-618.
- Boyer, J.L. (1980). New concepts of mechanisms of hepatocyte bile formation. *Physiol. Rev.* 60: 303-326.
- Boyer, J.L., Layden, T.J., Hraban, Z. (1977). Mechanism of cholestasis: taurochenodeoxycholate alters canalicular membrane composition structure and permeability. In:

Membrane Alteration as Basis of liver injury. Edited by Popper, H., Bianchi, L., Reuter, W. Baltimore, University Park Press, p. 353-369.

Boyer, J.L., Bloomer, J.R. (1974). Canalicular bile secretion in man. Studies utilizing the biliary clearance of C14 mannitol. *J. Clin. Invest.* 54: 773-781.

Brouwer, A., Wisse, E.K.D.L. (1988). Sinusoidal endothelial cells and perisinusoidal fat storing cells. In Arias, I.M., ed. *The Liver: Biology and Pathology*. New York, Raven Press, 665-682.

Brouwer, A., Barelds, R. J., Deleuum, A.M., Blauw, E., Plas, A., Yap, S.H., Vanden Broek, A.M.W.C. (1988). Isolation and culture of Kupffer cells from human liver: ultrastructure, endocytosis and prostaglandin synthesis. *J. Hepatol.* 6: 36-49.

Cantafora, D.A.A., Attili, A.F., Ginanni-Corradini, S., De Luca, C., Minervini, G., Di Biase, A., Angelico, M. (1986). Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species. *Comp. Biochem. Physiol.* 833, 3: 551-554.

Carey, M.C. and Duane, W.C. (1994). Enterohepatic circulation. In *The Liver: Biology and Pathology* (Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D. and Shafritz, D.A. Eds.), 3rd ed. Raven Press, New York, pp. 719-768.

Carey, M.C., Cahalane, M.J. (1988). Enterohepatic circulation. Dans: Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schachter, D.A. (Eds.). *The liver: Biology and pathobiology*. Raven Press Ltd., New York, p. 573-616.

Carey, M.C., Wu, S.F. and Watkins, J.B. (1979). Solution properties of sulfated monohydroxy bile salts. Relative insolubility of the disodium salt of glycolithocholate sulfate. *Biochim. Biophys. Acta*, 575: 16-26.

Chanussot, F., Lafont, H., Hauton, J., Tuchweber, B., Yousef, I.M. (1990). Studies on the origin of biliary phospholipid: Effect of dehydrocholic acid and cholic acid infusions on hepatic and biliary phospholipids. *Biochem. J.* 270: 691-695.

Cohen, D. E., Leighton, L.S., Carey, M.C. (1992). Bile salt hydrophobicity controls vesicle secretion rates and transformation in native bile. *Am. J. Physiol.* 263: G386-G395.

Cohen, B.I., Hofmann, A.F., Mosbach, E.H., Stenger, R.J., Rothschild, M.A., Hagey, L.R., Yoon, Y.B. (1986). Differing effects of nor-ursodeoxycholic or ursodeoxycholic acid on hepatic histology and bile acid metabolism in the rabbit. *Gastroenterology* 91: 189-197.

Cohen-Solal, C., Parquet, M., Férézou, J., Sérougne, C., Lutton, C. (1995). Effects of hyodeoxycholic acid and α -hyocholic acid, two 6α -hydroxylated bile acids, on cholesterol and bile acid metabolism in the hamster. *Biochimica et Biophysica. Acta* 1257: 189-197.

- Coleman, R. (1987a). Biochemistry of bile secretion. *Biochem. J.* 244: 249-261.
- Coleman, R.. (1987b). Bile salts and biliary lipids. *Biochem. Soc. Trans.* 15: 68-80.
- Colombo, C., Castellani, M.R., Balistreri, W.F., Seregni, E., Assaisso, M.L. and Giunta, A. (1992). Scintigraphic documentation of an improvement in hepato-biliary excretory function after treatment with ursodeoxycholic acid in patients with cystic fibrosis and associated liver disease. *Hepatology* 15: 677-684.
- Combettes, L., Berthon, B., Doucet, E., Erlinger, S., Claret, M. (1990). Bile acids mobilize internal Ca^{++} independently of external Ca^{++} in rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 190: 619-623.
- Combettes, L., Berton, B., Doucet, E., Erlinger, S., Claret, M. (1989). Characteristics of bile acids-mediated Ca^{++} release from permeabilized liver cells and liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 264: 157-167.
- Combettes, L., Dumont, M., Berthon, B., Erlinger, S., Claret, M. (1988). Release of calcium from the endoplasmic reticulum by bile acids in rat liver cells. *J. Biol. Chem.* 263: 2299-2303.
- Cotting, J., Lentze, M.J. and Reichen, J. (1990). Effects of ursodeoxycholic acid treatment on nutrition and liver function in patients with cystic fibrosis and longstanding cholestasis. *Gut* 31: 918-921.
- Cowen, A.E., Korman, M.G., Hofmann, A.F., Cass, O.W. (1975). Metabolism of lithocholate in health man. I. Biotransformation and biliary excretion of intravenously administered lithocholate, lithoglycine, and their sulfates. *Gastroenterology* 69: 59-66.
- Crosignani, A., Podda, M., Bertolini, E., Battezzati, P.M., Zuin, M. and Setchell, K. (1991). Failure of ursodeoxycholic acid to prevent cholestatic episode in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis : a study of bile acid metabolism. *Hepatology* 13: 1076-1083.
- Crosignani, A., Podda, M., Battezzati, P.M., Bertolini, E., Zuin, M., Watson, D. et al. (1991). Changes in bile acids composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic acid administration. *Hepatology* 14: 1000-1007.
- Deleuze, J.F., Jacquemin, E., Dubuisson, C., Cresteil, D., Dumont, M., Erlinger, S., Bernard, O., Hadchwel, M. (1996). Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*, 23: 903-908.
- Deutsh, J.C., Iwahashi, M.M., Sutherland, E.M., Mapoles, J., Simon, F.R. (1992). Characterization of the transport of a synthetic bile salt, iodinated cholyl-glycyl-tyrosine, in isolated cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 15: 917-922.

Dionne, S., Tuchweber, B., Plaa, G. L. and Yousef, I. M. (1994). Phase I and Phase II metabolism of lithocholic acid in hepatic acinar zone 3 necrosis. Evaluation in rats by chromatography-mass spectrometry. 48:1187-1197.

Duane, W.C., Levitt, D.G., Mueller, S.M., Behrens, J.C. (1983). Regulation of bile acid synthesis in man. Presence of a diurnal rhythm. J. Clin. Invest.. 72: 1930-1936.

Dumont, M., Uchman, S. and Erlinger, S. (1980). Hypercholerisis induced by ursodeoxycholic acid and 7-ketolithocholic acid in the rat.: possible role of bicarbonate transport. Gastroenterology 79: 82-89.

Durham, S., Vore, M. (1986). Taurocholate and steroid glucuronides: mutual protection against cholestasis in the isolated perfused rat liver. J. Pharmacol. Exp. Ther. 237: 490-495.

Eaton, D. L., Richards, J.A. (1986). Kinetic evaluation of carriermediated transport of ouabain and taurocholic acid in isolated rat hepatocytes. Biochem. Pharmacol. 35: 2721-2725.

Elferink, R.P.J., Ottenhoff, R., Radomska, A., Hofmann, A.F., Kuipers, F., Jansen, P.L.M. (1991). Inhibition of glutathione conjugate secretion from isolated rat hepatocytes by dipolar bile acids and other organic anions. Biochem. J. 274: 281-286.

Elias, E., Hruban, Z., Wade, J.B., Boyer, J.L. (1980). Phalloidin-induced cholestasis: a microfilament-mediated change in junctional complex permeability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2229-2233.

Elliot, W.H. (1985). Metabolism of bile acids in liver and extrahepatic tissues. Dans: Danielson, H., Sjovall, J. (Eds.). Sterols and bile acids, Elsevier, Amsterdam, p. 303-329.

Erlinger, S. (1990). Hypercholeretic bile acids: a clue to the mechanism? Hepatology 11: 888-890.

Erlinger, S. (1988). Bile flow. Dans: Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, D., Scachter, D., Shafritz, D.A. (Eds.). The Liver : Biology and Pathobiology, Raven Press, New York, p. 643-661.

Erlinger, S. (1986). Biliary physiology and disease. Dans: Arias, I.M., Frenkel, M., Wilson, J.H.P. (Eds.). The Liver Annual, Elsevier, Publishers, Amsterdam, p. 343-367.

Erlinger, S. (1985). Hepatic transport of bile acids: intracellular events. Dans: Barbara, L., Dowling, R.H., Hofmann, A.F., Roda, E. (Eds.). Recent advances in bile acids research, Raven Press, New York, p.5-9.

- Erlinger, S. (1982b). Secretion of bile. Dans: Schiff, L., Schiff, E.R. (Eds.). *Disease of the liver*, Lipincott, Philadelphia, 93-118.
- Erlinger, S. and Dhumaux, D. (1974). Metabolism and control of secretion of bile water and electrolytes. *Gastroenterology*, 66 : 286-304.
- Evans, W. H. (1980). A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochem. Biophys. Acta* 604: 27-64.
- Evans, W.H., Kremmer, T., Culvenor, J.C. (1976). Role of membranes in bile formation. Comparison of the composition of bile and a liver bile canalicular plasma membrane subfraction. *Biochem. J.* 154: 589-595.
- Fisher, A. (1991). Quatre familles de molecules responsables de l'adhérence intercellulaire. *Médecine Sciences* 7: 450-542.
- Fisher, M.M., Kakis, G. and Yousef, I.M. (1976). Bile acid pool in Wistar rats. *Lipids* 11: 93-96.
- Fisher, M.M., Magnusson, R., Miyai, K. (1971). Bile acid metabolism in mammals. 1. Bile acid induced intrahepatic cholestasis. *Lab. Invest.* 21: 88-91.
- Forker, E.L., Luxon, B.A. (1981). Albumin helps mediate removal of taurocholate by rat liver. *J. Clin. Invest.* 67: 1517-1522.
- Forker, E.L. (1977). Mechanisms of hepatic bile formation. *Ann. Rev. Physiol.* 39 : 323-347.
- Frenkiel, P.G., Lee, D.W., Cohen, H., Gilmore, C.J., Resser, K., Bonorris, G.G. et al. (1986). The effect of diet on bile acid kinetics and biliary lipid secretion in gallstone patients treated with ursodeoxycholic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 43: 239-250.
- Friedman, S., L., Roll, F. J., Boyles, J.K., Bissell, D.M. (1985). Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8681-8685.
- Frimmer, M., Ziegler, K. (1988). The transport of bile acids in liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* 947: 75-99.
- Friman, S., Persson, H., Shersten, T., Svanvik, J., Karlberg, I. (1992). Adjuvant treatment with ursodeoxycholic acid reduces acute rejection after liver transplantation. *Transplant. Proc.* 24: 389-390.
- Fromm, H. (1994). Cholestasis: pathogenic role and therapeutic action of bile acids. In: Gentilini, P., Arias, I.M., McIntyre, N., Rodes, J. eds. *Cholestasis*. New York: Elsevier Science, 239-246.

- Fukumoto, Y., Ando, M., Yasunaga, M., Okuda, M., Okita, K. (1994). Secretin Prevents taurocholate-induced intrhepatic cholestasis in the rat. *J. Hepathol.* 20: 750-754
- Gadacz, T.R., Allan, R.N., Mack, E., Hofmann, A.F. (1976). Impaired lithocholic sulfatation in the rhesus monkey : a possible mecanism for chenodeoxycholate toxicity. *Gastroenterology* 70: 1125-1129.
- Galeazzi, R., Javitt, N.B. (1977). Bile acid excretion :the alternate pathway in the hamster. *J Clin Invest.* 60: 1693-1701.
- Galle, P.R., Theilmann, L., Raedsch, R., Otto, G., Stiehl, A. (1990). Ursodeoxycholate reduces hepatotoxicity of bile salts in primary human hepatocytes. *Hepathology* 12: 486-491.
- Gleeson, D., Smith, N.D., Scaramuzza, D.M. (1988). Bicarbonate (HCO₃⁻) dependent and independent pH regulatory mechanisms in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 94: A542 (Abstract).
- Goodman, D.S. (1988). Vitamin A metabolism in the liver. Dans: Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D.A. (Eds.). *The liver: Biology and Pathology.* Raven Press Ltd., New York, p. 467-474.
- Goresky, C.A. (1980). Uptake in the liver: the nature of the procee. Dans: Javitt, N.B. (Eds.). *Liver and biliary tract physiology*, University Park Press, Baltimore, pp. 65-101.
- Graf, J., Henderson, R.M., Krumpholz, B., Boyer, J.L. (1987). Cell. membrane and trans epithelial voltages and resistances in isolated rat hepatocyte couplets. *J. Membrane Biol.* 95: 241-254.
- Gratton, F., Weber, A.M., Tuchweber, B., Morazain, R., Roy, C.C. and Yousef, I.M. (1987). Effect of chronic administration of tauroolithocolate on bile transformation and liver ultrastructure in the rat. *Liver*, 72: 130-137.
- Gregory, D.H., Vlahcevic, Z.R., Prugh, M.F., Swell,L. (1978). Mechanism of secretion of biliary lipids role of a microtubular system hepatocellular transport of biliary lipids in the rat. *Gastroenterology* 74: 93-100.
- Güldütuna, S., Zimmer, G., Imhof, M., Bhatti, S., You, T. and Leuchner, U. (1993). Molecular aspsects of membrane stabilization by ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 104: 1736-1744.
- Hagenbuch, B., Meier, B.J. (1994). Molecular cloning, chromosomal localization and functional characterization of a human liver Na⁺/bile acid cotransporter. *J. Clin. Invest.* 93: 1326-1331.
- Hagenbuch, B., Stieger, B., Foguet, M., Lübert, H., Meier, P.J. (1991). Functional

expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 10629-10633.

Hardison, W.G.M., Lowe, P.J., Gosink, E. (1988). Nature of taurodehydrocholic acid uptake in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 254: 269-274.

Hardison, W.G., Hatoff, D.E., Miyai, K., Weiner, R.G. (1981). Nature of bile acid maximum secretory rate in the rat. *Am. J. Physiol.* 241: G337-G343.

Harper, H.A., Rodwell, V.W., Mayes, P.A. (1982). *Précis de biochimie*, eds. 5. Les Presses de l'université Laval, Québec, p. 293-296.

Hauton, J.C. (1975). Bile phospholipids: Origin and function. The hepatobiliary system. *Fundamental and pathological mechanism. Life Science* 7:529-551.

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

Henderson, R.M., Graf, J., Boyer, J.L. (1987). Na⁺/H⁺ exchange regulates intracellular pH in isolated rat hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 252: 109-113.

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

Heuman, D. (1993). Hepatoprotective properties of ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 104: 1865-1870.

Heuman, D., Scott Mills, A., McCall, J., Hylemon, P., Pandak, W. and Vlahcevic, Z. (1991). Conjugates of ursodeoxycholate protect against cholestasis and hepatocellular necrosis caused by more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Gastroenterology* 100: 203-211.

Heuman, D., Pandak, W., Hylemon, P. and Vlahcevic, Z. (1991). Conjugates of ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: in vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes. *Hepatology* 14: 920-926.

Hofmann, A.F. (1994). Bile acids. In Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D. and Shaffitz, D.A., eds. *The liver : biology and pathobiology*, 3rd ed. New York: Raven Press, p. 769-795.

Hofmann, A.F. (1990). Bile acids secretion, bile flow and biliary lipid secretion in humans. *Hepatology* 12: 17-25.

Hofmann, A.F. (1988). Bile acids. Dans: Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, D., Schachter, D., Shafritz, D.A. (Eds.). *The Liver: Biology and Pathobiology*, Raven Press, New York, p. 553-572.

- Hylemon, P.B., Bohdan, P.M., Sirica, A.E., Heuman, D.M., Vlahcevic, Z.R. (1990). Cholesterol and bile acid metabolism in cultures of primary rat bile ductular epithelial cells. *Hepatology* 11: 982-988.
- Irwin, M., Arias, M.D. (1986). Mechanisms and consequences of ion transport in the liver. Dans: Grune and Stratton (Ed.). *Progress in Liver Diseases*, Vol. VIII, 145-159.
- Jansen, P.L.M., Peters, W.H.M., Lamers, W.H. (1985). Hereditary conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion excretion. *Hepatology* 5: 573-579.
- Jaquemin, E., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A.W., Meier, P.J. (1994). Expression cloning of rat liver Na⁺-independent organic anion transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 133-137.
- Javitt, N. B. (1994). Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways. *FASEB. J.* 8: 1308-1311.
- Javitt, N.B. (1976). Hepatic bile formation. *N. Engl. J. Med.*, 295 : 1464-1469, 1511-1516.
- Javitt, N. and Emerman, S. (1968). Effect of sodium tauro lithocholate on bile flow and bile acid secretion. *J. Clin. Invest.* 47: 1002-1014.
- Jazrawi, R.P., De Caestecker, J.S., Goggin, P.M., Britten, A.J., Joseph, A.E., Maxwell, J.D. et al. (1994). Kinetics of hepatic bile acid handling in cholestatic liver disease: effect of ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 106: 134-142.
- Jones, A.L. ((1996). Anatomy of the Normal Liver. Dans: *Hepatology: a textbook of liver disease/* edited by Zakim, D., Boyer, T.D. 3rd ed. Vol.1: 3-32.
- Jungerman, K. (1987). Regulation of hepatic metabolism and haemodynamics by hormones and autonomic nerves. Dans: Reuter W., Popper, H., Arias, I.M., Heinrich, P.C., Kepler, D., Landmann, L. (Eds.). *Modulation of liver cell expression*, MTP Press, Lancaster, pp. 15-39.
- Kakis, G. and Yousef, I.M. (1980). The respective roles of membrane cholesterol and of sodium/potassium adenosine triphosphatase in the pathogenesis of lithocholate induced cholestasis. *Lab. Invest.* 43: 73-81.
- Kakis, G. and Yousef, I.M. (1978). Pathogenesis of lithocholate and tauro lithocholate induced intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterology*, 75: 595-607.
- Kallinowski, B., Theilmann, L., Zimmerman, R., Gams, E., Kommerell, B., Stiehl, A. (1991). Effective treatment of cyclosporine-induced cholestasis in heart transplanted patients treated with ursodeoxycholic acid. *Transplantation* 51: 1128-1129.

- Kan, K.S. and Coleman, R. (1988). The calcium ionophore A23187 increase the tight-junctional permeability in rat liver. *Biochem. J.* 256: 1039-1041.
- Kanai, S., Kitani, K. (1983). Glycoursodeoxycholate is as effective as tauroursodeoxycholate in preventing the taurocholate-induced cholestasis in the rat. *Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.* 42: 423-430.
- Kaneda, K., Kurioka, N., Seki, S., Wake, K., Yamamoto, S.(1983). Pit Cell-hepatocyte contact in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 4:955-958.
- Khan, M., O'Maille, E.R.L. (1987). High Biliary HCO_3^- concentration and hypercholeresis induced by hyodeoxycholate in the rat. *J. Physiol.* 386: 106.
- Kitani, K., Ohta, M., Kanai, S. (1985). Tauroursodeoxycholate prevents biliary protein excretion induced by other bile salts in the rat. *Am. J. Physiol.* 248: G407-G417.
- Klaasen, C.D. et Watkins, J.B. (1984). Mechanism of bile formation, hepatic uptake, and biliary secretion. *Pharm. Rev.* 36: 1-67.
- Knyrim, K., Vakil, M., Pfab, R., Classen, M. (1989). The effects of intraduodenal bile acid administration on biliary secretion of ionised calcium and carbonate in man. *Hepatology*, 10: 134-142.
- Krähenbuhl, S., Fisher, S., Talos, C., Reichen, J. (1994). Ursodeoxycholate protects oxidative mitochondrial metabolism from bile acid toxicity: dose-response study in isolated rat liver mitochondria. *Hepatology* 20: 1595-1601.
- Kramer, W., Bickel, U., Busher, H., Gerok, W., Kurz, G. (1982). Bile salts binding polypeptides in plasma membranes of hepatocytes revealed by photoaffinity labelling. *Eur. J. Biochem.* 129: 13-24.
- Kramer, W., Buscher, H.P., Gerok, W. (1979). Bile salt binding to serum components. Taurocholate incorporation into high-density lipoprotein revealed by photoaffinity labelling. *Euro. J. Biochem.* 102: 1-9.
- Kremmer, T., Wisher, M.H., Evans, W.H. (1976). The lipid composition of plasma membrane subfraction originating from the three major functional domains of the rat hepatocyte cell surface. *Biochim. Biophys. Acta* 455: 655-664.
- Kuiper, F., Hardonk, M.J., Vonk, R.J. and van der Meer, R. (1992). Bile secretion of sulfated glycolithocholic acid is required for its cholestatic action in rats. *Am. J. Physiol.* 262: G267-G273.
- Kuipers, F., Heslinga, H., Havinga, R., Vonk, R.J. (1986). Intestinal absorption of lithocholic acid sulfates in the rats : inhibitor effect of calcium. *Am. J. Physiol.* 251:G189-G194.

- Kuiper, F., Havinga, R. and Vonk, R.J. (1985). cholestasis induced by glycolithocholic acid in the rat: Protection by endogenous bile acids. *Clin. Sci.* 68: 127-134.
- Kukongviriyapan, V. and Stacey, N.H. (1991). Chemical-induced interference with hepatocellular transport. Role in cholestasis. *Chem. Biol. Inter.* 77: 245-261.
- Kullack-Ublick, G.A., Hagenbuch, B., Stieger, B., Wolkoff, A.W., Meier, P.J. (1994). Functional characterization of basolateral rat liver organic anion transporting polypeptide. *Hepathology* 20: 411-416.
- Lamri, Y., Erlinger, S., Dumont, M., Roda, A. and Feldman, G. (1992). Immunoperoxidase localisation of ursodeoxycholic in rat biliary epithelial cell. Evidence for a cholehepatic circulation. *Liver*, 12: 351-354.
- Lamri, Y., Roda, A., Dumont, M., Feldmann, G., Erlinger, S. (1988). Immunopeptidase localization of bile salts in rat liver cells. Evidence for a role of Golgi apparatus in bile salt transport. *J. Clin. Invest.* 82: 1173-1180.
- Layden, T.J. and Boyer, J.L. (1977). Tauroolithocholate-induced cholestasis: Taurocholate, but not dehydrocholate, reverses cholestasis and bile canalicular membrane injury. *Gastroenterology* 73: 120-128.
- Lévy, S., Capron, J.-P., Erlinger, S. (1996). Mécanisme d'action de l'acide ursodéoxycholique dans les maladies du foie cholestatiques. Service d'Hépatologie et INSERM U24, Hôpital Beaujon, 100, boulevard du Général-Leclerc, F-92118 Clichy Cedex.
- Lewittes, M., Tuchweber, B., Weber, A., Roy, C.C. and Yousef, I.M. (1984). Resistance of suckling guinea pig to lithocholic acid-induced cholestasis. *Hepathology*, 486: 491-498.
- Lillienau, J., Crombie, D.L., Munoz, J., Longmire-Cook, S.J., Hagey, L.R. and Hofmann, A.F. (1993). Negative feed-back regulation of ileal bile acid transport system in rodents. *Gastroenterology* 104: 38-46.
- Llopis, J., Kass, G.E.N., Duddy, S.K., Farrell, G.C., Dahm, A., Orrenius, S. (1991). Mobilization of the hormone sensitive calcium pool increases hepatocyte tight junctional permeability in the perfused rat liver. *FEBS Lett.* 280: 84-86.
- Lorenzini, I., Sakisaka, S., Meier, P.J., Boyer, J.L. (1986). Demonstration of a transcellular vesicle pathway for biliary excretion of inulin in rat liver. *Gastroenterology*, 91: 1278-1288.
- Loria, A., Myara, A., Chazouillères, O., Serfaty, L., Masini, J.P. and Poupon, R. (1994). Evidence that ursodeoxycholic acid (UDCA) increases biliary excretion of cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) in man (abstract). *Gastroenterology* 106:

A935.

Loria, P., Bertolotti, M., Tripodi, A. et al. (1991). Advances in the comprehension of the pathophysiology of bile secretion. *Dig. Dis. Sci.* 9: 142-155.

Lowe, P.J., Barnwell, S.G., Coleman, R. (1984). Rapid Kinetic analysis of the bile-salt-dependent secretion of phospholipid, cholesterol and a plasma-membrane enzyme into bile. *Biochem. J.* 222: 631-637.

Luketic, V.A., Sanyal, A.J. (1994). The current status of ursodeoxycholate in the treatment of chronic cholestatic liver disease. *Gastroenterology* 2: 74-79.

Madara, J.L., Barenberg, D., Carlson, S. (1986). Effects of cytochalasin D on occluding junctions of intestinal absorptive cells: further evidence that the cytoskeleton may influence paracellular permeability and junctional charge selectivity. *J. Cell. Biol.* 102: 2125-2136.

Matern, S., Gerok, W. (1979). Pathophysiology of enterohepatic circulation of bile acids. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 85: 125-204.

Mathis, U., Karlaganis, G., Preisig, R. (1983). Monohydroxy bile salt sulfates : Tauro-3-beta-hydroxy-5-cholenoate-3-sulfate induces intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterology* 85: 674-681.

Matsura, S., Eto, S., Kato, K. and Tashiro, Y. (1984). Ferritin immunoelectron microscopic localization of 5'-nucleotidase on rat liver cell surface. *J. Cell. Biol.* 99: 166-173.

Mauad, T.H., van Nieuwerk, C.M., Dingemans, K.P., Smitt, J.J., Schinkel, A.H., Notenboom, R.G., van den Bergh Weerman, M.A., Verkuisen, R.P., Groen, A.K., Elferink Oude, R.P. et al. (1994). Mice with homozygous disruption of the *mdr2* p-glycoprotein gene. A model animal for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J. Pathol.* 145: 1237-1245.

Mazella, G., Parini, P., Bazzoli, F., Villanova, N., Festi, D., Aldini, R. et al. (1993). Ursodeoxycholic acid administration on bile acid metabolism in patients with early stages of primary biliary cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 38: 896-902.

Meier, P.J., Eckhardt, U., Schroeder, A., Hagenbuch, B., Stieger, B. (1997). Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake system in rat and human liver. *Hepatology* 26: 1667-1677.

Meier, P.J. (1995). Molecular Mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am.J. Physiol.* 269: G801-G812.

Meier, P.J. (1990). Cellular mechanisms of intrahepatic cholestasis. *Drugs*: 40: 84-97.

Meier, P. J., Meier-Abt, A.S., Boyer, J. L. (1987). Properties of canalicular bile acid transport system in rat liver. *Biochem. J.* 242: 465-469.

Meier, P.L. (1988). Transport polarity of hepatocytes. *Sem. Liv. Dis.* No. 4: 293-307.

Meier, P.J., Meier-Abt, A.S., Barrett, C., Boyer, L.L. (1984). Mechanisms of taurocholate in canalicular and basolateral transport rat liver plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 259: 10614-10622.

Meyer Zum Büschenfelde, K.-H., Greken, G. (1996). Immune Mechanisms in the Production of Liver Disease. In *Hepatology: a textbook of liver disease*/edited by David Zakim, Thomas D. Boyer. 3rd ed. Vol.2: 1243-1258.

Minato, Y., Hasumura, Y., Takeuchi, J. (1983). The role of fat-storing cells in Disse Space fibrinogenesis in alcoholic liver disease. *Hepatology* 3: 559-566

Miyai, K., Richardson, A.L., Gandiol, D. et al. (1977). Subcellular pathology of rat liver in cholestasis and choleresis induced by bile salts. 1. Effects of lithocholic, 3 β -hydroxy-5-cholenoic, cholic and dehydrocholic acids. *Lab. Invest.* 38: 487-495.

Miyai, K., Mayr, W.W., Richardson, A.L. (1975). Acute cholestasis induced by lithocholic acid in rats. A freeze-fracture replica and thin section study. *Lab. Invest.* 32: 527-535.

Miyai, K., Richardson, A. (1974). Prevention of lithocholic acid-induced hepatic cell injury by cholic acid (abstr). *Gastroenterology* 67: A39/816.

Muller, M., Jansen, P.L.M. (1997). Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am. J. Physiol.* 35: G1285-G1303.

Muller, M., Ishikawa, T., Berger, U., Klunemenn, C., Lucka, L., Schreyer, A., Kannitch, C., Reuters, W., Kurz, G., Keppler, D. (1991). ATP- dependent transport of taurocholate across the hepatocyte canalicular membrane mediated by a 110KDa glycoprotein binding ATP and bile salt. *J. Biol. Chem.* 266. 18920-18926.

Nathanson, M.H., Boyer, J.L. (1991). Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14: 551-566.

Nemchausky, B.A., Layden, T.J., Boyer, J.L. (1977). Effect of chronic choleretic infusion of bile acids on the membrane of the bile canaliculus. A Biochemical and morphological study. *Lab. Invest.* 36: 259-267.

Nishida, T., Gatmaitan, Z., Che, M., Arias, I.M. (1991). Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP dependent bile acid transport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6590-6594.

- Ockner, R.K., Weisiger, R.A., Gollan, J.L. (1983). Hepatic uptake of albumin-bound substances: albumin receptor concept. *Am. J. Physiol.* 245: 13-18.
- Oelberg, D.G., Dubinsky, W.P., Adcock, E.W. and Lester, R. (1984b). Calcium binding by lithocholic acid derivatives. *Am. J. Physiol.* 247: G112-G115.
- Oelberg, D.G., Chari, V.M., Little, M.J., Adcock, E.W. and Lester, J. (1984a). Lithocholate glucuronide is a cholestatic agent. *J. Clin. Invest.* 73: 1507-1514.
- Ostrow, J.D. (1993). Metabolism of bile salts in cholestasis in humans. In *Hepatic Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology* (Tavaloni, N. and Berk, P.D. Eds.), Raven Press, New York, pp. 673-712.
- Palmer, R.H., McSherry, C.K. (1982). Lithocholate metabolism in baboon fed chenodeoxycholate. *J. Lab. Clin. Med.* 99: 533-538.
- Palmer, R.H. (1967). The formation of bile acid sulfates: a new pathway of bile acid metabolism in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 58: 1047-1050.
- Paul-Dorvil, N., Fournier, L.A., Tuchweber, B., Giguere, R., Yousef, I.M. (1983). The effect of dietary taurine on sulfated lithocholate induced cholestasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 37: 221-232.
- Pattinson, N.R. and Chapman, B.A. (1984). Lithocholate detoxification and biliary secretion in the rat. *Biochem. Int.* 9: 137-142.
- Paumgartner, G. (1984). Bile secretion and cholestasis. Dans: Calandra, S., Carulli, N., Savioli, G. (Eds.). *Liver and lipid metabolism*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 135-143.
- Paumgartner, G. (1977). Physiology of bile secretion: bile acid-dependent bile flow. In: *Liver and Bile*. Bianchi, Gevok, Wand Sickinger, eds. Lancaster, England, M.T.P. Press, Ltd. p. 45-62.
- Phillips, M.J., Poucell, S., Oda, M. (1986). Biology of disease, mechanism of cholestasis. *Lab. Invest.* 54: 593-608.
- Phillips, M.J., Ohio, C., Miyairi, M., Smith, C.R. (1983). Intrahepatic cholestasis as a canalicular motility disorder. *Lab. Invest.* 48: 205-208.
- Popper, H. and Schaffner, F. (1970). Pathophysiology of cholestasis. *Hum. Pathol.* 1: 1-24.
- Poupon, R.E., Balkau, A., Eschwège, E., Poupon, R. (1991). UDCAPBC Study Group. A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* 324: 1548-1554.

- Poupon, R., Chrétien, Y., Parquet, M., Rey, C., Ballet, F. and Infante, R. (1988). Hepatic transport of bile acids in the isolated perfused rat liver: structure-kinetics relationship. *Biochem. Pharmacol.* 37: 209-212.
- Preisig, R., Cooper, H.L., Weeler, H.O. (1962). The relationship between taurocholate secretion rate and bile production in unanaesthetized dog during cholinergic blockade and during secretion administration. *J. Clin. Invest.* 41: 1152-1162.
- Priestly, B.G., Côté, M.G. and Plaa, G.L. (1971). Biochemical and morphological parameters of tauroolithocholate induced cholestasis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 49: 1079-1091.
- Queneau, P.E., Bertault-Peres, P., Mesdjian, E., Durand, A. and Montet, J.C. (1993). Diminution of an acute cyclosporine A-induced cholestasis by tauroursodeoxycholate in the rat. *Transplantation* 56: 530-534.
- Queneau, P.E., Montet, A.M., Guitaoui, M., Bertault-Peres, P., Montet, J.C. (1993). Ursodeoxycholic acid prevents chronically cyclosporin A-induced cholestasis without altering the drug concentration in blood. A study in the rat (abstract). *Gastroenterology* 104: A976.
- Quistorff, B., Grunnet, N. and Cornell, N. (1985). Digitonin perfusion of rat liver. A new approach in the study of intra-acinar and intra-cellular compartmentation in the liver. *Biochem. J.* 226: 289-297.
- Radomska, A., Treat, S. and Little, J. (1993). Bile acid metabolism and the pathophysiology of cholestasis. *Semin. Liver Dis.* 13: 219-234.
- Raedsch, R., Lauterburg, B.H., Hofmann, A.F. (1981). Altered bile acid metabolism in primary biliary cirrhosis. *Dig. Dis. Sci.* 26: 394-401.
- Rappaport, A.M. (1969). Anatomic considerations. In: Schiff L. ed. *Diseases of the Liver*. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1.
- Rappaport, A.M. (1980). Hepatic blood flow. Dans: *Liver and biliary tract physiology* (Javitt, N.B. Ed.) Vol. 1, University Park Press, Baltimore, pp. 1-63.
- Reichen, J. (1993). Mechanism of cholestasis. In *Hepatic Transport and Bile Secretion: Physiology and Pathophysiology* (Tavaloni, N. and Berk, P.D. Eds.), Raven Press, New York, pp. 665-672.
- Renner, E.L., Lake, J.R., Cragoe, E.J., Van Dyke, R.W. and Scharschmidt, B.F. (1989). Ursodeoxycholic acid choleresis: relationship to biliary HCO₃⁻ and effect of Na⁺/H-exchange inhibitors. *Am. J. Physiol.* 254: G232-G241.
- Reshef, R., Cohen, I., Shiller, M., Szvalb, S., Loberant, N. (1994). Does

ursodeoxycholic acid have a place in the treatment of amiodarone-induced cholestasis? *J. Clin Gastroenterol.* 18: 177-178.

Rioux, F., Prea, A., Yousef, I.M., Levy, E., Malli, L., Carillo, M.C., Tuchweber, B. (1994). Short-term feeding of a diet enriched in phospholipids increases bile formation and the bile acid transport maximum in rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1214: 193-202.

Rioux, F., Tuchweber, B., Yousef, I.M. (1988). Dietary lecithin increases bile formation in rats. *Gastroenterology* 94: A621 (Abst.).

Robenek, H., Herwig, J., Thermann, H. (1981). A quantitative freeze-fracture analysis of gap and tight junctions in the normal and cholestatic liver. *Virchows Arch. Cell. Pathol.* 38: 39-46.

Robins, S. J. et Brunengraber, H. (1982). Origin of biliary cholesterol and lecithin in the rat: contribution of new synthesis and preformed hepatic stores. *J. Lipid. Res.* 23: 604-608.

Rodrigues, C.M.P., Kren, B.T., Steer, C.J. and Setchell, K.D.R. (1995). Increased liver tissue ursodeoxycholic acid concentration and reduced lithocholate formation in rats orally administered the taurine conjugate of UDCA compared with unconjugated UDCA (abstract). *Gastroenterology* 108: A1156.

Rosario, J., Sutherland, E., Zaccaro, L., Simon, F.R. (1988). Ethinyloestradiol administration selectively alters liver sinusoidal membrane lipid fluidity and protein composition. *Biochemistry.* 27: 3939-3946.

Roy, C.C., Tuchweber, B., Weber, A.M. and Yousef, I.M. (1989). Update on bile formation and on mechanism of bile acid-induced cholestasis. In: Shaffer, E. and Thompson, A.A. Eds. *Advances in Gastroenterology.* New York: Plenum Press, New York, pp. 41-67.

Rudolph, G., Endeke, R., Senn, M. and Stiehl, A. (1993). Effects of ursodeoxycholic acid on the kinetics of cholic acid and chenodeoxycholic acid in patients with primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 17: 1028-1032.

Salvioli, G., Mambrini, A., Lugli, R., Bertolani, R., Zirelli, E. (1985). Effects of different bile salts on erythrocyte membranes. Dans: Barbara, L., Doubling, R.H., Hofmann, A. F., Roda, E. (Eds.). *Recent advances in bile acid research,* Raven Press, New York, p. 17-27.

Schachter, D. (1988). The hepatocyte plasma membrane: organization and differentiation. Dans: Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D.A. (Eds.). *The liver: biology and pathobiology,* 2^{ème} éd., Raven Press, New York, p. 131-140.

Scharschmidt, B.F., Lake, J.R. (1989). Hepathocellular bile acid transport and

ursodeoxycholic acid hypercholerisis. *Diag. Dis. Sci.* 34 (supplement 12): 5-15.

Schölmerich, J., Baumgartner, U., Miyai, K. and Gerok, W. (1990). Tauroursodeoxycholic acid prevents tauroolithocholate-induced cholestasis and toxicity in rat liver. *J. Hepathol.* 10: 280-283.

Schölmerich, J., Kitamura, S., Miyai, K. (1984). Hydroxylation of dihydroxylated bile acids by rat liver. *Hepathology* 4: A763 (Abstract.).

Schölmerich, J., Becher, M.S., Schmidt, K., Schubert, R., Becher, M.S, Feldhaus, S. et al. (1984). Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties. Studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. *Hepathology* 4: 661-666.

Schwartz, C.C., Halloran, L.G., Vlahcevic, Z.R., Gregory, D.H., Swell, L. (1978). Preferential utilization of free cholesterol from high-density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man. *Science.* 200: 62-64.

Schwenk, M., Hofmann, A.F., Carlson, G.L, Carter, J.A., Coulton, F., Grein, H. (1978). Bile acid conjugation in the chimpanzee: effective sulfatation of lithocholic acid. *Arch Toxicol.* 40:109-118.

Sellinger, M., Boyer, J.L. (1990). Physiology of bile secretion and cholestasis. Dans: Popper, H., Schaffner, F. (Eds.). *Progress in Liver Diseases, Volume IX*, Grune and Stratton, New York, pp. 237-259.

Sellinger, M., Henderson, R.M., Henderson, A., Zweifach, A., Boyer, J.L., Graf, J. (1988). Identification and characterization of chloride channel in canalicular rat liver plasma membranes. *Hepathology* 8: A1262 (Abstract).

Setchell, K.D.R., O'Connell, N.C., Bern, E., Rodrigues, C., Fitz Simmons, S., Terrin, M. et al. (1994). Markedly decreased biliary ursodeoxycholic acid (UDCA) enrichment with high dose UDCA in cystic fibrosis associated liver disease. Optimization of therapeutic dose (abstract). *Hepathology* 20: A262.

Simons, K. and Fuller, S. (1985). Cell Surface polarity in epithelia. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1: 243-288.

Sleyster, K. and Knook, D.L. (1982). Relation between localization and function of rat liver Kupffer cells. *Lab. Invest.* 47: 484-490.

Small, D.M. and Admirand, W. (1971). Solubility of bile salts. *Nature* 221: 265-267.

Small, D.M. (1970). The formation of gallstones. *Adv. Intern. Med.* 16: 234-264.

Smith, D.J., Gordon, E.R. (1988). Role of liver plasma membrane fluidity in the

pathogenesis of oestrogen-induced cholestasis. *J. Lab. Clin. Med* 112: 679-685.

Sorrentino, D., Potter, B.J., Berk, P.D. (1990). From albumin to the cytoplasm: The hepatic uptake of organic anions. Dans: Popper, H., Schaffner, F. (Eds.). *Progress in Liver Diseases, Volume IX*, Grune and Stratton, New York, pp. 203-224.

Sperber, I. (1965). Biliary secretion of organic anions and its influence on the bile flow. Dans: Taylor, W. (Eds.). *The biliary system*, Blackwell, Oxford, p. 457-467.

Sperber, I. (1963). Biliary excretion and choleresis. *Proc. Int. Pharmacol. Meet.* 4: 137-143.

Stieger, B., Hagenbuch, B., Landmann, L., Höchli, M., Schroeder, A., Meier, P.J. (1994). In situ localization of the hepatocytic Na⁺/Taurocholate cotransporting polypeptide in rat liver. *Gastroenterology* 107: 1781-1787.

Stiehl, A. (1994). Pattern of bile acids in cholestasis. In Gentilini, P., Arias, I.M., McIntyre, N., Rodes, J. Eds. *Cholestasis*. New York: Elsevier Science, 231-238.

Stiehl, A., Czygan, P., Frohling, W., Liersh, M. and Kommerell, B. (1976). Sulfatation of bile acids. Dans: Bianchi, L., Gerok, W., Sickinger, K. (Eds.). *Liver and Bile*, University Park Press, Baltimore, pp. 129-138.

Stolz, A., Takikawa, H., Ooktens, M., Kaplowitz, N. (1989). The role of cytoplasmic proteins in hepatic bile acid transport. *Ann. Rev.* 51: 161-176.

Stolz, A., Takikawa, H., Sugiyama, Kuhlenkamp, J., Kaplowitz, N. (1987). 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity of Y' bile acid binders in rat liver cytosol. *J. Clin. Invest.* 79: 434-437.

Stolz, A., Sugiyama, Y., Kuhlenkamp, J., Kaplowitz, N. (1984). Identification and purification of a 36 KDa bile acid binder in human hepatic cytosol. *FEBS. Lett.* 177: 31-35.

Storch, J. and Schachter, D. (1983). A dietary regimen alters hepatocyte plasma membrane lipid fluidity and ameliorates ethinyl oestradiol cholestasis in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 798: 137-140.

Strange, R.C., Hume, R., Eadington, D.W., Nimmo, I.A. (1981). Distribution of glycholate in blood from human fetuses and adults. *Pediatr. Res.* 15: 1425-1430.

Strange, R.C., Nimmo, I. A., Percy-Robb, I.W. (1979). Studies in the rat on the hepatic subcellular distribution and biliary excretion of lithocholic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 588: 70-74.

Strazzabosco, M., Poci, C., Spirly, C., Sartori, L., Knuth, A. and Crepaldi, G. (1994).

Effect of ursodeoxycholic acid on intracellular pH in a bile duct epithelium-like cell line. *Hepathology* 19: 145-154.

Suchy, F.J., Courchene, S.M., Balisteri, W.F. (1985). Ontogeny of hepatic bile and conjugation in therat. *Pediatr. Res.* 19: 97-101.

Suchy, F.J., Balistreri, W.F., Hung, J., Miller, P., Garfield, S.A. (1983). Intracellular bile acid transport in rat liver as visualized by electron microscope autoradiography using a bile acid analogue. *Am. J. Physiol.* 245: G681-G689.

Sugiyama, Y., Yamada, T., Kaplowitz, N. (1983). Newly identified bile acid binders in rat liver cytosol. Purification and Comparison with glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 258: 3602-3607.

Swell, L., Entenman, C., Leong, G., Holloway, R.J. (1968). Bile acids and lipid metabolism: Influence of bile acids on biliary and liver organelle, phospholipids and cholesterol. *Am. J. Physiol.* 215: 1390-1396.

Takikawa, H., Ohki, H., Sano, N., Kasama, T., Yamanaka, M. (1991). Cholestasis induced by lithocholate and its glucuronide: their biliary excretion and metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1081: 39-44.

Takikawa, H., Stolz, A., Kuroki, S., Kaplowitz, N. (1990a). Oxidation and reduction of bile acid precursors by rat hepatic 3α -hydroxysteroid dehydrogenase and inhibition by bile acids and indomethacin. *Biochim. Biophys. Acta* 1043: 153-156.

Takikawa, H., Stolz, A., Sugiyama, Y., Yamanaka, M., Kaplowitz, N. (1990b). Relationship between the nwely identified bile acid binder and bile acid oxidoreductase in human liver. *J. Biol. Chem.* 265: 2132-2136.

Takikawa, H., Sano, N., Ohki, H. and Yamanaka, M. (1989). Comparison of biliary excretion and metabolism of lithocholic acid and its sulfate and glucuronide conjugate in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1004: 147-150

Takikawa, H., Kaplowitz, N. (1986). Binding of bile acids, oleic acid, and organic anions by rat and human hepatic Z protein. *Arch Biochem. Biophys.* 251: 382-385.

Tanikawa, K., Kawahara, T., Kumashiro, R. and Yoshitake, M. (1986). Effects of bile acids on the cultured hepatocytes and Kupffer cells (abstract). *Hepathology* 6: A779.

Terasaki, M. (1990). Recent progress on structural intractions of endoplasmic reticulum. *Cell. Motil. Cytoskel.* 15: 71-75.

Thibault, N., Maurice, M., Maratrat, M., Cordier, A., Feldmann, G. and Ballet, F. (1993). Effect of tauroursodeoxycholate on actin filament alteration induced by cholestatic agents. A study in isolated rat hepatocyte couplts. *J. Hepato.* 19: 367-376.

- Thibault, N. and Ballet, F (1993). Effect of bile acids on intracellular calcium in isolated rat hepatocyte couplets. *Biochem. Pharmacol.* 45:289-293.
- Tuchweber, B., Roy, S., Deroces, S., Yousef, I. M., Gicquaud, C., Weber, A.M. and Loranger, A. (1990). Effects of bile acids on actin polymerization in vitro. *Life Sci.* 47:1299-1307.
- Tuchweber, B., Weber, A., Roy, C.C. and Yousef, I.M. (1986). Mechanism of experimentally induced cholestasis. In Popper, H., Schaffner, F. Eds. Grune and Stratton, New York. *Progress in liver diseases* 6: 161-178.
- Utili, R., Tripodi, M.F., Adinolfi, L.E., Gaeta, G.B., Abernathy, C.O., Zimmerman, H.J. et al. (1990). Oestradiol-17 β -D-glucuronide (E-17-G) cholestasis in perfused rat liver: fate E-17-G and choleric response to bile salts. *Hepatology* 11: 735-742.
- Vadakekalam, J., Gores, G.J. (1992). Ursodeoxycholate cytoprotection against hepatocyte killing by hydrophobic bile salts cannot be explained solely by changes in the hydrophobicity index (abstract). *Hepatology* 16: 134A.
- Van Berge Henegouwen, G.P., Brandt, K.H., Eysen, H., Parmentier, G. (1976). Sulfated and unsulfated bile acids in serum bile and urine of patients with cholestasis. *Gut* 17: 861-869.
- Van Blitterswijk, W.J., Van der Meer, B.W., Hilkmann, H. (1987). Quantitative contribution of cholesterol and the individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl unsaturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarisation. *Biochemistry* 26: 1746-1756.
- Van Ginkel, G., Van Langen, H., Levine, Y.K. (1989). The membrane fluidity concept revisited by polarized fluorescence spectroscopy on different model membranes containing unsaturated. *Lipids and sterols.* 71: 23-32.
- Van Meer, G. (1989). Lipid traffic in animal cells. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 5: 247-275.
- Van Nieuwerk, C.M., Groen, A.K., Ottenhoff, R., van Wijland, M., van den Bergh Weerman, M.A., Tytgat, G.N., Offerhaus, J.J., Elferink Oude, R.P. (1997). The role of bile salt composition in liver pathology of mdr2 (-/-) mice differences between males and females. *J. Hepatol.* 26:138-145.
- Vu, D.D., Tuchweber, B., Plaa, G. and Yousef, I.M. (1992). Pathogenesis of lithocholate-induced intrahepatic cholestasis: Role of glucuronidation and hydroxylation of lithocholate. In *Biochimica Biophysica Acta* 1126: 53-59.
- Vu D.D., Tuchweber, B., Raymond, P. and Yousef, I.M. (1992). Tight junction permeability and liver plasma membrane fluidity in lithocholate-induced cholestasis. *Exp. Mol. Pathol.* 57: 47-61.

- Vu, D.D., Tuchweber, B., Plaa, G.L. and Yousef, I.M. Do intracellular ca^{++} activity and hepatic glutathione play role in the pathogenesis of lithocholic acid induced cholestasis? *Toxicol. lett.* 61:255-264.
- Weiman, S.A., Graf, J., Boyer, J.L. (1989). Voltage-driven taurocholate dependent secretion in isolated hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 5: 110-112.
- Weisiger, R.A., Gollan, J.L., Ockner, R.K. (1982). The role of albumin in hepatic uptake processes. Dans: Popper, H., Schaffner, F. (Eds.). *Progress in Liver Diseases*, Vol. VII, Grune and Stratton, New York, p. 71-85.
- Yoon, Y.B., Hagey, L.R., Hofmann, A.F., Gurantz, D., Michelotti, E.L. and Steinbach, J.H. (1986). Effect of side-chain shortening on the physiologic properties of bile acids: hepatic transport and effect on biliary secretion of 23-ursodeoxycholate in rodents. *Gastroenterology* 90: 837-852.
- Yousef, I.M., Bouchard, G., Tuchweber, B. and Plaa, G.L. (1997). Monohydroxy bile acid induced cholestasis: Role of biotransformation. In *Drud Metabolism Reviews*, 29: 167-181.
- Yousef, I.M., Migneault, D and Tuchweber, B. (1992). Effect of complete sulfation of bile acids on bile formation: role of conjugation and number of sulfate groups. *Hepatology*, 15: 438-445.
- Yousef, I.M., Tuchweber, B., Morazain, R., Kugelmass, R., Gauvin, M., Roy, C.C. and Weber, A. (1988). Cholesterol synthesis in the pathogenesis of lithocholic acid-induced cholestasis. *Lipids*, 23: 230-232.
- Yousef, I.M., Barnwell, S., Gratton, F., Tuchweber, B., Weber, A. and Roy, C.C. (1987). Liver cell membrane solubilization may control maximum secretory rate of cholic acid in the rat. *Am. J. Physiol.* 252: G84-G91.
- Yousef, I.M., Barnwell, S.G., Tuchweber, B., Weber, A., Roy, C.C. (1987). Effect of complete sulfation of bile acids on bile formation in rats. *Hepatology* 7: 535-542.
- Yousef, I.M., Lewittes, M., Roy, C.C., Weber, A. and Tuchweber, B. (1984). Lithocholic acid-cholesterol interactions in the rat plasma membrane fraction. *Biochim. Bio phys. Acta*, 796: 345-354.
- Yousef, I.M., Tuchweber, B. and Weber, A. (1983). Prevention of lithocholate-induced cholestasis by cycloheximide an inhibitor of protein synthesis. *Life, Sci.* 33: 103-110.
- Yousef, I.M., Tuchweber, B., Von, R.J. et al. (1981). Lithocholate cholestasis-sulATED glycolithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterology*, 80: 233-241.
- Yousef, I.M., Fisher, M.M. (1976b). In vitro effect of free bile acids on the bile

canalicular membrane phospholipids in the rat. *Can. J. Biochem.* 54: 1040-1046.

Zimmerli, B., Valantinas, J., Meier, P.J. (1989). Multispecificity of Na⁺ dependent taurocholate uptake in basolateral (sinusoidal) rat liver plasma membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250: 301-308.

Zimniak, P., Holsztsynska, E.J., Lester, R., Waxman, D.J. and Radomska, A. (1989). Detoxification of lithocholic acid. Elucidation of the pathways of oxidative metabolism in rat liver microsomes. *J. Lipid Res.* 30: 907-918.