

2m11, 2853.9

Université de Montréal

**Le rôle de la phosphatidylcholine dans la prévention
de la lithiase cholestérolique chez les souris génétiquement susceptibles**

Par

Joelle Kasbo

Département de Pharmacologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en pharmacologie

Octobre, 2000

© Joelle Kasbo, 2000



W
4
1158
2001
N, 035

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Le rôle de la phosphatidylcholine dans la prévention
de la lithiase cholestérolique chez les souris génétiquement susceptibles**

présenté par **Joelle Kasbo**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Abraham YOUSSEF - Directeur
Richard L. Mompalao - membre
Louis Dement - président

Mémoire accepté le : *02.02.2001*

Sommaire

La formation des calculs biliaires est principalement due à la précipitation des cristaux de cholestérol de la bile sursaturée en cholestérol et à la présence des agents pro- ou antinucléants. De plus, il est établi que la génétique et la diète contribuent grandement à ce phénomène. La supplémentation de la diète en phosphatidylcholine (PC) améliore la formation de la bile en augmentant le transport maximal des acides biliaires et la sécrétion des lipides biliaires. Les phospholipides sont importants pour maintenir la solubilité du cholestérol dans la bile et le tiers de la PC biliaire origine de la PC de la diète. L'objectif de cette étude est de tester l'effet d'une supplémentation de la diète en PC sur l'incidence des calculs biliaires de cholestérol. Pour ce faire, des souris C57BL/6J, génétiquement susceptibles à la formation des calculs biliaires de cholestérol lorsque nourries avec une diète lithogénique (contenant 1% de cholestérol et 0,5% d'acide cholique), ont été utilisées. Un premier groupe a reçu la diète lithogénique et un second groupe la diète lithogénique enrichie à 2 ou 6% en PC.

Les résultats ont montré que la supplémentation en PC à 2% retarde la formation de calculs biliaires de cholestérol. Ceci a été associé avec une réduction de l'indice de saturation en cholestérol et avec une augmentation significative de la concentration de la protéine antinucléante hépatique (APF). Cependant, l'augmentation de la supplémentation à 6% en PC, prévient complètement la formation de calculs biliaires de cholestérol et ceci par une réduction significative de l'indice de saturation de la bile hépatique en cholestérol et par l'augmentation significative du flux biliaire et de la sécrétion biliaire des acides biliaires et des phospholipides.

En conclusion, la supplémentation en PC a un effet bénéfique sur la prévention de la formation des calculs biliaires de cholestérol chez les souris génétiquement susceptibles à la lithiase cholestérolique.

Tables de matières

Sommaire.....	ii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiii
1. Revue de bibliographie.....	1
1.1. Composition de la bile.....	1
1.1.1. Les acides biliaires.....	1
1.1.1.1. Structure et biosynthèse.....	1
1.1.1.2. Conjugaison.....	1
1.1.1.3. Cycle entérohépatique.....	2
1.1.1.4. Captation et transport intracellulaire des acides biliaires.....	2
1.1.1.5. Sécrétion des acides biliaires.....	3
1.1.1.6. Propriétés physicochimiques.....	3
1.1.2. Les phospholipides.....	4
1.1.2.1. Distribution des phospholipides.....	4
1.1.2.2. Origines et biosynthèse de la phosphatidylcholine.....	4
1.1.2.3. Absorption de la phosphatidylcholine.....	5
1.1.2.4. Sécrétion des phospholipides.....	5
1.1.2.5. Rôle des phospholipides.....	6
1.1.3. Le cholestérol.....	6

1.1.3.1. Sources et biosynthèse du cholestérol.....	6
1.1.3.2. Élimination du cholestérol.....	7
1.1.3.3. Solubilisation du cholestérol.....	7
1.1.3.4. Sécrétion du cholestérol.....	7
1.1.4. Les protéines.....	10
1.2. La lithiase biliaire.....	11
1.2.1. Types et composition des calculs biliaires.....	11
1.2.2. Prévalence.....	11
1.3. La lithiase cholestérolique.....	12
1.3.1. Facteurs de risque.....	12
1.3.1.1. Les estrogènes.....	12
1.3.1.2. La grossesse.....	12
1.3.1.3. L'obésité et la perte rapide de poids.....	12
1.3.1.4. L'âge.....	13
1.3.1.5. L'hypomotilité intestinale.....	13
1.3.1.6. La diète.....	13
1.3.1.7. L'hyperlipidémie.....	14
1.3.1.8. Le risque génétique.....	14
1.3.1.9. Les médicaments altérant l'homéostasie du cholestérol.....	14
1.3.1.10. Le jeûne.....	15
1.3.2. Modèles animaux.....	16
1.3.2.1. Le hamster.....	16
1.3.2.2. Le lapin.....	17
1.3.2.3. La souris.....	17

1.3.2.4. Le chien de prairie.....	18
1.3.2.5. L'écureuil.....	19
1.3.3. Étapes de la formation des calculs biliaires de cholestérol.....	20
1.3.3.1. Sursaturation de la bile en cholestérol.....	20
1.3.3.1.1. L'indice de saturation en cholestérol.....	21
1.3.3.1.2. Formation des cristaux de cholestérol.....	21
1.3.3.1.3. Diagramme de phase ternaire.....	22
1.3.3.2. La nucléation du cholestérol.....	25
1.3.3.2.1. Promoteurs de nucléation.....	25
1.3.3.2.1.1. La boue biliaire.....	26
1.3.3.2.2. Inhibiteurs de nucléation.....	26
1.3.3.2.2.1. Rôle des acides biliaires dans la nucléation du cholestérol.....	27
1.3.3.2.2.2. Rôle de la phosphatidylcholine dans la nucléation du cholestérol.....	27
1.3.3.3. Croissance des calculs biliaires.....	28
1.4. Rôles de la vésicule biliaire dans la lithiase cholestérolique.....	30
1.4.1. Rôle absorbant.....	30
1.4.1.1. Absorption des acides biliaires et des lipides biliaires.....	30
1.4.2. Rôle sécrétoire.....	31
1.4.2.1. Hypersécrétion de la mucine.....	31
1.4.3. Rôle moteur.....	31
1.4.3.1. Hypomotilité de la vésicule biliaire.....	32
1.4.4. Rôle de synthèse.....	32

1.5.	Rôle des intestins dans la lithiase cholestérolique.....	33
1.5.1.	Métabolisme intestinal des acides biliaires.....	33
1.6.	Traitement médical de la lithiase cholestérolique.....	34
1.6.1.	Cholécystéctomie.....	34
1.6.2.	Dissolution des calculs biliaires.....	34
1.6.2.1.	Thérapie avec les acides biliaires oraux.....	34
1.6.2.1.1.	Efficacité.....	35
1.6.2.1.2.	Effets secondaires.....	36
1.6.2.1.3.	Récurrence des calculs biliaires.....	37
1.6.2.2.	Perfusion des solvants.....	37
1.6.2.2.1.	Monooctanoine.....	37
1.6.2.2.2.	Methyl Tert-Butyl Ether.....	38
1.7.	Prévention de la lithiase cholestérolique.....	39
2.	Hypothèses de recherche et objectifs.....	40
3.	Matériels et méthodes.....	42
3.1.	Modèle animal.....	42
3.2.	Diète.....	42
3.3.	Procédures chirurgicales.....	45
3.4.	Dosages lipidiques de la bile.....	46
3.5.	Mesure de la concentration d'APF.....	46
3.6.	Analyse des acides biliaires.....	46
3.7.	Analyse du profil de conjugaison des acides biliaires.....	48
3.8.	Identification des espèces moléculaires des phospholipides.....	49
3.9.	L'indice de saturation en cholestérol.....	49
3.10.	Analyses statistiques.....	50

4. Résultats	51
4.1. Consommation alimentaire.....	51
4.2. Poids corporel et poids du foie.....	51
4.3. Formation des calculs biliaires de cholestérol.....	54
4.4. Effets des différentes diètes sur le flux biliaire et la sécrétion des acides biliaires et des lipides biliaires.....	54
4.5. Profil des acides biliaires présents dans la bile hépatique.....	59
4.6. Profil des phospholipides biliaires hépatiques et leur composition en acides gras.....	65
4.7. Compositions lipidiques de la bile vésiculaire.....	65
4.8. L'indice de saturation de cholestérol.....	71
4.9. La concentration d'APF dans la bile hépatique et vésiculaire.....	71
5. Discussion et conclusion	77
6. Bibliographie	85

Liste des tableaux

Tableau I : Composition des différentes diètes.....	44
Tableau II : Effet des régimes LG et LG + 2% PC sur le poids corporel et le poids du foie des souris après 4 et 8 semaines de traitement.....	52
Tableau III : Effet des régimes LG, LG + 6% PC et témoin sur le poids corporel et le poids du foie des souris après 4 et 8 semaines de traitement.....	53
Tableau IV : Incidence de la formation des pré-calculs et des calculs biliaires de cholestérol chez les souris soumises aux diètes LG, LG +2% PC et témoin.....	56
Tableau V : Composition en acides biliaires de la bile hépatique des différents groupes de souris.....	60
Tableau VI : Compositions lipidiques de la bile vésiculaire chez les différents groupes de souris.....	70

Liste des figures

Figure 1 : Structure des micelles mixtes et des vésicules.....	9
Figure 2 : Diagramme de phase ternaire.....	24
Figure 3 : Le débit biliaire et la sécrétion des acides biliaires, des phospholipides et du cholestérol hépatiques pendant 1 heure de collection chez les souris soumises à la diète lithogénique (LG) et lithogénique + 2% de phosphatidylcholine (LG+2%PC) après 4 et 8 semaines de traitement.....	57
Figure 4 : Le débit biliaire et la sécrétion des acides biliaires, des phospholipides et du cholestérol hépatiques pendant 1 heure de collection chez les souris soumises à la diète lithogénique (LG), lithogénique+6%phosphatidylcholine (LG+6%PC) et témoin après 4 semaines de traitement.....	58
Figure 5 : Spectre des acides biliaires conjugués à la taurine présents dans la bile d'une souris soumise à la diète LG après 4 semaines.....	61
Figure 6 : Spectre des acides biliaires conjugués à la glycine présents dans la bile d'une souris soumise à la diète LG après 4 semaines.....	62
Figure 7 : Spectre des acides biliaires conjugués à la taurine présents dans la bile d'une souris soumise à la diète LG + 2% PC après 4 semaines.....	63
Figure 8 : Spectre des acides biliaires conjugués à la glycine présents dans la bile d'une souris soumise à la diète LG + 2% PC après 4 semaines.....	64
Figure 9 : Spectre des espèces de PC présentes dans la PC extraite des grains de soya et ajoutée à la diète LG.....	67
Figure 10 : Spectres des PL ayant le groupement choline chez les groupes LG et LG + 2% PC.....	68
Figure 11 : Spectres des PL ayant le groupement choline chez le groupe témoin.....	69
Figure 12 : L'indice de saturation en cholestérol de la bile hépatique et vésiculaire des souris soumises à la diète LG ou LG+2%PC après 4 et 8 semaines de traitement.....	73
Figure 13 : L'indice de saturation en cholestérol de la bile hépatique et vésiculaire des souris soumises à la diète LG, LG+6%PC ou témoin après 4 semaines de traitement.....	74
Figure 14 : La concentration d'APF présente dans la bile hépatique et vésiculaire des souris soumises à la diète LG ou LG + 2% PC après 4 et 8 semaines de traitement.....	75

Figure 15 : La concentration d'APF présente dans la bile hépatique et vésiculaire des souris soumises à la diète LG, LG + 6% PC ou témoin après 4 semaines de traitement76

Liste des abréviations

Acides biliaires

AB:	Acides biliaires
DOC:	'Deoxycholic acid'
CA:	'Cholic acid'
CDC:	'Chenodeoxycholic acid'
G-diOH	'Glycodihydroxycholic acid'
G-triOH	'Glycotrihydroxycholic acid'
LCA:	'Lithocholic acid'
Muri:	'Murideoxycholic acid'
T-diOH	'Taurodihydroxycholic acid'
T-triOH	'Taurotrihydroxycholic acid'
Urso:	'Ursodeoxycholic acid'

Autres

ABC	'ATP-binding cassette'
APF:	'Anionic Polypeptide Fraction'
ATP	Adénosine triphosphate
BLC	'Bile Lipoprotein Complex'
CBP	'Calcium binding protein'
CSI	'Cholesterol saturation index'
GC-MS	'Gas Chromatography Mass-Spectroscopy'
Gp330	'Glycoprotein 330 gene'
HDL	'High Density Lipoprotein'
LC-MS-MS	'Liquid Chromatography Mass-Spectroscopy Mass-Spectroscopy'
LDL	'Low Density Lipoprotein'
<i>Ldlr</i>	'Low Density Lipoprotein receptor gene'
LG	lithogénique
LysoPC	Lysophosphatidylcholine
MDR2	'multidrug resistance protein p-glycoprotein'
<i>mdr2</i>	'multidrug resistance protein p-glycoprotein gene'
MRP2	'multidrug resistance related protein'
MTBE	'Methyl Tert-Butyl Ether'
NTCP	'Na ⁺ -taurocholate-cotransporting protein'
OATP-1	'organic anion-transporting polypeptide-1'
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PL	phospholipides
SPGP	'sister p-glycoprotein'
<i>SPGP</i>	'sister p-glycoprotein gene'
Sr-b1	'class B Scavenger receptor'

Remerciements

En feuilletant mes 2 années de maîtrise sous la directive judicieuse de Dr Yousef, je me rend compte que mes rencontres et collaborations enrichissantes avec Dr Tuchweber et Dr Lafont m'ont permis d'élargir mes connaissances scientifiques. Tout ceci ne me serait pas arrivé sans le précieux accueil, la présence et le suivi constant de Dr Yousef. Je vous remercie sincèrement.

Je remercie également Maurice Audet pour son aide technique dans la mise au point de la technique chirurgicale. J'adresse un grand merci à mes collègues de travail, Fatiha pour ses conseils précieux et surtout à Myriam pour son amitié inestimable et authentique.

Je remercie Dieu de m'avoir privilégiée en m'entourant d'un si bon cadre. Tous ces bons atouts m'ont été accordés grâce aux prières de mes chers parents, qui m'ont entourée d'un environnement serein et reposant pour me permettre de me donner entièrement à mes études.

À mes chers parents,

1. Revue de bibliographie

1.1. Composition de la bile

La bile est une solution aqueuse composée d'environ 95% d'eau et 5% de matière solide. Dans la fraction solide, on retrouve 67% d'acides biliaires (AB), 22% de phospholipides (PL), 4% de cholestérol (CH), 4,5% de protéines et 0,3% de pigments biliaires. De plus, des acides aminés, des hormones, des vitamines ainsi que des électrolytes s'y retrouvent en traces. (Carey et Duane, 1994). Les AB, les PL, le CH et les protéines vont être discutés en détails.

1.1.1. Acides biliaires

1.1.1.1. Structure et biosynthèse

La majorité des AB comporte 24 carbones. Les AB sont constitués d'un noyau stéroïdien, site d'hydroxylations successives et d'une chaîne aliphatique latérale de longueur variable se terminant par un acide carboxylique. Ils sont synthétisés exclusivement par le foie à partir du CH *via* une cascade impliquant au moins 15 enzymes. Deux voies de biosynthèse distinctes ont été décrites; la voie classique et la voie alternative qui aboutissent à la formation de deux principaux AB (primaires) soit l'acide cholique (trihydroxylé) (CA) et l'acide chénodéoxycholique (dihydroxylé) (CDC) (Vlahcevic, 1999).

1.1.1.2. Conjugaison

Après leur synthèse, les AB sont soit, conjugués à la glycine ou à la taurine et ceci en grande proportion soit, conjugués en faible quantité à un acide glucuronique, un sulfate,

un glucose ou un N-acétyl-glucosamine pour former des dérivés estérifiés (Hofmann, 1994). La conjugaison permet aux AB de rester en solution en les rendant plus hydrophiles; celle-ci est nécessaire à leur transport et leur sécrétion (Balisteri et *al*, 1983).

1.1.1.3. Cycle entérohépatique

Au niveau intestinal, 95% des AB sont réabsorbés pour retourner, *via* la veine porte, au foie où ils sont à nouveau sécrétés dans la bile pour suivre un cycle entérohépatique. Les AB non réabsorbés (200 à 500 mg/jour) parviennent au niveau du côlon où ils pourront être déconjugés puis déhydroxylés (7-alpha- déhydroxylation) par les bactéries intestinales pour former des acides biliaires secondaires. Ainsi, l'acide déoxycholique (dihydroxylé) (DOC) est l'AB secondaire dérivé du CA, les acides lithocholique (monohydroxylé) (LCA) et ursodéoxycholique (dihydroxylé) (Urso) sont dérivés du CDC (Carey et Duane, 1994).

1.1.1.4. Captation et transport intracellulaire des acides biliaires

La captation des AB par les hépatocytes est médiée par un système dépendant du sodium, la NTCP (Na⁺-taurocholate-cotransporting protein) (Meier et *al*, 1997) et par un système indépendant du sodium, le OATP-1 (organic anion-transporting polypeptide-1) (Dumont et *al*, 1997). La ntcp et l'oatp1 sont localisés exclusivement à la membrane sinusoidale. Une fois captés, les AB doivent être transportés pour atteindre la membrane canaliculaire. Le processus précis de ce transport intracellulaire est inconnu. Cependant, deux voies différentes de transport sont postulées. La première propose la diffusion cytosolique en association avec des protéines de liaison intracellulaire (Stolz et *al*, 1987). La protéine de liaison cytosolique majeure est

l'oxidoréductase, un membre de la superfamille Aldo-Keto reductase (Takikawa *et al*, 1986). La deuxième voie de transport suggérée implique les vésicules intracellulaires (Erlinger, 1996).

1.1.1.5. Sécrétion des acides biliaires

Des études fonctionnelles ont révélé la présence de 2 systèmes dépendant d'ATP (adénosine triphosphate) impliqués dans le transport des AB localisés dans la membrane canaliculaire (Wolkoff *et al*, 1998; König *et al*, 1999). La SPGP (sister p-glycoprotein) qui constitue le système de transport majeur est un membre de la super famille ABC (ATP-binding cassette) (Childs *et al*, 1995a). La protéine MRP2 (multidrug resistance protein) a été identifiée comme transporteur d'une grande variété d'AB conjugués (Paulusma *et al*, 1997). Toutefois, Ortiz *et al* (1999), ont rapporté l'identification d'un autre membre de la famille des MRP, le MRP3. Celui-ci semble médier le transport des AB qui ont une faible affinité pour le transporteur majeur.

1.1.1.6. Propriétés physicochimiques

Les AB sont des lipides polaires et amphiphiliques qui possèdent une partie hydrophobe (le noyau stéroïdien) et une partie hydrophile à cause des groupements hydroxyles. Ce caractère amphiphilique leur confère la propriété de s'assembler en micelles. En milieu aqueux, les AB, à faible concentration, existent à l'état de monomères et au-dessus d'une concentration dite concentration micellaire critique, ils forment des micelles simples (primaires). Les AB ont un rôle physiologique important. En effet, ils constituent de puissants détergents naturels capables de solubiliser et de faciliter l'absorption intestinale des lipides alimentaires et peuvent également incorporer d'autres types de molécules hydrophobes (CH, PL et acides gras) sous forme de

micelles mixtes. Ils permettent également la sécrétion biliaire du CH endogène ou exogène, sous forme de CH libre ou après transformation en AB (Carey et Duane, 1994).

1.1.2. Les phospholipides

1.1.2.1. Distribution des phospholipides

Le principal PL biliaire est la phosphatidylcholine (PC ou lécithine) (environ 95%). Plus particulièrement la 1-palmitoyl,-2-linoléyl- (16 :0-18 : 2) et la 1-palmitoyl,-2-oléoyl- (16 :0-18 :0) Sn-glycérophosphocholines. D'autres PL se trouvant également dans la bile en faibles quantités sont la phosphatidyléthanolamine (PE), la lysophosphatidylcholine (LysoPC), la sphingomyéline et la phosphatidylsérine (Robins *et al*, 1991).

1.1.2.2. Origines et biosynthèse de la phosphatidylcholine

Dans l'organisme, les PC ont diverses origines : la synthèse *de novo*, alimentaire et biliaire. La source majeure des PL biliaires est le pool préformé (microsomial et extrahépatique) (Chanussot *et al*, 1990). En fait, Portal *et al*. (1993) ont démontré que la contribution du pool extrahépatique constitué principalement des lipoprotéines HDL (High Density Lipoprotein) s'élève à 38% et celle du pool intrahépatique microsomial à 44% et que, par contre, la synthèse *de novo* ne contribue qu'à 14% pour la principale voie de biosynthèse à partir de la CDP-choline, appelée la voie de Kennedy (Kennedy *et*

Weiss, 1956) et de 1 à 4% pour la voie de méthylation de PE en PC décrite par Bremer et Greenberg (1961).

1.1.2.3. Absorption de la phosphatidylcholine

La PC apportée soit par l'alimentation ou par la bile est absorbée au niveau du duodénum. Il a été démontré que l'administration de la PC par voie orale augmente la sécrétion de la PC biliaire sans affecter leur composition en acides gras (Rioux et *al*, 1988). De plus, le flux biliaire est augmenté significativement et ceci est associé à l'augmentation du taux de sécrétion des AB, des PL et du CH dans la bile (Rioux et *al*, 1994).

La PC alimentaire est métabolisée en LysoPC, en acides gras et en choline (Rioux et *al*, 1994). Cependant, des études ont démontré qu'une partie de la PC peut échapper à l'hydrolyse pendant la digestion et être incorporée sans altération dans le foie avec des petites quantités sécrétées dans la bile (Paul et *al*, 1978). De plus, il a été suggéré que la PC hydrolysée en choline est transférée de l'intestin vers les HDL plasmatiques (Martins et *al*, 1989).

1.1.2.4. Sécrétion des phospholipides

La sécrétion des PL est complexe car elle implique celle des AB (Cronholm et *al*, 1983) et la solubilisation ultérieure des PL de la membrane canaliculaire par les AB. Plusieurs étapes dans ce processus n'ont pas été identifiées et le mécanisme par lequel les AB extraient les PL de la membrane sans l'endommager est inconnu (Oude Eferink et

Groen, 1999). Toutefois, un autre membre de la famille ABC, le MDR2 (multidrug resistance protein p-glycoprotein), a été démontré comme étant un transporteur des PL d'un côté à l'autre de la membrane canaliculaire (Van Nieuwerk et *al*, 1997). La nécessité de cette étape a été démontrée avec l'absence de la sécrétion des PL chez les souris qui sont *mdr2* *-/-* (Van Nieuwerk et *al*, 1997).

1.1.2.5. Rôles des phospholipides

La sécrétion biliaire des PL est cruciale pour la protection des cellules le long de l'arbre biliaire de l'action détergente des AB. Ces cellules sont continuellement exposées aux AB durant la sécrétion biliaire du site de formation jusqu'au duodénum (Benedetti et *al*, 1997). Ce rôle a été mis en évidence par les études qui ont démontré, chez les souris *mdr2* *-/-*, que l'absence de PL dans la bile cause des dommages aux cellules biliaires ductulaires (Smit et *al*, 1993). Un deuxième rôle important de la sécrétion biliaire des PL est la solubilisation du CH, prévenant probablement sa cristallisation et la formation de calculs biliaires de CH (Ronald et *al*, 1999).

1.1.3. Le cholestérol

1.1.3.1. Sources et biosynthèse du cholestérol

La plus grande partie du CH biliaire provient surtout du CH des HDL (Botham et Bravo, 1995). D'autres sources sont la biosynthèse *de novo* à partir de l'acétate (cascade de plus que 15 étapes enzymatiques) ou du stockage intra-hépatique du CH estérifié.

1.1.3.2. Élimination du cholestérol

La seule voie significative d'élimination du CH est sa sécrétion dans la bile que ce soit directement ou après transformation en AB.

1.1.3.3. Solubilisation du cholestérol

Le CH étant insoluble dans l'eau, il est solubilisé par les PL et ensemble ils forment des vésicules (fig.1). Ces vésicules sont solubilisées par la suite par les AB pour former des micelles mixtes (Strasberg et Harvey, 1990).

Le CH peut être également solubilisé mais à un degré moindre par des micelles simples d'AB (Carey et *al*, 1981). Finalement, les apolipoprotéines biliaires, comme les AB, ont le pouvoir d'interagir avec la lécithine et solubiliser le CH dans leur noyau hydrophobe (Kibe et *al*, 1984). Chez certains sujets, on a rapporté que plus que la moitié du CH était solubilisée dans des complexes lipoprotéiques dépourvus complètement d'AB (Pattinson, 1985).

1.1.3.4. Sécrétion du cholestérol

La sécrétion du CH est la moins connue de celles des constituants biliaires. Plusieurs études ont démontré que la sécrétion de la PC et celle du CH sont couplées (Oude Elferink et *al*, 1996). L'observation que les souris ,''knockout'' du gène *mdr2*, ne sécrètent ni PL ni CH, confirme cette affirmation (Smit et *al*, 1993). Cependant, chez les souris hétérozygotes *mdr2*, la diminution de 40% de la sécrétion des PL est accompagnée d'une sécrétion normale de CH (Oude Elferink et *al*, 1995). Ceci

démontre que l'absence de la sécrétion de PL est le défaut principal causé par la perturbation du gène *mdr2*, tandis que l'absence de la sécrétion de CH est secondaire (Oude Eferink et Groen, 1999).

Il a été également démontré que chez les souris *mdr2* ^{-/-}, la sécrétion de CH pourrait être induite par l'augmentation de l'hydrophobicité du ``pool`` des AB (Oude Elferink et al, 1996). Donc, la capacité réduite des souris ``knockout`` du gène *mdr2* à sécréter le CH pourrait être expliquée par le fait que les micelles simples d'AB ont moins d'affinité pour le CH que les micelles mixtes qui contiennent des PL (Carey et Small, 1978a).

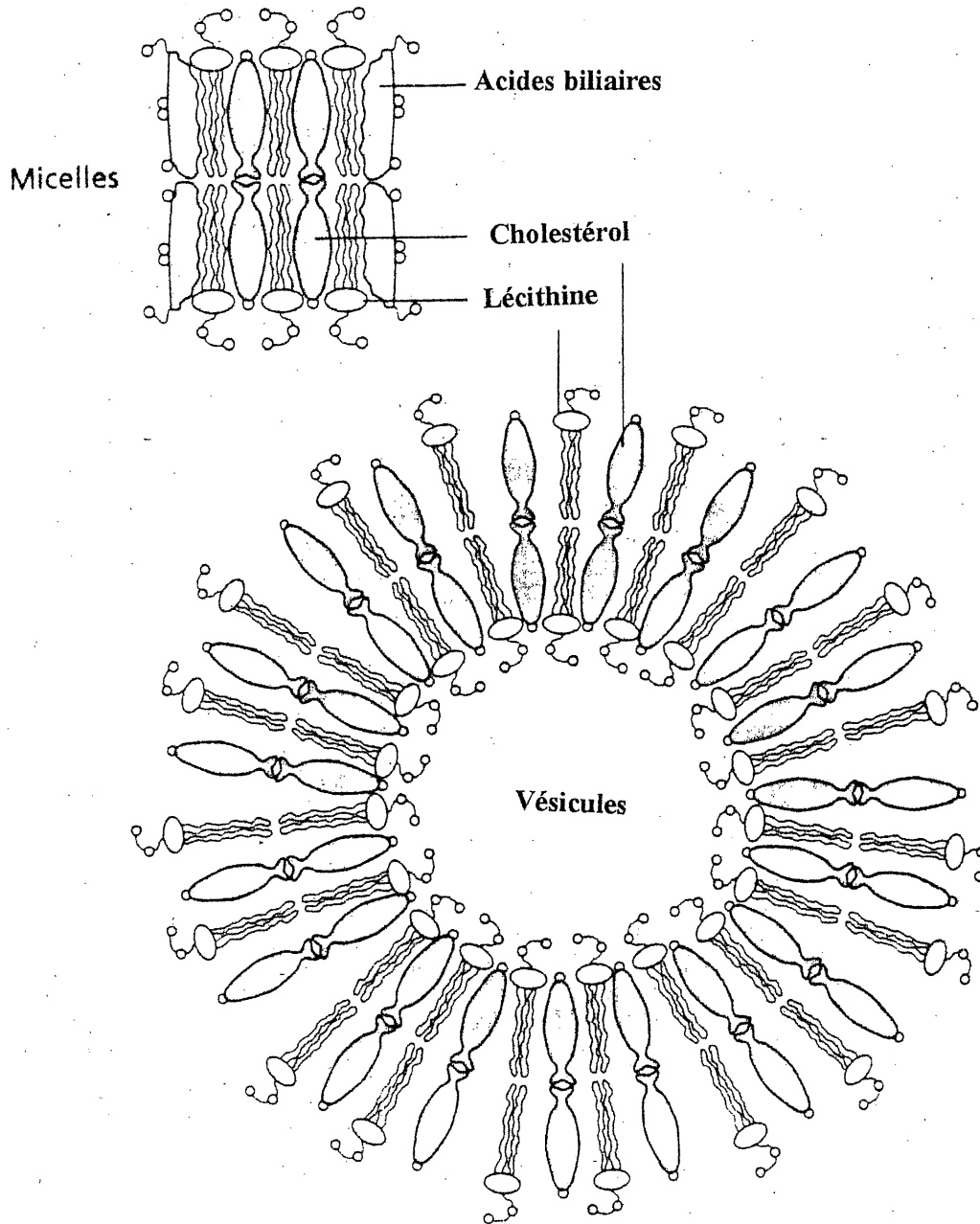


Fig. 1. Structure des micelles mixtes et des vésicules. (Tiré de Sherlock et Dooley, 1997)

1.1.4. Les protéines

Plusieurs protéines sont présentes dans la bile des mammifères et leur concentration varie selon l'espèce. D'autres protéines d'origine plasmatique contribuent en grande partie, l'albumine est la protéine la plus abondante, les autres sont les IgA, IgG et l' α 2-macroglobuline. Hauton et *al* (1982) ont mis en évidence une association entre les lipides et les protéines biliaires sous forme d'un complexe lipoprotéique (BLC) (Bile Lipoprotein Complex). Ce complexe comporte l'APF (Anionic Polypeptide Fraction). L'APF est une petite protéine hydrophobe de 7,5 KD. Elle est la 3^{ème} protéine en abondance dans la bile humaine (Domingo et *al*, 1993). L'APF associée aux PL pourrait jouer un rôle dans le transport du CH libre, dans son trajet plasmatique (APF étant une apoprotéine mineure des HDL), dans sa captation par les membranes et dans sa sécrétion dans la bile (Martigne et *al*, 1988). Les autres protéines, d'origine sécrétoire, sont représentées par les mucoprotéines et sont composées d'une chaîne polypeptidique et de polysaccharides.

1.2. La Lithiase biliaire

La lithiase biliaire est la maladie la plus commune du tractus biliaire. C'est une série d'étapes complexes qui résulte en la précipitation des substances insolubles tels que le CH, les pigments biliaires et les sels de calcium, quand leur concentration excède la capacité des AB à les solubiliser (Donovan, 1999). Les calculs biliaires se forment dans l'arbre biliaire mais surtout dans la vésicule biliaire.

1.2.1. Types et composition des calculs biliaires

- a) **Cholestérol** : contient d'une façon prédominante des cristaux de CH à l'état pur ou aggloméré à une matrice de mucine (Trotman et *al*, 1974).
- b) **Pigment noir** : contient des sels de calcium de bilirubine non conjuguée, du carbonate de calcium et du phosphate de calcium. La présence de ce dernier composé rend le calcul plus opaque (Malet et *al*, 1984).
- c) **Pigment brun** : c'est le résultat de la dégradation bactérienne des produits de lipides biliaires, sels de calcium, des acides gras et de bilirubine non conjuguée (Cetta, 1986).

1.2.2. Prévalence

À chaque année, plus qu'un million de personnes seront diagnostiquées comme présentant des calculs biliaires. Ils vont s'ajouter aux 20 millions d'Américains déjà diagnostiqués (Everhart et *al*, 1999). 80% des calculs biliaires chez les occidentaux sont composés de CH.

1.3. La lithiase cholestérolique

1.3.1. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs amènent à la production de la bile qui contient un excès de CH.

1.3.1.1. Les estrogènes

Les estrogènes endogènes (retrouvées en plus grande quantité durant la puberté ou la grossesse) ou exogènes (contraceptifs oraux ou thérapie hormonale) diminuent la synthèse des AB (Tritapeppe et *al*, 1976) et augmentent la capture des LDL (Low Density Lipoprotein). Ceci a comme conséquence d'augmenter la saturation biliaire en CH en stimulant la sécrétion hépatique du celui-ci (Everson et *al*, 1991).

1.3.1.2. La grossesse

La grossesse est une période à haut risque parce que l'estrogène induit l'hypersécrétion du CH et la progestérone diminue le pool des AB (Everson, 1992) et la motilité de la vésicule biliaire (Everson, 1993).

1.3.1.3. L'obésité et la perte rapide de poids

La lithiase cholestérolique est augmentée de 3 à 4 fois chez les obèses comparativement aux sujets normaux (Bennion et Grundy, 1975). L'activité de la HMG-COA réductase chez les obèses est augmentée ce qui induit l'augmentation de la synthèse du CH

(Angelin et *al*, 1982). Également, durant un régime sévère, la lithogénicité de la bile est élevée car le corps métabolise trop de gras et ainsi le foie sécrète plus de CH dans la bile (Everhart, 1993).

1.3.1.4. L'âge

Les personnes âgées de plus que 60 ans sont plus à risque car avec l'âge, l'activité de la cholestérol 7 α -hydroxylase responsable de la conversion du CH en AB, diminue causant ainsi une augmentation de la saturation de la bile en CH (Einarsson et *al*, 1985).

1.3.1.5. L'hypomotilité intestinale

Un lent transit intestinal permet au côlon d'absorber en quantités excessives des AB toxiques tel que le DOC. Quand ce dernier est retrouvé au foie, il augmente la sécrétion du CH dans la bile tandis qu'au niveau de la vésicule biliaire, il augmente la cristallisation du CH (Dowling et *al*, 1997).

1.3.1.6. La diète

La majorité du CH est synthétisée de manière endogène. Le CH alimentaire, quant à lui, a un effet limité sur la saturation biliaire en CH (Donovan, 1999). Une étude réalisée par Nervi et *al* (1989) chez les chiliens, indique qu'une diète riche en légumes peut affecter le métabolisme hépatique des lipides et des lipoprotéines. Ceci induit un changement dans la composition biliaire et une réduction en PL biliaires et produit ainsi une augmentation de la saturation en CH de la bile .

1.3.1.7. L'hyperlipidémie

L'hyperlipidémie induit une augmentation de la synthèse du CH, une malabsorption des AB et une diminution du pool d'AB à cause de la diminution du cycle entérohépatique (Einarsson et *al*, 1975; Duane, 1995).

1.3.1.8. Le risque génétique

La prévalence de la lithiase cholestérolique varie largement d'une population à l'autre. Elle est basse chez les populations Asiatique et Africaine (<5%), intermédiaire chez les populations d'Europe et d'Amérique du nord (10 à 30%) et est élevée chez les premières nations (30 à 70%) (Carey et O'Donovan, 1984). L'exposition aux conditions de la période glaciaire dont la privation de nourriture favorisant la sélection des gènes *thrifty* est l'hypothèse retenue expliquant la prédisposition élevée de ces populations à la lithiase biliaire, au diabète et à l'obésité dans des conditions d'abondance calorique (Lowenfels, 1988). Le risque génétique est aussi supporté par le fait que la présence d'une prédisposition familiale a été démontrée (Sarin et *al*, 1995) et par l'identification de gènes lithogéniques chez la souris (Khanuja et *al*, 1995).

1.3.1.9. Les médicaments altérant l'homéostasie du cholestérol

Les dérivés de l'acide fibrique qui diminuent le taux du CH plasmatique augmenteraient le taux du CH sécrété dans la bile. Les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase (l'enzyme clé de la biosynthèse du CH) diminuent la captation par les récepteurs des LDL et

augmentent ainsi le pool hépatique du CH libre et la saturation biliaire en CH (Donovan, 1999).

1.3.1.10. Le jeûne

Le jeûne diminue la motilité de la vésicule biliaire causant une augmentation de la concentration en CH dans la bile. Également, pendant une période de jeûne, la bile devient sursaturée en CH parce que la quantité d'AB produite par le foie est minimale et par conséquent leur sécrétion (Northfield et Hofmann, 1975).

1.3.2. Modèles animaux

Plusieurs modèles animaux ont été utilisés pour étudier la lithiase biliaire. Ceux-ci incluent le hamster, le lapin, la souris, le chien de prairie et l'écureuil.

1.3.2.1. Le hamster

Dam et Christensen (1952) ont été les premiers à découvrir que le hamster Syrien produisait régulièrement des calculs biliaires lorsqu'il est nourri avec une diète spécifique. Cette diète est dépourvue d'acides gras polyinsaturés parce que leur présence contrecarre la formation des calculs biliaires de CH (Dam et Christensen, 1961a). Elle est aussi riche en glucose (74,3%) qui est facilement absorbable. Le glucose est le composant majeur et essentiel de la diète car si on le remplace par un autre sucre, la capacité de la diète à induire la formation des calculs biliaires de CH est presque complètement perdue (Dam et Christensen, 1961b). Cette diète induit une sursaturation de la bile en CH après quelques jours de traitement et la formation de calculs biliaires de CH chez plus que 80% des animaux après 6 à 12 semaines de ce régime (Chijiwa, 1990; Hayes et *al*, 1992a). Malheureusement, la mortalité est très élevée (50%) et la plupart des animaux qui survivent sont très malades, atteints de diarrhée, d'ulcères réctaux et de cirrhose (Hayes et *al*, 1992b). Sur la base de plusieurs études, Dam et *al* (1974), ont conclu que la diminution de la biosynthèse du CH est le moyen principal pour protéger les hamsters alimentés avec cette diète, contre la formation des calculs biliaires de CH.

1.3.2.2. Le lapin

Le deuxième modèle animal proposé durant les années 50 a été le lapin. Bevans et Mosbach (1956) ont induit la lithiase biliaire chez des lapins en ajoutant du cholestanol à leur diète commerciale tandis que Borgman (1965) l'a induit en utilisant une diète composée de 40% de protéines et 20% d'acide oléique. Les calculs biliaires formés dans les 2 cas étaient similaires sauf que le contenu en CH ne constituait qu'un quart du poids sec des calculs (Van der Linden, 1972).

1.3.2.3. La souris

Chez la souris, la susceptibilité génétique à la lithiase cholestérolique est un trait dominant conféré par les gènes *Lith*. Un gène majeur nommé *Lith1* a été identifié sur le chromosome 2 (Khanuja et al, 1995). Il a été démontré que chez ces souris susceptibles génétiquement lorsqu'elles sont nourries avec une diète lithogénique (LG) contenant 15% de gras laitier, 1% de CH et 0,5% CA, la formation des calculs biliaires de CH est caractérisée par une sursaturation marquée de la bile en CH et une cristallisation rapide de celui-ci (Wang et al, 1997a).

La découverte de ce modèle remonte à 1964 quand Tepperman et al, en étudiant chez la souris, l'effet d'une diète athérogénique sur le taux du CH plasmatique, ont observé une augmentation de l'incidence de formation de calculs biliaires. Ils ont également observé que la diète constituée de 1% de CH n'induisait pas la formation de calculs biliaires de CH. Ceci indique un rôle essentiel de CA dans le modèle de lithiase cholestérique chez la souris. Le rôle de CA n'était toutefois pas encore élucidé jusqu'à ce que Wang et al

(1999a) aient tenté de déterminer son rôle chez la souris C57BL/6 nourrie avec la diète LG. Ils ont conclu qu'après son absorption et sa conjugaison hépatique avec la taurine, CA est une composante critique de la diète LG car il augmente l'absorption intestinale du CH, contribuant ainsi aux taux élevés de la sécrétion du CH en perturbant la conversion catabolique du CH en AB. Le CA promouvoit également la formation des cristaux monohydrates de CH.

Il existe 3 différentes souches de souris selon leur susceptibilité génétique à la lithiase cholestérolique; une souche hautement susceptible (100% ont développé des calculs biliaires) telles les C57L, SWR et A . Les souches C57BL/6, C3H et SJL ont une susceptibilité intermédiaire (20 à 40%) et finalement SM, AKR et DBA/2 sont les souches résistantes (0%) (Khanuja et *al*, 1995).

La souris est un excellent modèle pour l'étude de la lithiase cholestérolique chez l'homme car en se basant sur les études selon la race, selon la famille et sur les jumeaux, il semble que la susceptibilité de l'homme à la lithiase cholestérolique soit souvent d'origine génétique (Paigen et Carey, 1999).

1.3.2.4. Le chien de prairie

Ce modèle a été initialement décrit par l'équipe de Brenneman (1972). La formation des calculs biliaires de CH est induite chez les animaux soumis à une diète riche en blanc d'œuf. L'ajout de 1,25% de CH à cette diète de base entraîne la sursaturation de la bile en CH dans un intervalle de 5-8 jours (Cohen et *al*, 1991; O'leary et *al*, 1991) et la formation des calculs biliaires de CH après 2 semaines chez la plupart des animaux

(Strichartz et *al*, 1989; Afdhal et *al*, 1993). Parmi les caractéristiques de ce modèle, on note la similarité entre la bile et la composition des lipides biliaires du chien de prairie et celle de l'humain (Van der Linden et Bergman, 1977; Lamont et *al*, 1984).

1.3.2.5. L'écureuil

Dans les années 80, l'équipe de Davison (1982) et celle de Fridhandler (1983) ont utilisé des écureuils (*Spermophilus richardsonii*) comme modèle de lithiase cholestérolique. Lorsque ces animaux ont été soumis à la diète commerciale 'purina chow' enrichie de CH (1%), la saturation de la bile en CH a été atteinte après 2 semaines tandis que les calculs biliaires de CH ne sont apparus qu'après 6 mois de traitement (Macpherson et *al*, 1987).

1.3.3. Étapes de la formation des calculs biliaires de cholestérol

1.3.3.1. Sursaturation de la bile en cholestérol

La sursaturation biliaire en CH est un pré-requis essentiel à la formation des calculs de CH dans la bile. Elle se produit quand la concentration en CH excède la capacité de solubilisation des lipides biliaires. Théoriquement, il existe au moins 3 défauts (Ito et *al*, 1996) qui peuvent mener à la sursaturation en CH:

- a) Une hypersécrétion de CH avec une sécrétion normale d'AB.
- b) Une sécrétion normale de CH avec une hyposécrétion d'AB.
- c) Une hypersécrétion de CH avec une hyposécrétion d'AB.

L'hypersécrétion de CH avec une sécrétion normale d'AB semble être l'anomalie dominante dans la lithiase cholestérolique (Hay et Carey, 1990).

Des études préliminaires ont suggéré que plusieurs facteurs pourraient participer à l'hypersécrétion biliaire du CH durant la formation des calculs biliaires de CH chez les souris génétiquement susceptibles, nourries avec la diète LG et ceci comparativement aux souris résistantes. Par exemple, l'augmentation de l'efficacité de l'absorption du CH (Wang et *al*, 1998), l'absence de la régulation à la baisse de l'HMG-COA réductase donc une influence de la synthèse *de novo* du CH (Lammert et *al*, 1999), la régulation à la hausse du récepteur des HDL, le Sr-b1 (class B Scavenger receptor) (Fuchs et *al*, 1998a). Malgré le fait que ces facteurs constituent des sources considérables de CH, leur gènes ne se situent pas sur le chromosome 2 (Welch et *al*, 1996) donc ils ne sont pas des candidats pour *Lith1* contrairement à ce que l'on considérait auparavant. Des études récentes suggèrent que les gènes *Lith* pourraient encoder des transporteurs de lipides de la membrane canaliculaire à la bile hépatique. *Megalin glycoprotein 330*

(*Gp330*) (Xia et al, 1993), un membre de la famille des gènes *Ldlr* (*LDL receptor*) transporteur du CH à la bile hépatique ou *Spgp* (Lammert et al, 1997), un membre de la famille des gènes *Mdr* (Childs et al, 1995b) responsable du transport des AB, tous deux se situant sur le chromosome 2 (Khanuja et al, 1995) pourraient être les gènes candidats pour *Lith1*. Les phénotypes de *Lith1* suggèrent que ces gènes sont des facteurs déterminant de l'augmentation de la sécrétion des lipides biliaires, ceci en favorisant l'hypersécrétion du CH disproportionnellement à la PC et aux AB (Wang et al, 1999b).

1.3.3.1.1. L'indice de saturation en cholestérol

L'indice de saturation en CH d'un échantillon de bile est le ratio de la quantité du CH présent sur la quantité maximale soluble du CH (cette dernière est calculée grâce à une formule dérivée d'une table qui tient compte de la concentration totale des lipides biliaires et du ratio des PL sur la somme des PL et CH). La bile qui a un indice de saturation égal à 1 est saturée, celle qui a moins que 1 est non saturée et celle qui a plus que 1 est sursaturée. L'indice de saturation peut être également exprimé comme un pourcentage de saturation (Carey, 1978b).

1.3.3.1.2. Formation des cristaux de cholestérol

Dans la bile, dépendant des concentrations relatives des AB, des PL et du CH, ces composantes lipidiques biliaires majeures interagissent pour former différents micelles biliaires (Donovan et Carey, 1990). Ces micelles mixtes permettent au CH qui est très hydrophobe d'être transporté dans la bile (Cohen et al, 1993) en étant incorporé dans le noyau hydrophobe et maintenu dans un état thermodynamique stable (Mazer et al,

1980; Halpern et *al*, 1986). Quand la bile est sursaturée en CH, des vésicules sont formées et plus de PL sont requis pour la conversion des vésicules en micelles mixtes. Conséquemment, les vésicules résiduelles deviennent plus riches en CH (Nishioka et *al*, 1999). Ces vésicules riches en CH sont thermodynamiquement instables et peuvent s'aggréger permettant aussi la formation des cristaux de CH (Sherlock et Dooley, 1997).

1.3.3.1.3. Diagramme de phase ternaire

La solubilisation du CH dépend uniquement des proportions relatives des AB, des PL et du CH. Ce concept peut être illustré avec le diagramme de phase ternaire (fig.2), où chaque pourcentage des moles totales des AB, lécithine et CH dans la bile occupe un des 3 axes. Le diagramme de phase ternaire montre les phases physiques du CH. La phase 1 est la zone micellaire où se forme exclusivement une solution isotrope micellaire. La phase 2 est la phase micellaire saturée où à des concentrations de CH un peu plus élevées, les micelles saturés et les cristaux de CH peuvent co-exister en équilibre. Si le CH est présent en excès, les micelles saturés cohabitent avec les cristaux et les cristaux liquides saturés, c'est la phase 3. La ligne délimitant la phase 1 représente la limite de la solubilité du CH. La précipitation du CH se produit dans les échantillons de bile dont la composition biliaire dépasse cette limite. Si la composition de la bile tombe en-dessous de cette limite, la formation des calculs biliaires de CH n'a pas lieu. Ce principe physico-chimique est conforme avec l'observation que tous les patients avec calculs biliaires ont une composition biliaire dans la vésicule au-dessus de cette limite. Cependant, les sujets ayant une composition biliaire au-dessus de la limite de solubilité du CH ne développent pas nécessairement des calculs biliaires de CH. La raison est que le CH peut être retenu dans un état métastable dans la bile. Dans cette

zone, les vésicules de la lécithine et du CH solubilisent le CH (Carey et Cohen, 1987; Lee et *al*, 1987). Chez ces patients, le CH est maintenu en état de solution métastable pour des jours voir des semaines, assez longtemps pour permettre l'évacuation de la vésicule biliaire (Duane, 1993).

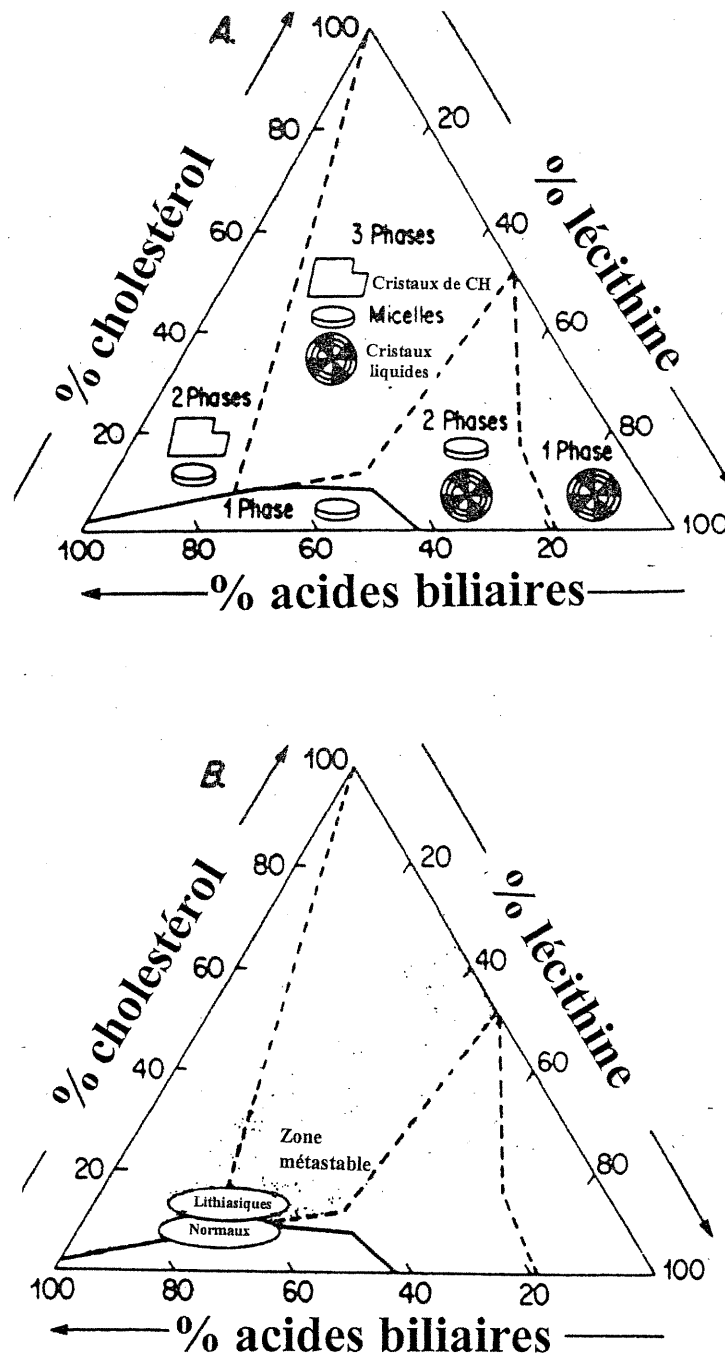


Fig. 2. Diagramme de phase ternaire. A) Dépendement de la composition lipidique de la bile, le cholestérol est présent à l'équilibre en micelles, en cristaux liquides ou solides. B) Les zones des compositions lipidiques trouvées chez les sujets normaux et lithiasiques avec une présentation de la zone métastable (Adapté d'après Hay et Carey, 1990. Tiré de Marks et Schoenfield, 1993).

1.3.3.2. La nucléation du cholestérol

La nucléation du CH est une étape cruciale dans le processus de la formation des calculs biliaires de CH. Des études *in vitro* et *in vivo* démontrent que la nucléation du CH intervient principalement après l'agrégation et la fusion des vésicules riches en CH en vésicules larges multilamellaires (Holzbach et *al*, 1987; Luk et *al*, 1998).

Les observations relatant que plus que la moitié des sujets témoins ont une bile sursaturée en CH (Small, 1980) et que la nucléation a lieu plus rapidement dans la bile vésiculaire des patients avec des calculs biliaires de CH que chez les témoins (Holan et *al*, 1979; Gollish et *al*, 1983) suggèrent que d'autres facteurs tels les protéines biliaires ayant des fonctions inhibitrices ou promotrices pourraient avoir un rôle dans le processus de la cristallisation du CH et dans la formation des calculs biliaires (Holzbach et *al*, 1984; Groen et *al*, 1990). En d'autres termes, même si la bile est saturée en CH chez des témoins, un équilibre est maintenu entre les promoteurs et les inhibiteurs de nucléation. Chez les sujets lithiasiques, les promoteurs de nucléation prédominent ce qui entraîne la précipitation des cristaux de CH de la bile saturée (Marks et Schoenfield, 1993).

1.3.3.2.1. Promoteurs de nucléation

Les protéines pro-nucléantes favorisent la cristallisation du CH en accélérant l'agrégation et la fusion des vésicules riches en CH. Les protéines pro-nucléantes de la bile sont la mucine, l'aminopeptidase-N, l'acide α_1 -glycoprotéine, l'immunoglobuline (Ig G) et la phospholipase C (Donovan, 1999).

1.3.3.2.1.1. La boue biliaire

La boue biliaire est composée d'un mélange de lécithine et de cristaux liquides de CH, de cristaux de CH et de granules de bilirubinate de calcium enrobés dans une matrice de gel de mucine (Lee et Nicholls, 1986 et 1988).

La mucine est la composante majeure de la boue biliaire. On a proposé 2 rôles à la mucine : soit un agent de nucléation du CH ou un agent permettant un échafaudage pour les cristaux durant la croissance des calculs biliaires de CH (Smith et Lamont, 1985a). La mucine étant composée de 75% d'hydrates de carbone et de 25% de peptides, le domaine carbohydate (avide d'eau) serait responsable de la formation du gel visqueux tandis que la partie peptidique lierait avec ses sites hydrophobes des molécules non-polaires tels que le CH et la bilirubine (Smith et Lamont, 1984). Le complexe hydrophobe résultant fournit une surface de nucléation des cristaux de CH et une matrice pour la croissance des calculs biliaires de CH (Smith et Lamont, 1985b).

1.3.3.2.2. Inhibiteurs de nucléation

Il a été démontré que l'APF a un effet opposé sur la cristallisation du CH. Sa présence en concentration physiologique (1mg/ml) dans la bile artificielle entraîne la persistance des vésicules sursaturées en CH, inhibant ainsi la formation des cristaux de CH (Konikoff et *al*, 1997).

D'autres protéines telles que les apolipoprotéines A1 et A2 sont également capables de prolonger *in vitro* le temps de nucléation de CH (Kibe et *al*, 1984).

1.3.3.2.3. Rôle des acides biliaires dans la nucléation du cholestérol

Récemment, il a été démontré que l'addition des AB aux vésicules de CH isolées des biles artificielles sursaturées en CH induisait la formation d'une variété de cristaux de CH. Les AB plus hydrophobes induisaient plus de cristallisation du CH que les AB plus hydrophiles (DOC>CDC>CA>TCA) (Stolk et *al*, 1994). De plus, la bile des patients lithiasiques contient une plus grande proportion d'AB hydrophobes que celle de témoins (Heuman et *al*, 1980). Le mécanisme par lequel les AB influenceraient la nucléation du CH serait probablement la modulation du ratio (CH/PL) vésiculaire. Les AB plus hydrophobes augmentent ce ratio lorsqu'ils sont ajoutés aux biles artificielles (Van Erpecum et *al*, 1995).

1.3.3.2.4. Rôle de la phosphatidylcholine dans la nucléation du cholestérol

Halpern et *al*. (1993) ont observé que l'addition de la lécithine synthétique en quantité croissante dans la bile artificielle augmentait progressivement le temps de nucléation (le temps requis pour que les cristaux de CH soient observés en microscope et avait une grande influence sur la distribution du CH entre les vésicules et les micelles et entraînait une diminution progressive du ratio CH/PL dans les vésicules résiduelles. Ils ont également observé que le temps de nucléation a été considérablement prolongé (jusqu'à 20 jours) quand les 2 acides gras de la PC étaient saturés (l'acide palmitique en position sn-1 et l'acide stéarique en position sn-2) par rapport à la PC mono-saturée (l'acide palmitique en position sn-1 et l'acide arachidonique en position sn-2) où le temps de

nucléation a été prolongé jusqu'à 5 jours. Jünger et *al.* (1993) ont rapporté des résultats similaires mais sachant que la PC bi-saturée, utilisée précédemment, n'est pas présente physiologiquement, ils ont effectué des études additionnelles avec la bile humaine recueillie après cholecystéctomie, en y ajoutant de la PC extraite de la vésicule biliaire. Ils ont rapporté, en plus des résultats précédents, que l'addition de la PC diminuait l'indice de saturation de CH de 0,1 à 0,3.

1.3.3.3. Croissance des calculs biliaires

Les calculs biliaires de CH peuvent être solitaires ou multiples (Montet, 1991). Les calculs solitaires sont de grande taille et composés à 99% de CH pur. Ils ont une forme sphérique ou ovoïde et sont de structure rayonnante. Les calculs multiples sont petits, nombreux, composés à 82% de CH et sont colorés en brun par les pigments biliaires. Ils ressemblent aux calculs solitaires par leur forme mais diffèrent par leur composition. Dans ce type de calcul, la croissance des cristaux de cholestérol se fait en association avec d'autres molécules insolubles qui pourraient agir comme un nid de croissance, telles que la bilirubinate de calcium, les mucopolysaccharides (mucine), les protéines et/ou les sels de métaux lourds (Ca, Mg, Cu, Su).

L'APF et la protéine liant le calcium, CBP (Calcium Binding Protein), sont 2 petites protéines amphiphiliques qui sont présentes dans la bile normale et lithogénique et dans tous les types de calculs biliaires (Ostrow, 1992; Domingo et *al.*, 1993). CBP lie le calcium et favorise la précipitation des sels de calcium s'il est lié à la mucine (Afdhal et *al.*, 1995). L'APF retrouvée dans les calculs biliaires de CH est localisée uniquement

dans les régions pigmentées entre la matrice de mucine et les dépôts de sels de calcium et des pigments biliaires (Lechène et *al*, 1996).

1.4. Rôles de la vésicule biliaire dans la lithiase cholestérolique

1.4.1. Rôle absorbant

Le transport actif de NaCl par l'épithélium de la vésicule est la force motrice de la concentration de la bile. Deux tiers du transport de Na⁺ à l'intérieur de la cellule est dû à l'échange apical de Na⁺ contre le H⁺. L'eau est absorbée passivement en réponse à la force osmotique générée par l'absorption du soluté et par la chute de l'activité osmotique de la bile luminale due à la neutralisation de HCO₃⁻ par la sécrétion de H⁺ (Moore et Hofman, 1993).

1.4.1.1. Absorption des acides biliaires et des lipides biliaires

L'absorption des AB et des lipides biliaires (PL et CH) par la muqueuse de la vésicule biliaire peut significativement altérer la composition de la bile (Corradini et *al*, 1998a). En fait, un changement majeur dans la composition biliaire lipidique pourrait considérablement affecter l'équilibre micellaire du cholestérol et la formation des calculs biliaires de CH (Corradini et *al*, 1998b).

Il a été récemment démontré que l'absorption des PC et du CH est plus élevée dans la vésicule des sujets témoins que dans la vésicule de ceux ayant des calculs biliaires, tandis que l'absorption des AB est moins affectée (Corradini et *al*, 2000).

1.4.2. Rôle sécrétoire

L'épithélium de la vésicule sécrète des ions H^+ responsables de l'acidification de la bile vésiculaire (Ulissi et *al*, 1992). Des protéines ayant des propriétés pro- ou anti-nucléantes sont également sécrétées par la vésicule (Heuman et *al*, 1996).

1.4.2.1. Hypersécrétion de la mucine

L'hypersécrétion de la mucine est une conséquence directe de la sursaturation de la bile en CH et de l'augmentation des concentrations du DOC et de l'acide arachidonique (Marks et *al*, 1991), le CH étant un stimulant de la synthèse et de la sécrétion de la mucine (Lee et *al*, 1981). De même, l'hydrolyse des lécithines porteuses d'un acide arachidonique par la phospholipase A_2 donne un précurseur de la synthèse des prostaglandines. Ces dernières sont des précurseurs puissants de la sécrétion de mucine (Lamont et *al*, 1983).

1.4.3. Rôle moteur

Pendant un repas, la vésicule se contracte et vide la bile dans l'intestin pour la digestion. La motilité de la vésicule est cruciale pour prévenir la formation des calculs biliaires car la rétention du CH favorise la nucléation du CH et la croissance des calculs, ces derniers deviennent tellement gros qu'il est impossible de les évacuer par le canal cholédoque (Heuman et *al*, 1996).

1.4.3.1. Hypomotilité de la vésicule biliaire

L'hypomotilité de la vésicule biliaire est une conséquence directe de la bile sursaturée en CH. Cette dernière inhibe la contractilité de la vésicule probablement à cause de l'augmentation en contenu de CH des membranes cellulaires (Yu et *al*, 1996).

Les conséquences de ce phénomène sont les suivantes :

Premièrement, le temps de résidence de la bile dans la vésicule augmente ce qui permet à la nucléation de CH d'avoir lieu. Deuxièmement, une fraction importante de la bile nouvellement synthétisée est dérivée directement vers les intestins où elle sera métabolisée par les bactéries. Troisièmement, la sursaturation en CH et l'augmentation du taux de DOC, augmentent la sécrétion de mucine (Cooper, 1999).

1.4.4. Rôle de synthèse

Les taux de synthèse et d'estérification de CH dans la vésicule diffèrent de ceux trouvés dans le foie. L'activité de l'enzyme hydroxymethylglutaryl-coenzyme A, responsable de la régulation de la synthèse de CH est plus basse et l'activité de l'enzyme ACAT qui catalyse l'estérification de CH est plus élevée dans la vésicule que dans le foie (Sahlin et *al*, 1992). Aucune altération dans le métabolisme du CH qui pourrait altérer le contenu et la saturation de la bile en cholestérol n'a été détectée dans l'épithélium de la vésicule biliaire chez les patients avec des calculs biliaires.

1.5. Rôle des intestins dans la lithiase cholestérolique

1.5.1. Métabolisme intestinal des acides biliaires

Le fait qu'une grande proportion de la bile se dirige vers les intestins au lieu de rester dans la vésicule, augmente l'exposition des AB aux bactéries intestinales. Ces dernières vont déconjuguer et déhydroxyler les AB primaires donnant naissance ainsi, à des AB secondaires plus hydrophobes (Berr et *al*, 1992).

Des études réalisées sur des patients avec des calculs biliaires de CH ont démontré une corrélation positive entre le taux de DOC et l'indice de saturation en CH ou la vitesse de cristallisation du CH (Hussaini et *al*, 1995). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'effet du DOC sur la formation de la bile lithogénique et des calculs biliaires. Premièrement, le DOC ralentit le transit intestinal favorisant ainsi l'absorption intestinale du CH et exerçant un "feedback" positif sur sa propre formation. Deuxièmement, le DOC augmente la sécrétion biliaire du CH par son effet détergent sur la membrane canaliculaire de l'hépatocyte, cette dernière contenant une large quantité de CH. Troisièmement, le DOC favorise la cristallisation du CH en déstabilisant les vésicules riches en CH (Van Epercum et Van Berge-Henegouwen, 1999).

1.6. Traitement médical de la lithiase cholestérolique

1.6.1. Cholécystéctomie

La première cholécystéctomie a été réalisée par Langenbuch en 1880 (Traversol, 1976). L'opération consiste en l'ablation de la vésicule biliaire. La cholécystéctomie laparoscopique est réussie chez 95% des patients. Pour le reste, l'opération doit-être convertie à une cholécystéctomie par laparotomie (Cox et *al*, 1993). Dans ce cas, le taux de mortalité est de 0,03% chez les patients âgés de moins que 65 ans et de 0,5% chez ceux âgés de plus que 65 ans (Roslyn et *al*, 1993).

1.6.2. Dissolution des calculs biliaires

1.6.2.1. Thérapie avec les acides biliaires oraux

Suite à l'observation que des patients avec des calculs biliaires ont un pool d'AB réduit, Vlahcevic et *al* (1970), ont proposé que l'administration par voie orale des AB pourrait augmenter leur pool et stimuler leur sécrétion et celle de la lécithine, ce qui par conséquent augmenterait la capacité de la bile à solubiliser le CH et pourrait permettre la dissolutions des calculs biliaires.

Thistle et Schoenfield (1971), ont démontré que l'administration du CDC diminuait la saturation de la bile en CH. Ensuite, Danzinger et *al* (1972 et 1973) et Thistle et Hofmann (1973) ont démontré que l'administration à long terme du CDC conduisait dans certains cas à la dissolution des calculs biliaires.

Ce n'est pas tous les AB qui sont efficaces, CA et DOC sont inefficaces dans la réduction de la saturation de la bile en CH et la dissolution des calculs biliaires de CH malgré le fait que *in vitro* ces AB ont pu dissoudre les calculs biliaires (La Russo et al; 1975, 1977).

Le mécanisme par lequel CDC diminue la saturation de la bile en CH est attribuable à la réduction de la sécrétion de CH dans la bile (Nilsell et al, 1983; Von Bergmann et al, 1984; Fromm, 1986). CDC semble également diminuer l'activité de l'HMG-CoA réductase (Ahlberg et al, 1981). Par contre, CA augmente la sécrétion de CH dans la bile et par conséquent n'affecte pas la saturation de la bile en CH malgré le fait qu'il augmente d'une façon marquante le 'pool' des AB (Einarsson et Grundy, 1980).

En 1975, Makino et al, ont rapporté que l'Urso, l'épimère 7 β de CDC, est également efficace dans la dissolution des calculs biliaires. Le mécanisme d'action d'Urso diffère de celui de CDC. Urso n'inhibe pas la synthèse de CH ou des AB (Angelin et al, 1983; Heuman et al, 1988) mais il peut réduire l'absorption intestinale de CH (Hardison et Grundy, 1984) et solubiliser le CH en formant sur la surface du calcul biliaire, une phase cristalline liquide de CH, qui contient également de la lécithine. Ces cristaux liquides peuvent se séparer et devenir suspendus dans la bile pour être par la suite évacués de la vésicule biliaire (Igimi et Carey, 1981).

1.6.2.1.1. Efficacité

Une complète dissolution des calculs biliaires est atteinte avec des doses optimales de CDC (15 mg/kg/jour pour 1 à 3 ans) chez 20 à 40% des patients. De plus, une

dissolution partielle est observée à la même fréquence (Roda et *al*, 1982; Erlinger et *al*, 1984).

L'Urso est l'AB le plus utilisé de nos jours pour la dissolution des calculs biliaires par voie orale. Son efficacité est similaire à celle de CDC seul ou en combinaison CDC-Urso (Podda et *al*, 1989 ; Sackmann et *al*, 1991). Pendant les premiers mois de thérapie, Urso à une dose de 8 à 10 mg/kg/jour, peut dissoudre les calculs biliaires plus rapidement que CDC (Fromm et Malavoti, 1992a; Jazrawi et *al*, 1992).

1.6.2.1.2. Effets secondaires

La rare utilisation de CDC est due à ses effets secondaires significatifs. La toxicité potentielle de CDC est due à son métabolite, le LCA qui est hépatotoxique dans plusieurs espèces animales (Palmer, 1976). Presque 15 à 30 % des patients qui l'utilisent présentent une augmentation de 2 à 3 fois du taux d'aminotransférases sériques (Fromm et *al*, 1983).

L'utilisation d'Urso à long terme est plus avantageuse que celle de CDC car Urso ne semble pas causer d'augmentation dans le taux de CH sérique (Fromm, 1984) et semble être moins toxique pour la muqueuse intestinale que le CDC (Lillemeo et *al*, 1983). Une complication fréquente de l'utilisation d'Urso est la calcification de la surface des calculs biliaires. L'incidence est moins que 5% mais quand cela se produit, la dissolution ne peut plus avoir lieu (Bateson et *al*, 1981). Finalement, Urso peut rarement causer la diarrhée (Lefkof et *al*, 1986).

1.6.2.1.3. Récurrence des calculs biliaires

Chez 10 à 20% des patients, les calculs biliaires réapparaissent pendant les 2 à 3 premières années après l'interruption de la thérapie (Fromm et Malavoti, 1992b). Même les patients qui étaient maintenus en thérapie avec l'Urso après la dissolution de leurs calculs biliaires, ont un taux de récurrence de 20% après 5 ans et de 32% après 7 ans (Villanova *et al*, 1989).

1.6.2.2. Perfusion des solvants

La dissolution des calculs biliaires peut également s'effectuer par une perfusion de solvants dans la vésicule biliaire pour avoir un contact direct avec les calculs biliaires. La perfusion se réalise à l'aide de catheter placé par cannulation du canal cholédoque ou par ponction à travers le foie (Marks et Schoenfield, 1993).

1.6.2.2.1. Monoctanoïn

Le monoctanoïn monoglycéride est un solvant organique ayant des propriétés excellentes de solubilisation de CH (Flynn *et al*, 1979). Plusieurs études ont montré que le taux de succès est de 50 à 80% en moyenne lorsque le monoctanoïn est infusé de 3 à 5 ml/h pour 3 à 7 jours (Velasco *et al*, 1983; Hofmann *et al*, 1981). Le monoctanoïn a plusieurs effets secondaires qui se manifestent comme résultat de sa vidange rapide dans le duodénum tels la nausée, les vomissements et la diarrhée. Son utilisation est rarement indiqué (Heuman *et al*, 1996).

1.6.2.2.2. Methyl Tert-Butyl Ether

Le Methyl Tert-Butyl Ether (MTBE), un additif d'essence, a la capacité de dissoudre le CH très rapidement (Thistle et al, 1989). Des études *in vivo*, montrent que le MTBE dissout les calculs biliaires de CH chez 96 à 100% des patients lorsqu'ils sont infusés pour 5 à 12 h (Zakko et Hofmann, 1990).

De 33 à 47% des patients infusés avec le MTBE, ont des douleurs, nausées ou vomissements et 5 à 7% ont une élévation des aminotransférases (Leuschner et al, 1991). Ses effets secondaires majeurs sont reliés au fait que lorsque la vésicule biliaire est remplie du MTBE et que ce dernier s'en échappe et va au duodénum, il peut causer des dommages topiques à ce niveau. Également, l'infusion accidentelle du MTBE dans le parenchyme hépatique ou dans les vaisseaux sanguins pourrait-être potentiellement fatale à cause de la capacité de MTBE à solubiliser les lipides (Levenson et Fromm, 1996).

1.7. Prévention de la lithiase cholestérolique

Des études réalisées dans une population à risque élevé, à court terme, pour développer des calculs biliaires tels que des patients, en perte rapide de poids, suivant un régime sévère, ont montré que l'administration d'Urso à des doses aussi basses que 300 mg/kg/jour, peut dramatiquement réduire l'incidence de développement de nouveaux calculs biliaires de CH et que ce bénéfice semble persister même après la fin du régime et l'arrêt du traitement (Sugerman et *al*, 1995). Également, l'administration quotidienne d'Urso, à long terme, après la dissolution des calculs biliaires, a montré une protection partielle contre leur récurrence (Villanova et *al*, 1989). Par contre, le coût et les inconvénients de l'administration quotidienne d'Urso, empêchent qu'il soit utilisé comme une stratégie générale de prévention d'où la nécessité de développer des stratégies moins lourdes et moins coûteuses (Heuman et *al*, 1999).

2. Hypothèses de recherche et objectifs

La lithiase biliaire est un problème majeur de santé dans le monde occidental. Sa prévalence est estimée à 10% ou 15 à 20 millions de personnes aux Etats-Unis. Heureusement, le taux de mortalité est relativement bas, seulement 6000 personnes en meurent chaque année (Duane, 1992).

L'étiologie de la lithiase cholestérolique n'est pas encore élucidée. Il est toutefois accepté que la sursaturation de la bile en CH est un prérequis essentiel dans la formation des calculs biliaires de CH.

Plusieurs études *in vitro*, démontrent un effet bénéfique de l'augmentation de la concentration de la PC dans la bile artificielle et la bile humaine après cholécystéctomie, sur la solubilité et la cristallisation du CH ainsi que sur le temps de nucléation (Halpern et al, 1993; Jügest et al, 1993). D'autres études *in vivo* (chez le rat) démontrent que la PC alimentaire augmente la sécrétion lipidique biliaire et ainsi le flux biliaire, ce qui est critique pour l'homéostasie du CH (Leblanc et al, 1998). Cependant, aucune étude *in vivo*, n'a été réalisée sur les effets qualitatifs et quantitatifs de la supplémentation de la PC sur la lithiase cholestérolique. Ainsi, notre hypothèse est que l'augmentation de la concentration de la PC pourrait être une approche prometteuse dans la prévention de la formation des calculs biliaires de CH en solubilisant d'avantage l'excès du CH biliaire.

Le but de cette étude est d'évaluer le rôle de la PC alimentaire dans la protection contre la formation des calculs biliaires de CH. Pour ce faire, on a utilisé des souris C57BL6 qui possèdent une susceptibilité intermédiaire à former des calculs biliaires de CH

lorsqu'elles sont alimentées avec une diète dite LG (15% gras laitier, 1% CH et 0,5% CA) et nous avons évalué l'influence de la supplémentation en PC sur la sécrétion des AB et celle des lipides biliaires (PL et CH) et sur l'incidence de la formation des calculs biliaires de CH. Quelques facteurs, tels que l'indice de saturation de la bile en CH et la concentration de la protéine anti-nucléante (APF) impliqués dans la formation ou la prévention de la lithiase cholestérolique ont également été étudiés.

3. Matériels et méthodes

3.1. Modèle animal

Des souris C57BL/6 âgées de 4-6 semaines et pesant entre 20 à 30 g ont été utilisées dans cette étude. Ces souris provenaient de 'Jackson Laboratory' (Bar Harbor, ME) et elles possèdent une susceptibilité intermédiaire à la lithiase cholestérolique (20 à 40% avaient développé des calculs biliaires de CH lorsqu'elles étaient alimentées avec une diète LG pour 4 semaines) (Khanuja et al, 1995). À leur arrivée, les souris ont été soumises à 1 semaine d'adaptation puis elles ont été placées au hasard par groupe de 4 à 5 par cage, elles ont été gardées dans un environnement adéquat où la température a été maintenue de façon constante entre 22 et 23°C avec un cycle de clarté et de noirceur de 12 h.

3.2. Diète

Dans le 1^{er} volet du projet, les souris ont été soumises, pour 4 ou 8 semaines, à la diète LG ou à la diète LG + 2% PC. Dans le 2^{ème} volet, les souris ont été soumises, pour 4 semaines, à la diète LG, à la diète LG + 6% PC ou à la diète témoin. Le choix s'est posé sur 4 et 8 semaines, car d'après la littérature, les souris *Lith*, de haute susceptibilité, ont développé à 100% des calculs biliaires de CH après 8 semaines (Khanuja et al, 1995) alors que la durée minimale du traitement pour obtenir les effets de la diète LG était de 4 semaines. Le choix des pourcentages utilisés est basé sur une étude antérieure par Leblanc et al, 1998 où l'ajout de 2% PC dans la diète des rats, avait un effet bénéfique sur l'augmentation de la sécrétion des lipides biliaires. Dans le 1^{er} volet de l'expérimentation, 2% PC a pu retardé la formation des calculs biliaires de CH.

On a donc augmenté le pourcentage à 6% pour voir si cette augmentation pourrait prévenir complètement la formation des calculs biliaires de CH.

Le nombre de souris par groupe variait entre 5 et 10. La composition des différentes diètes figurent dans le tableau I. La diète LG a été préparée telle que décrit précédemment par Nishina *et al* (1990). Quant aux diètes enrichies en PC (2 et 6%), cet ingrédient a remplacé une partie du glucose. Les diètes étaient préparées à toutes les deux semaines et les portions de nourriture ont été données aux souris de 2 à 3 fois par semaine à partir du matériel gardé à 4°C. Les souris ont eu libre accès à la nourriture et à l'eau; leur consommation de nourriture ainsi que leur poids corporel étaient mesurés 2 fois par semaine.

Tableau I: Composition des différentes diètes

Constituants	LG %	LG +2%PC %	LG +6%PC %	témoin %
Gras laitier	15	15	15	-
Cholestérol	1,25	1,25	1,25	-
CA	0,5	0,5	0,5	-
Huile de maïs	1	1	1	5
Fécule de maïs	-	-	-	15
Glucose	49,75	47,75	43,75	50
Caséine	20	20	20	20
Cellulose	5,07	5,07	5,07	5
Minéraux (AIN-76)	5	5	5	3,5
Vitamines (AIN-76)	1	1	1	1
Choline bitartrate	1	1	1	0,2
D-L-méthionine	0,3	0,3	0,3	0,3
DL-a-Tocopherol	0,13	0,13	0,13	-
PC	-	2	6	-

Pour obtenir 15% du gras laitier, 18,45 g de beurre a été utilisé/100 g de diète à cause du 18,9% du contenu de l'eau dans le beurre.

Toutes les composantes de la diète ont été achetées d'ICN Biochemicals, Inc (Cosa Mesa, CA) sauf l'huile de maïs (Perla), glucose (Lantic), DL-a-Tocopherol (Sigma, Oakville, Ontario, Canada), sel de CA (Calbiochem, Behring Diagnostics) et PC des grains de Soya (Nattermann Phospholipid GMBH, Rhône-Poulenc).

3.3. Procédures chirurgicales

Les animaux préalablement mis à jeûne pendant 16 heures mais ayant accès à l'eau, ont été pesés puis anesthésiés avec du Xylate (i.p). La formule Xylate est un mélange de :

- 250 µl de Kétamine (100mg/ml) de (M.T.C. Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario).
- 25 µl de Xylazine (100mg/ml) de (Bayer Inc. Etobicoke, Ontario).
- 142 µl d'éthanol 100%.
- 583 µl de NaCl 0,9%.

Cette solution anesthésiante a été administrée à raison de 4 µl/g de poids corporel en bolus et 1 µl/g de poids corporel additionnel a été administré quand la souris présentait des signes de réveil. Les souris ont été placées sous lampe chauffante en thermorégulation. Les chirurgies ont été réalisées à 9h am. Après une incision de l'abdomen, la vésicule biliaire était examinée pour la présence des calculs biliaires, visibles à travers la paroi de la vésicule. La présence des pré-calculs est caractérisée par la présence des particules en suspension ou la boue biliaire. Le canal cholédoque a été identifié et doublement ligaturé. La vésicule biliaire a été canulée avec une canule PE 10 (Intramedic, New Jersey). La bile vésiculaire, représentant la bile emmagasinée dans la vésicule biliaire, a été récupérée pendant 5 minutes. Le temps (5min) est suffisant pour vider la vésicule avant de recueillir la bile hépatique qui retourne au foie à cause de la ligature au niveau du canal cholédoque. Ensuite cette bile hépatique est récupérée pendant 1 heure en 2 séquences de 30 minutes. Le flux biliaire a été déterminé par gravité assumant que la densité de la bile est de 1 g/ml. La récolte de la bile a été conservée à -20°C.

3.4. Dosages lipidiques de la bile

La concentration totale en AB a été mesurée enzymatiquement par la méthode de 3 α -hydroxystéroïde déhydrogénase (Turley et Dietschy, 1978). Les PL ont été dosés par mesure du phosphate inorganique selon la méthode de Bartlett (1959) après extraction de la bile tel que décrit par Folch (1957). Le CH a été extrait de la bile par la méthode de Bligh et Dyer (1959) et dosé par méthode enzymatique à l'aide d'une trousse contenant l'enzyme cholestérol oxydase (reagent kit No. 139050, Boehringer Mannheim, Mannheim, Montréal, Québec, Canada).

3.5. Mesure de la concentration d'APF

L'APF a été isolée à partir de la bile selon la méthode décrite et réalisée par Domingo et *al*, (1990). Le dosage quantitatif de l'APF a été réalisé selon la technique ELISA utilisant des anticorps polyclonaux de lapin (Domingo et *al*, 1999). Les anticorps polyclonaux ont été produits chez des lapins (New Zealand) tel que décrit par Domingo et *al*, 1992.

3.6. Analyse des acides biliaires

L'analyse qualitative et quantitative des différents espèces AB a été déterminée selon la méthode décrite par Yousef et *al* (1981). La technique comporte 5 étapes : extraction des AB, hydrolyse alcaline des conjugués taurine et glycine, méthylation du groupe carboxylique, acétylation des groupements hydroxyles et identification par la chromatographie gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC-MS).

L'acide 5 β cholanique (100 μ g) (Calbiochem Behring, San Diego, CA, U.S.A.) est utilisé comme standard interne et ajouté aux échantillons de bile. Pour extraire les AB et précipiter les protéines, on ajoute aux échantillons de bile un volume égal d'éthanol : méthanol (95 :5) et on chauffe à 60-80°C. Les AB extraits sont séchés sous azote extra sec et 2 ml NaOH (2,5 N) (American Chemicals Ltd., Montréal, Québec, Canada) est ajouté à chaque tube. Ces tubes sont fermés et chauffés à 160°C toute la nuit pour permettre l'hydrolyse des AB (déconjugaison). Après hydrolyse, les tubes sont refroidis, acidifiés avec du HCl 2,5 N pour rendre le pH inférieur à 1 puis les AB sont extraits 2 fois avec du diethyl éther (BDH Inc., Toronto, Ontario, Canada). Les extraits d'éther sont ensuite séchés et les esters méthylés ont été préparés par addition de 2 ml de méthanol (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, U.S.A.), 2 ml de 2,2-diméthoxypropane (Aldrich. Chemical. Inc. USA) et 10 gouttes de HCl concentré (American Chemicals Ltd., Montréal, Québec, Canada). Après 1 h, 2 ml de diethyl éther a été ajouté et le tout a été séché. Finalement, pour préparer les dérivés acétates, 0,5 ml d'une solution contenant 7 ml d'acide acétique glacial (BDH, Inc., Toronto, Ontario, Canada), 5 ml d'anhydride acétique (ACP Chemicals Inc., Montréal, Québec, Canada) et 5 gouttes d'acide perchlorique (BDH, Inc., Toronto, Ontario, Canada), ont été ajoutés. Les échantillons sont agités puis laissés 1h à la température de la pièce. Les dérivés acétate méthyl esters sont alors extraits 2 fois avec du diethyl éther, séchés et dissouts dans du chloroforme.

Les échantillons ont été injectés dans un chromatographe à phase gazeuse de type Hewlett- Packard 5890 muni d'un détecteur à ionisation de flamme et équipé d'une colonne capillaire de silice et de 5% de phenyl-methyl silicone. La colonne est de diamètre intérieur de 0,22 mm et relié à un détecteur sélectif de masse (MSD) de type Hewlett- Packard 5971A.

La calibration a été effectuée à l'aide d'un mélange d'AB standards (LCA, DOC, CDC, CA, Urso) qui proviennent de Calbiochem (Behring, San Diego, CA, U.S.A.). La détermination des AB présents dans les échantillons a été réalisée en comparant leur temps de rétention relatifs au standard interne avec les temps de rétention obtenus pour les AB standards. L'identification des AB a été confirmée par un logiciel qui permet de comparer le spectre, les ions spécifiques et les temps de rétention de composés inconnus avec une librairie de standards.

3.7. Analyse du profil de conjugaison des acides biliaires

La conjugaison des AB présents dans la bile a été déterminée par chromatographie liquide couplée à 2 spectroscopètres de masse (LC-MS-MS). Les AB ont été extraits de la bile par une extraction en phase solide grâce à une cartouche C₁₈ (Setchell et Worthington, 1982). Les cartouches ont été préconditionnées avec des éluions successives de 2 ml de chloroforme :méthanol (2 :1), méthanol et de l'eau d'HPLC (eau ultra pure gradée HPLC, filtrée par un filtre de 0,2 micron de diamètre). Les échantillons de bile ont été déposés et les cartouches ont été ensuite lavées avec 2 ml d'eau d'HPLC et n-hexane. Les cartouches ont été laissées 10 min pour éliminer tout excès de solvants. Les AB ont été récupérés par élution de 5 ml de méthanol, séchés sous azote extra-sec et dissouts dans 1 ml d'acétonitrile :d'eau HPLC (1 :1).

Les échantillons ont été injectés dans un HPLC de type Hewlett- Packard (séries 1100) relié à 2 spectromètres de masse en tandem de type Quattro LC (Micro Mass, UK). Les AB ont été scannés dans le 1^{er} spectromètre (MS1) en mode négatif entre 300 à 800 m/z. Les poids moléculaires des AB libres et conjugués se situent entre ces valeurs. La

conjugaison des AB a été confirmée par fragmentation du poids moléculaire dans le 2^{ème} spectromètre de masse. Le poids moléculaire des AB tri-OH et di-OH, conjugués à la taurine sont 514,8 et 498,8 m/z respectivement; le poids moléculaire des AB tri-OH et di-OH, conjugués à la glycine sont 464,7 et 451,5 m/z respectivement. La méthode utilisée est décrite en détail par Perwaiz et *al*, (2001).

3.8. Identification des espèces moléculaires des phospholipides

Après l'extraction de Folch, les différentes espèces de PC et de LysoPC biliaires, ont été identifiées par la recherche des parents de la choline dans le 1^{er} spectromètre de masse. Les parents de la choline (poids moléculaire de la choline est de 184) sont les PL qui portent de la choline dans leur structure et leur identification se fait en mode positif après l'ajout de l'acide formique 0,1% aux échantillons pour optimiser la réponse. L'identification des acides gras de ces PL a été réalisée par la fragmentation 'Daughter scan' des parents de la choline dans le 2^{ème} spectromètre de masse en mode négatif après ajout d'ammonium acétate (0,1 M) aux échantillons pour optimiser la réponse. L'identification des acides gras se fait par leur poids moléculaire. Une méthode de calcul permet également d'identifier les acides gras (poids moléculaire du PC – (phosphocholine + ammonium acétate + glycérol)).

3.9. L'indice de saturation en cholestérol

L'indice de saturation en CH d'un échantillon de bile est le ratio du pourcentage du CH présent sur le pourcentage maximum soluble du CH (Carey, 1978b). Le % du CH présent est calculé de la manière suivante: $CH\text{ présent} = (CH/CH+PL+AB)*100$. Où

CH, PL et AB sont les concentrations molaires présentes dans l'échantillon. Le pourcentage maximum soluble du CH est obtenu grâce à une formule dérivée la table de Carey (Carey, 1978b) qui tient compte de la concentration totale des lipides biliaries dans l'échantillon et du ratio des PL sur la somme des PL et CH.

Par exemple, si un échantillon de bile a un ratio molaire (PL/PL+AB) de 0,248, il faudrait prendre de la table de Carey la valeur la plus proche du ratio soit 0,250. De plus, si la concentration lipidique totale (AB + PL + CH) de notre échantillon est de 5,9 g/dl, on prend du tableau les valeurs de la concentration lipidique totale les plus près de la nôtre soit dans notre cas: 5 et 7,5 g/dl. Grâce à la table nous obtenons les valeurs du % du CH max saturable à 5 et 7,5 g/dl correspondant au ratio 0,250 soient respectivement, 6,591 et 7,027. Afin d'obtenir la valeur du % du CH max saturable correspondant à notre concentration (5,9 g/dl) il faut utiliser cette équation :

$(7,027 - 6,591 / 2,5) * 0,9 = 0,157$ ou $(7,027 - 6,591 / 2,5) * 1,6 = 0,279$ où 0,9 et 1,6 ont été obtenus par la soustraction entre les différentes concentrations et la nôtre (5,9g/dl - 5 g/dl et 7,5 g/dl - 5,9 g/dl respectivement). On peut additionner 6,591 + 0,157 ou soustraire 7,027 - 0,279 pour obtenir 6,748 qui est la valeur du % CH max saturable correspondant à la concentration totale des lipides de notre échantillon (5,9g/dl).

3.10 Analyses statistiques

Les résultats de chaque groupe sont exprimés sous forme de moyenne \pm l'écart-type. La comparaison entre 2 groupes a été réalisée par le test de t de Student tandis que celle entre 3 groupes par analyse de variance (ANOVA) et la signification a été déterminée par le test de Tukey's-b. Les corrélations ont été déterminées à l'aide du test de Pearson. Les résultats sont considérés significatifs à $p < 0,05$.

4. Résultats

4.1. Consommation alimentaire

Comme les régimes LG et LG +2 et 6% PC sont isoénergétiques (4.64, 4.69 et 4.82 cal/g de diète respectivement), la quantité de nourriture ingérée était similaire entre ces groupes (3 à 4 g/souris/jour). La consommation de nourriture plus élevée observée chez le groupe témoin (6 à 7 g/souris/jour) est dûe à une diminution de l'apport énergétique (4,07 cal/g de diète) et le contenu plus élevé en glucose.

4.2. Poids corporel et poids du foie

Le gain pondéral était progressif pour tous les groupes. Le tableau II montre que le poids corporel final et le poids du foie n'étaient pas significativement différents entre les groupes LG et LG+2%PC après 4 et 8 semaines de traitement diététique. Cependant, le poids du foie/100 g du poids corporel était significativement supérieur chez le groupe LG+2% PC après 8 semaines. Dans le 2^{ème} volet de l'étude, le tableau III montre que les souris soumises aux diètes LG ou LG+6%PC après 4 semaines de traitement, avaient un poids corporel final significativement inférieur comparativement à celles soumises à la diète témoin (22 g vs 25 g). Tandis que le poids du foie et le poids du foie/100 g du poids corporel étaient significativement supérieurs chez les groupes LG et LG+6% PC par rapport au groupe témoin. Il n'y avait aucune différence significative entre les groupes LG et LG+6% PC pour ces paramètres.

Tableau II : Effet des diètes LG et LG + 2% PC sur le poids corporel et le poids du foie des souris après 4 et 8 semaines de traitement.

Paramètres	4 semaines		8 semaines	
	LG	LG+2%PC	LG	LG+2%PC
poids corporel final (g)	22.7 ± 2.2	23.6 ± 1.4	23.1 ± 2.2	23.3 ± 1.7
poids du foie (g)	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.1
g foie/100 g poids corporel	6.3 ± 0.9	6.0 ± 0.3	5.8 ± 0.4	6.7 ± 0.5 ^a

Le nombre d'animaux varie entre 8 et 9 par groupe
 Les valeurs sont exprimées en moyenne ± l'écart-type
^a = p<0.05 quand comparé au groupe lithogénique de la même durée de traitement

Tableau III : Effet des diètes LG, LG + 6% PC et témoin sur le poids corporel et le poids du foie des souris après 4 semaines de traitement

Paramètres	LG	4 semaines LG+6%PC	témoin
poids corporel final (g)	22 ± 1.8 ^c	22.2 ± 1.1 ^c	25.4 ± 1.4 ^{a,b}
poids du foie (g)	1.5 ± 0.3 ^c	1.3 ± 0.2 ^c	1.0 ± 0.1 ^{a,b}
g foie/100 g poids corporel	7.0 ± 1.0 ^c	6.0 ± 1.0 ^c	4.0 ± 0.3 ^{a,b}

Le nombre d'animaux est 10 pour les groupes LG et LG+6%PC, 5 pour le groupe témoin

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± l'écart-type

^a = p<0.05 quand comparé au groupe LG

^b = p<0.05 quand comparé au groupe LG+ 6% PC

^c = p<0.05 quand comparé au groupe témoin

4.3. Formation des calculs biliaires de cholestérol

Le tableau IV montre l'incidence de la formation des pré-calculs (particules en suspension ou la boue biliaire) et des calculs biliaires de CH chez les différents groupes de souris.

Le tableau IV montre que chez le groupe soumis à la diète LG+2%PC, les pré-calculs ont été formés après 4 semaines chez 11% des animaux, et ça a augmenté à 33% après 8 semaines. La formation des calculs biliaires de CH était de 22% après 4 semaines et a augmenté à 44% après 8 semaines. Le total de la formation des pré-calculs et des calculs étaient 33% et 77% après 4 et 8 semaines, respectivement. Ceci en comparaison avec 47% et 89% après 4 et 8 semaines respectivement chez le groupe LG. Ces résultats montrent que la supplémentation de la diète avec 2% de PC a retardé la formation des calculs biliaires de CH tel qu'il est observé avec la différence à la 4^{ème} semaine. Quand les souris étaient soumises à la diète LG+ 6% PC, il y avait seulement 10% de formation de pré-calculs comparativement à 47% de calculs chez le groupe LG; la supplémentation de la diète avec 6% de PC, a prévenu la formation des calculs biliaires de CH.

4.4. Effets des différentes diètes sur le flux biliaire et la sécrétion des acides biliaires et des lipides biliaires

La figure 3 montre le flux et la sécrétion des AB et des lipides biliaires après 1 heure de collection de bile hépatique chez les souris soumises à la diète LG ou LG + 2% PC après 4 et 8 semaines. Il n'y avait aucune différence significative dans le flux biliaire ni dans la sécrétion des AB ou des lipides biliaires entre ces 2 groupes à l'exception d'une augmentation significative de 30% du flux biliaire chez le groupe soumis à la diète LG

après 8 semaines. La figure 4 montre que l'augmentation de la supplémentation en PC à 6% dans la diète LG, a causé une augmentation significative de 30% du flux biliaire, une augmentation de 7% de la sécrétion des AB et de 26% de celle des PL et une diminution de 10% de la sécrétion de CH par rapport à la diète LG. En comparaison avec la diète témoin, la diète LG a induit une augmentation significative de la sécrétion des AB, PL et du CH biliaires hépatiques mais il n'y avait pas de changement dans le flux biliaire. Avec la diète enrichie de 6% PC, il y a eu une augmentation significative de la sécrétion des AB, PL et du CH biliaires hépatiques et le flux biliaire a été également augmenté de façon significative.

Tableau IV: Incidence de la formation des pré-calculs et des calculs biliaires de cholestérol chez les souris soumises aux diètes LG, LG+2%, 6% PC et témoin

Semaine	Diète	% incidence formation pré-calculs	% incidence formation de calculs
4	LG	0	47
	LG+2%PC	11	22
	LG+6%PC	10	0
	Témoin	0	0
8	LG	0	89
	LG+2%PC	33	44

Les pré-calculs sont définis par la présence de particules en suspension et de boue biliaire.
Les calculs biliaires sont définis par des agglomérations sphériques visibles à l'œil nu.

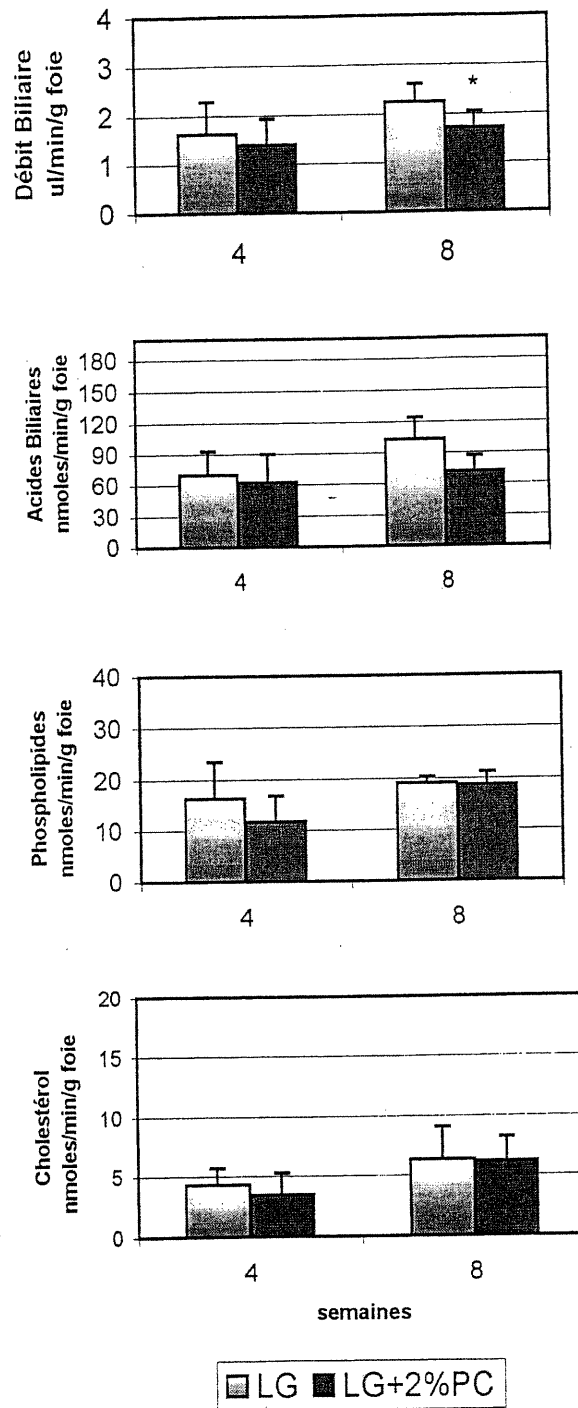


Fig.3 : Le débit biliaire et la sécrétion des acides biliaires, des phospholipides et du cholestérol biliaires après 1 heure de collection chez les souris soumises à la diète lithogénique (LG) et lithogénique+2% de phosphatidylcholine (LG+2%PC) après 4 et 8 semaines de traitement.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'écart-type.

* Significativement différent du groupe LG.

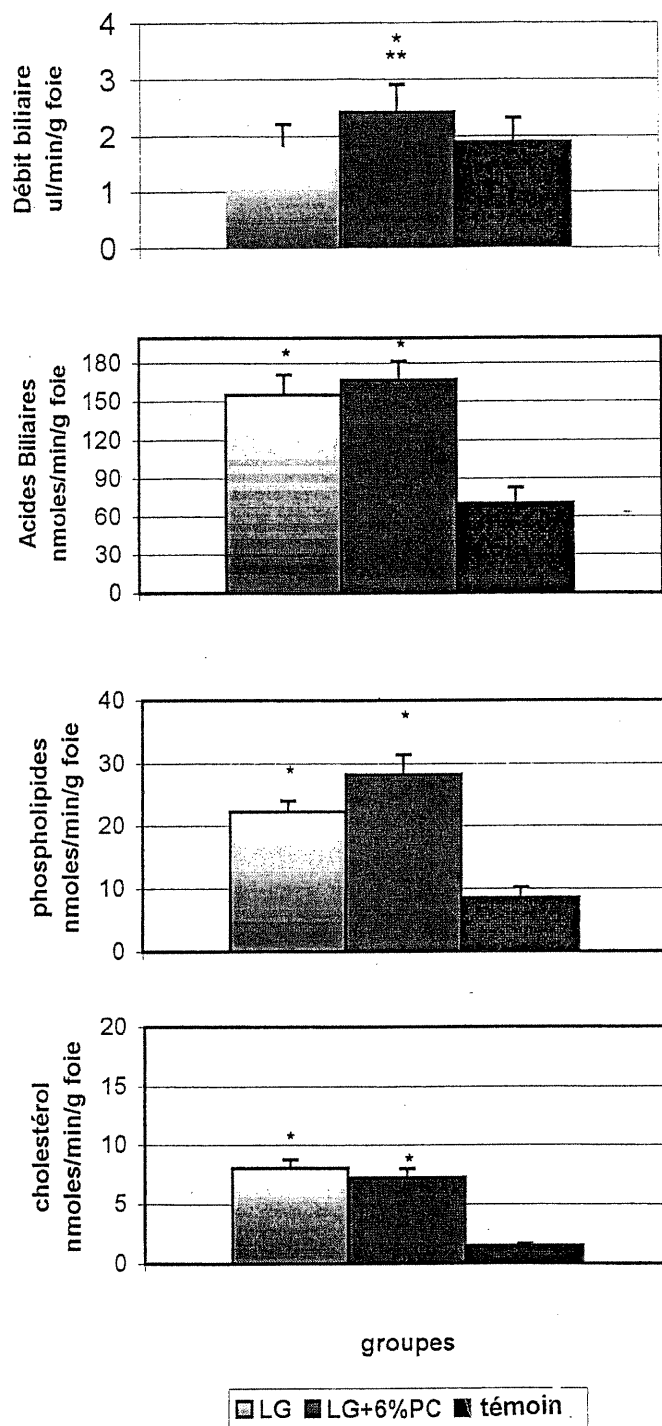


Fig.4 : Le débit biliaire et la sécrétion des acides biliaires, des phospholipides et du cholestérol après 1 heure de collection chez les souris soumises à la diète lithogénique (LG), lithogénique+6% de phosphatidylcholine (LG+6%PC) et témoin après 4 semaines de traitement. les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'écart-type.

* différent significativement de la diète témoin.

** différent significativement de la diète LG.

4.5. Profil des acides biliaires présents dans la bile hépatique

Le tableau V montre la composition en AB de la bile hépatique des différents groupes de souris nourries avec les différentes diètes. Chez le groupe témoin, les AB en ordre de leur pourcentage de contribution étaient: Muri, CA, Doc, Urso et CDC.

En comparaison avec la diète témoin, les diètes LG et LG + 2 et 6% PC ont augmenté le pourcentage de CA et de DOC et ont réduit celui de Muri et de Urso tandis que le pourcentage de CDC était similaire. Le pourcentage de la supplémentation de la diète LG en PC (2 ou 6%) n'a pas influencé le profil des AB majeurs. Toutes les souris qui ont été soumises à la diète LG ou celle enrichie avec la PC ont montré une similarité de distribution des AB. Ainsi, le pourcentage de contribution, par ordre d'importance, était de l'ordre suivant : CA, Doc, Muri, CDC et Urso.

L'analyse par LC-MS-MS a démontré que dans la bile des souris soumises à la diète LG, l'acide taurotrihydroxycholique (T-triOH) est prédominant à 75% tandis que l'acide taurodihydroxycholique (T-diOH) constituait 20 à 25% des AB conjugués avec la taurine tel qu'illustré à la fig.5. Quant aux AB conjugués avec la glycine, les acides glycotrihydroxycholique (G-triOH) et glycodihydroxycholique (G-diOH), ne constituaient que 4 à 6% du total d'AB conjugués (fig.6). La diète enrichie de PC n'a pas affecté la conjugaison des AB (fig.7 et 8). Toutes les souris qui ont été soumises à la diète LG ou la diète LG enrichie avec la PC, avaient le même profil de conjugaison. Au moins 94% des AB étaient conjugués avec la taurine.

Tableau V: Composition en acides biliaires de la bile hépatique des différents groupes de souris

Diète	Semaine	n	%Doc	%CDC	%CA	%Urso	%Muri
témoïn	4	3	4,03 ^{a,b} ± 1,38	2,23 ± 1,87	39,33 ^{a,b} ± 8,68	3,14 ^{a,b} ± 2,75	51,2 ^{a,b} ± 9,73
LG	4	9	13,38 ^c ± 4,41	2,21 ± 1,04	78,14 ^c ± 3,81	0,47 ^c ± 0,37	5,76 ^c ± 1,61
LG+2%PC	4	8	14,28 ^c ± 4,92	2,39 ± 1,02	76,75 ^c ± 5,68	0,91 ^c ± 0,22	5,68 ^c ± 1,10
LG+6%PC	4	4	14,18 ^c ± 2,26	2,63 ± 1,12	77,83 ^c ± 3,15	0 ^c	5,38 ^c ± 3,35
LG	8	6	16,67 ± 5,69	1,65 ± 0,50	74,52 ± 6,89	1,12 ± 0,19	6,03 ± 2,14
LG+2%PC	8	6	13,68 ± 2,54	3,53 ^a ± 1,53	75,2 ± 3,63	1,02 ± 0,27	6,6 ± 1,50

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± l'écart-type.

^a = p < 0.05 quand comparé au groupe LG pour la même durée de traitement.

^b = p < 0.05 quand comparé au groupe LG+6%PC pour la même durée de traitement.

^c = p < 0.05 quand comparé au groupe témoin pour la même durée de traitement.

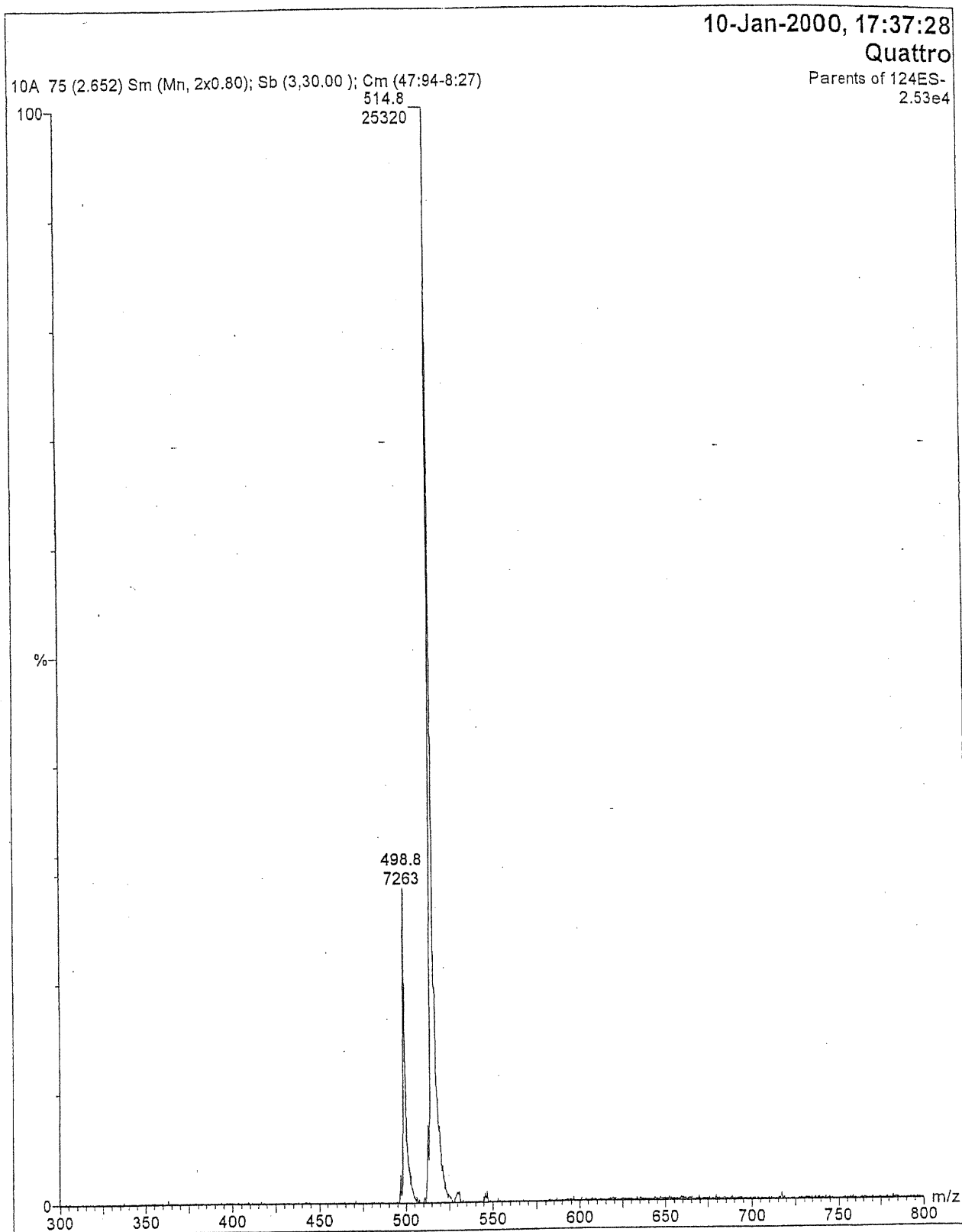


Fig.5. Spectre des acides biliaries conjugués à la taurine présents dans la bile d'une souris soumise à la diète LG après 4 semaines. Les pics 514.8 et 498.8 représentent le poids moléculaire des T-triOH et des T-diOH, respectivement.

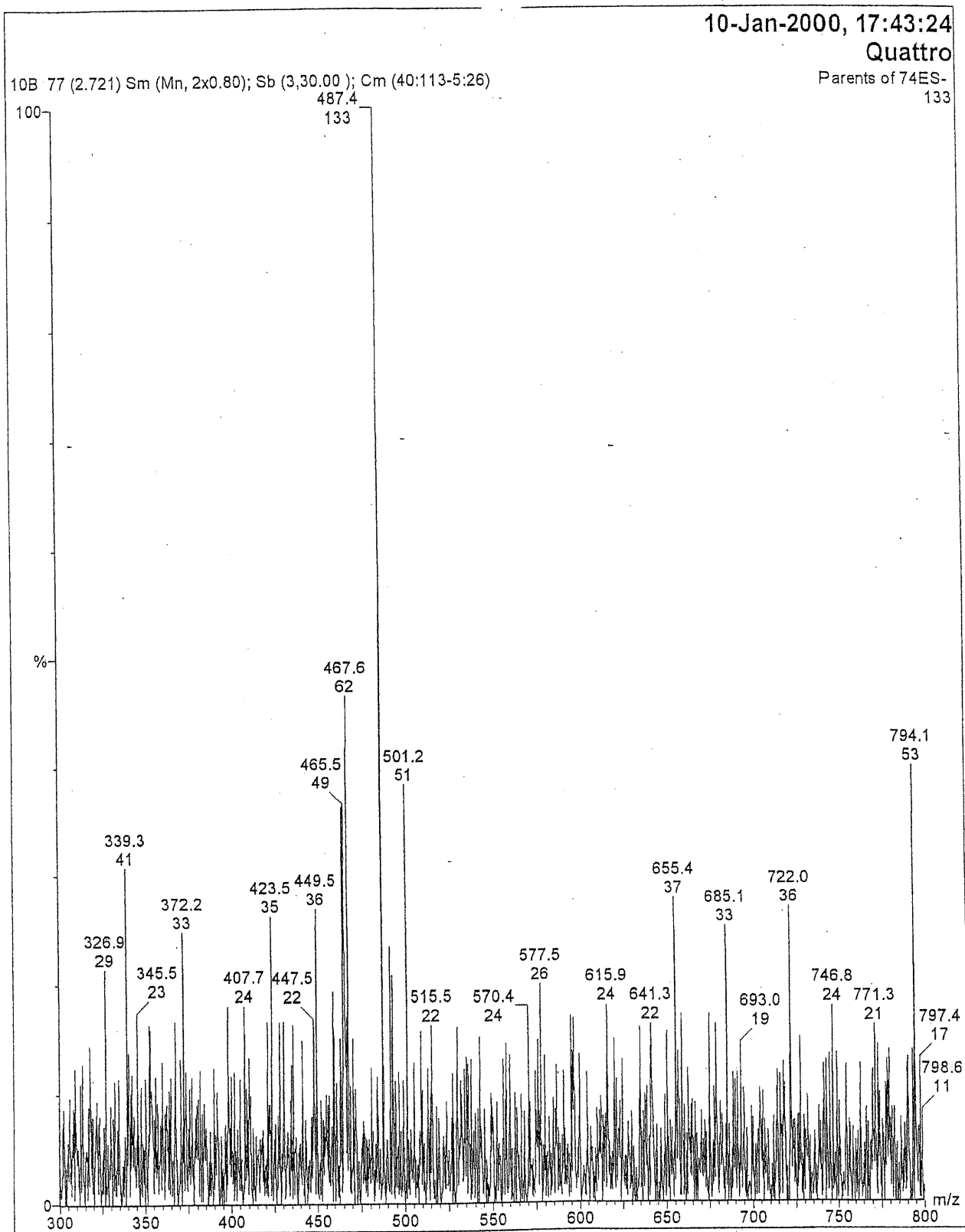


Fig.6. Spectre des acides biliaries conjugués à la glycine présents dans la bile d'une souris soumise à la diète LG après 4 semaines. Les pics 464.7 et 451.5 représentent le poids moléculaire de G-triOH et des G-diOH, respectivement.

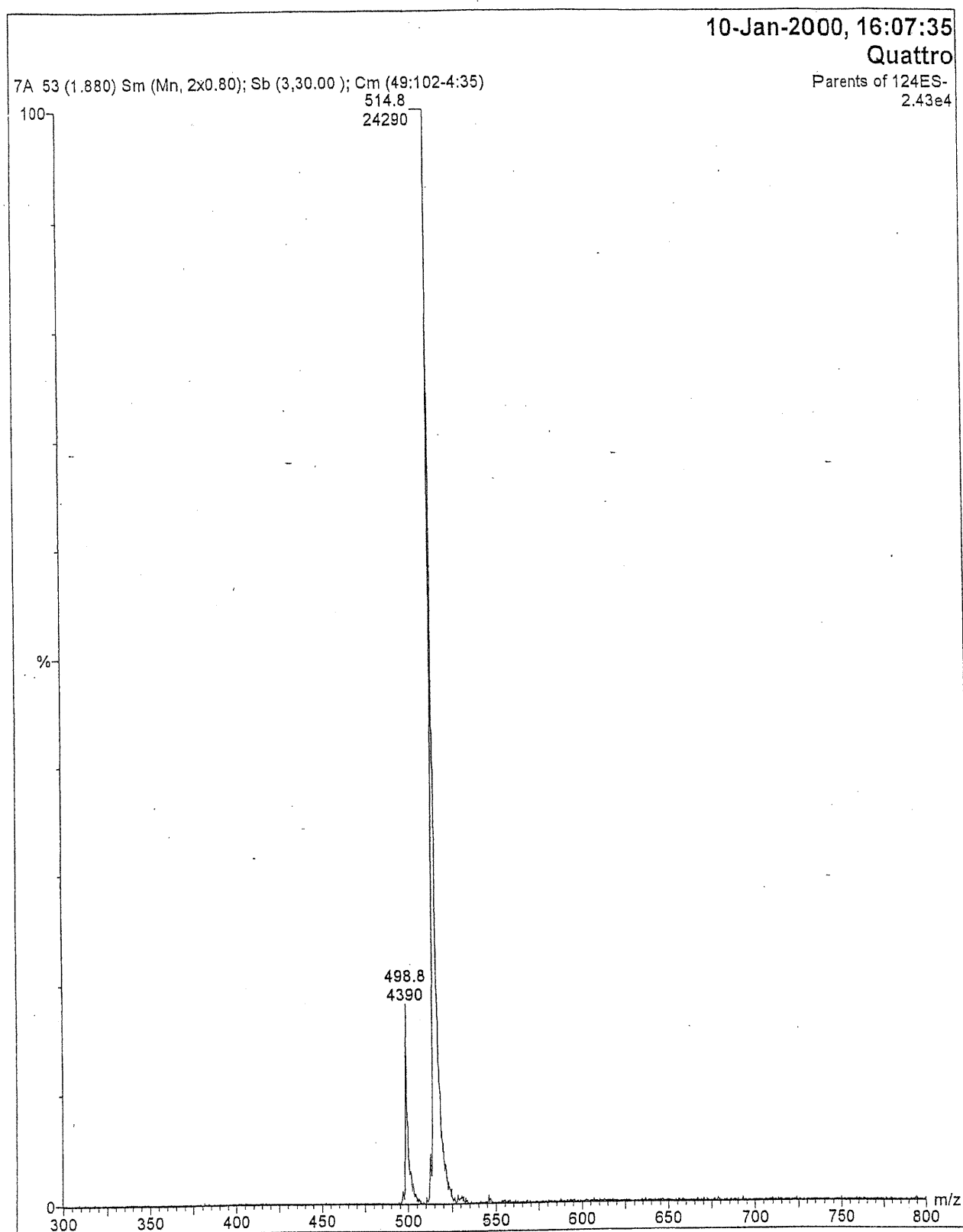


Fig.7. Spectre des acides biliaires conjugués à la taurine présents dans la bile d'une souris soumise à la diète LG + 2% PC après 4 semaines. Les pics 514.8 et 498.8 représentent le poids moléculaire des T-triOH et des T-diOH, respectivement.

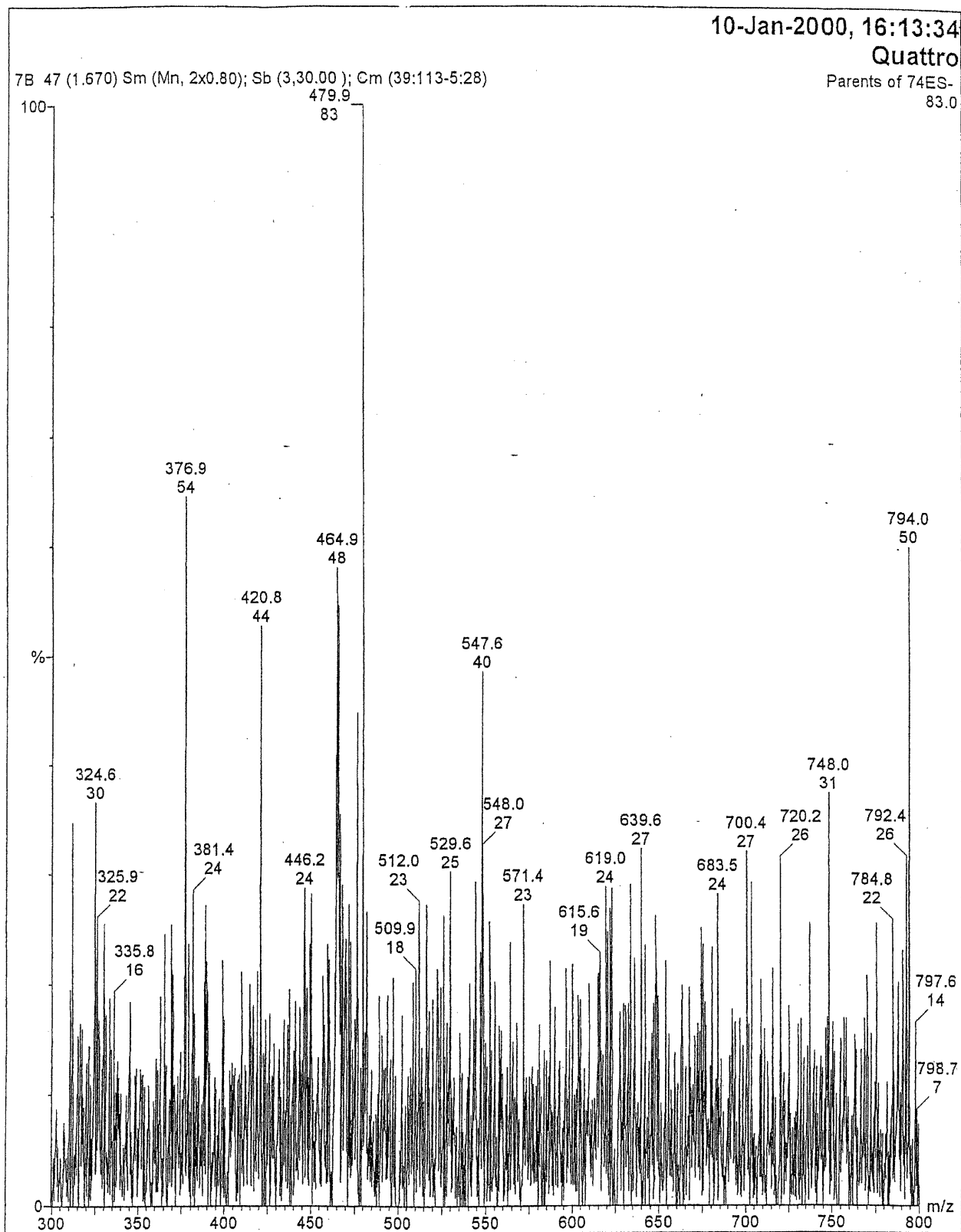


Fig.8. Spectre des acides biliaries conjugués à la glycine présents dans la bile de souris soumise à la diète LG + 2% PC après 4 semaines. Les pics 464.7 et 451.5 représentent le poids moléculaire de G-triOH et des G-diOH, respectivement.

4.6. Profil des phospholipides biliaires hépatiques et leur composition en acides gras

La pureté de la PC, extraite des grains de soya et ajoutée à la diète LG, a été confirmée par LC-MS-MS. Les espèces présentes étaient la 1-palmitoyl-2-arachidonoyl- (la plus prédominante), suivie par les 1-palmitoyl-2-linoléoyl-, 1-oléoyl-2-linoléoyl-, 1-stéaroyl-2-linoléoyl- sn-glycérophosphocholines et en plus faible proportion les 1-palmitoléoyl-2-arachidonoyl- et palmitoléoyl-2-linoléoyl-sn-glycérophosphocholines (fig.9).

Dans la bile, les PL sont composés principalement de PC. La distribution des PC et des acides gras n'était pas différente entre les groupes LG, LG enrichie en PC (fig.10) ou témoin (fig.11). Les PC prédominantes étaient les 1-palmitoyl-2-linoléoyl- et 1-palmitoyl-2-oléoyl- sn-glycérophosphocholines qui représentaient 70 à 75%. Les espèces mineures étaient les 1-oléoyl-2-linoléoyl-, 1-stéaroyl-2-linoléoyl-, 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-, 1-palmitoléoyl-2-linoléoyl-, 1-palmitoyl-2-palmitoléoyl- et 1-linoléoyl-2-arachidonoyl- sn-glycérophosphocholines. Ces résultats montrent que la composition de la diète en acides gras n'influence aucunement celle de la bile hépatique des souris.

4.7. Composition lipidique de la bile vésiculaire

Le tableau VI illustre la composition lipidique de la bile vésiculaire des différents groupes de souris. On remarque une diminution significative du pourcentage de CH et une augmentation du pourcentage des AB chez les souris soumises à la diète LG + 2% PC par rapport à la diète LG, après 4 semaines de traitement. Tandis que le pourcentage

des PL chez les souris soumises à la diète LG + 2% PC par rapport à la diète LG après 4 semaines de traitement ne variait pas. Après 8 semaines de traitement, il n'y a aucune différence significative du pourcentage molaire des AB, PL et CH entre ces 2 groupes.

Dans le 2^{ème} volet de l'étude, les souris soumises à la diète témoin avaient un pourcentage de CH significativement inférieur comparativement aux souris soumises à la diète LG et LG + 6% PC et un pourcentage des PL significativement supérieur comparativement aux souris soumises à la diète LG + 6% PC. Il n'y a aucune différence significative du pourcentage molaire des AB, PL et CH entre les groupes LG et LG + 6% PC (tableau VI).

18-Jan-2000, 11:07:44

Quattro

Parents of 184ES+
2.99e4

STAN1 48 (1.705) Sm (Mn, 2x0.80); Sb (3,30.00); Cm (32:119-7:27)

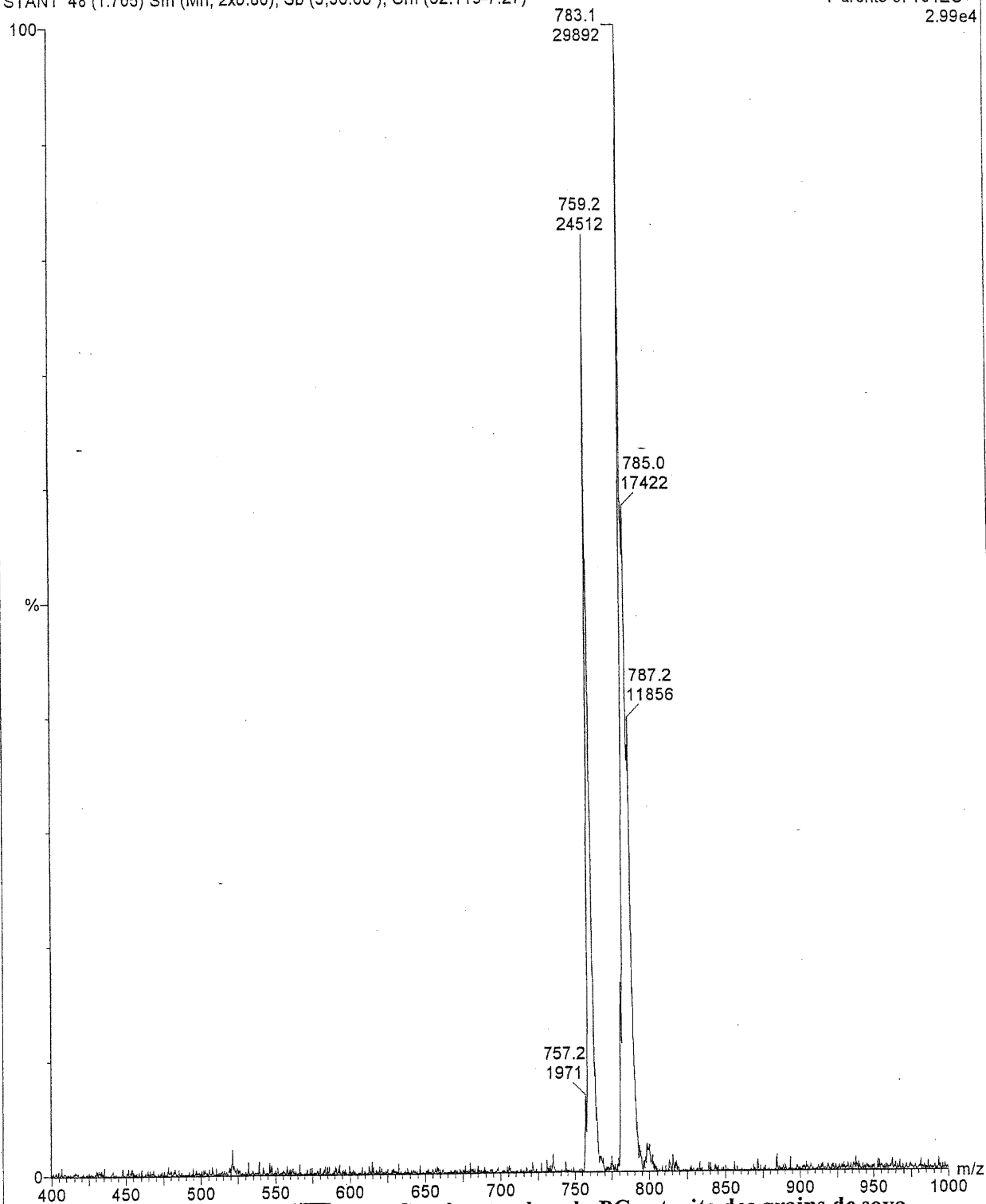


Fig.9. Spectre des espèces de PC présentes dans la PC extraite des grains de soya et ajoutée à la diète LG. Les pics représentent le poids moléculaire des différentes PC dépendamment de leur contenu en acides gras. Les pics 783.1, 759.2, 785.0, 787.2, 781.3, 757.2 représentent les 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-, 1-palmitoyl-2-linoleoyl-, 1-oleoyl-2-linoleoyl-, 1-stearoyl-2-linoleoyl-, 1-palmitoleoyl-2-arachidonoyl- et 1-palmitoleoyl-2-linoleoyl-sn-glycerophosphocholines, respectivement.

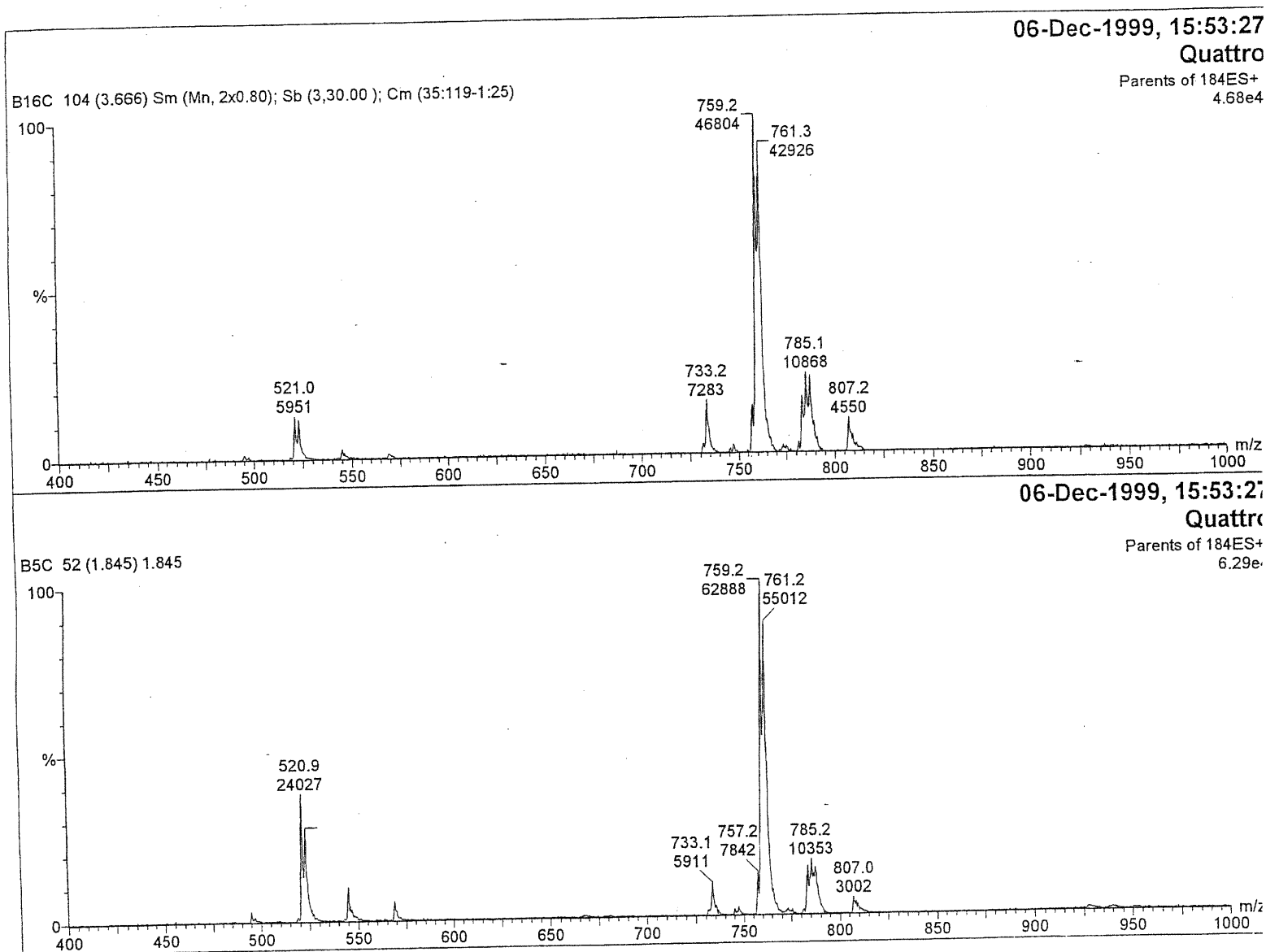


Fig.10. Spectres des PL ayant le groupement choline. Les PC se trouvent entre 725 à 825 m/z et les LysoPC entre 475 à 575 m/z, présentes dans la bile d'une souris soumise à la diète LG (spectre du haut), à la diète LG + 2% PC (spectre du bas). Les pics 759.2, 761.3, 785.2, 787.2, 783.3, 757.2, 733.2 et 807.2 représentent les 1-palmitoyl-2-linoléoyl-, 1-palmitoyl-2-oléoyl-, 1-oléoyl-2-linoléoyl-, 1-stéaroyl-2-linoléoyl-, 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-, 1-palmitoléoyl-2-linoléoyl-, 1-palmitoyl-2-palmitoléoyl- et 1-linoléoyl-2-arachidonoyl- sn-glycérophosphocholines, respectivement.

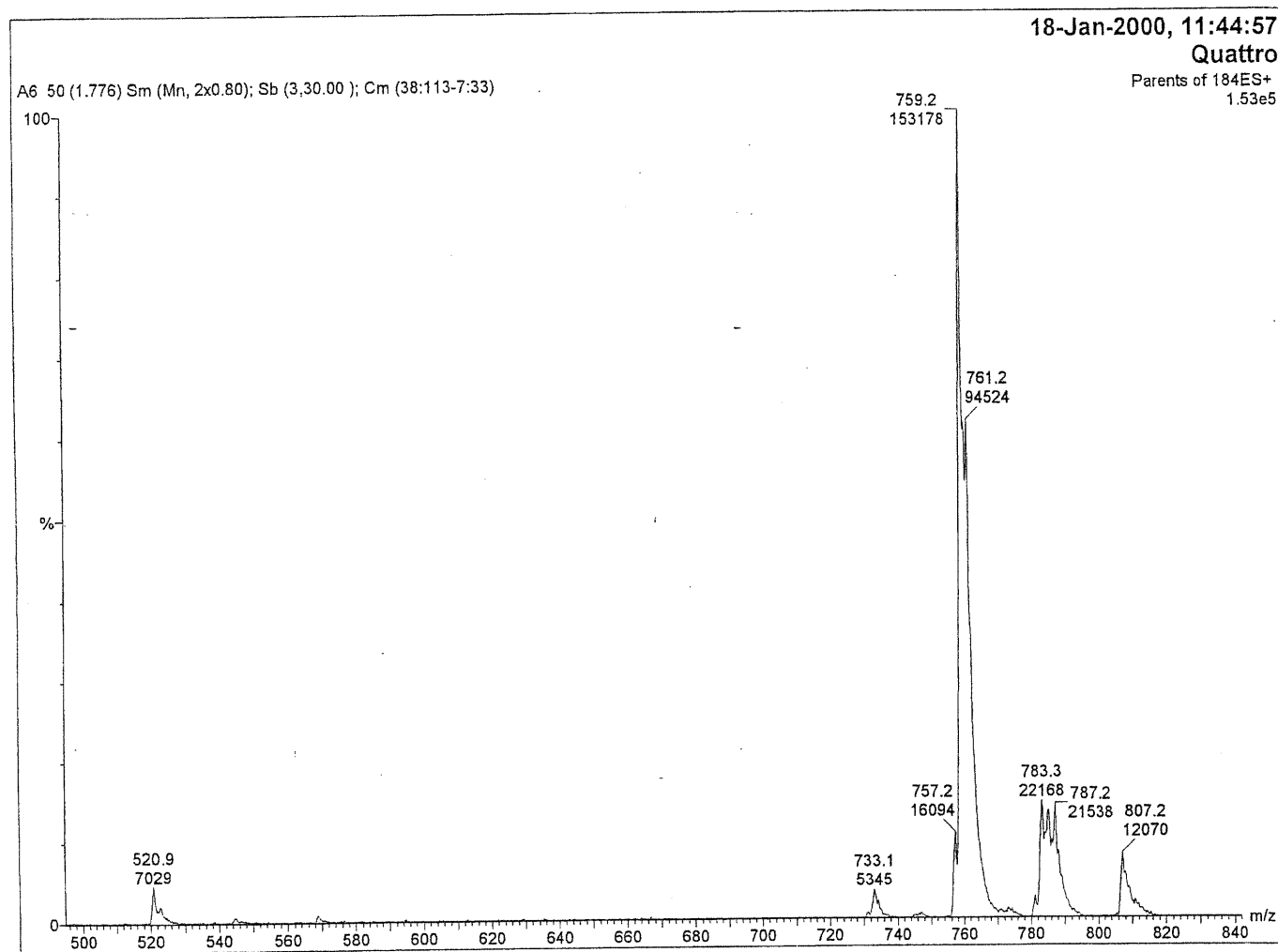


Fig.11. Spectres des PL ayant le groupement choline. Les PC se trouvent entre 725 à 825 m/z et les LysoPC entre 475 à 575 m/z, présentes dans la bile d'une souris soumise à la diète témoin. Les pics 759.2, 761.3, 785.2, 787.2, 783.3, 757.2, 733.2 et 807.2 représentent les 1-palmitoyl-2-linoléoyl-, 1-palmitoyl-2-oléoyl-, 1-oléoyl-2-linoléoyl-, 1-stéaroyl-2-linoléoyl-, 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-, 1-palmitoléoyl-2-linoléoyl-, 1-palmitoyl-2-palmitoléoyl- et 1-linoléoyl-2-arachidonoyl- sn-glycérophosphocholines, respectivement.

Table VI: Compositions lipidiques de la bile vésiculaire chez les différents groupes de souris

Semaines	LG			LG + 2% PC		
	AB	PL (% Mole)	CH	AB	PL (% Mole)	CH
4	74,04 ± 4,43	11,92 ± 1,48	14,04 ± 5,14	80,52 ± 3,27 ^a	11,75 ± 1,56	7,73 ± 2,11 ^a
8	73,22 ± 6,44	18,89 ± 5,05	7,89 ± 3,29	74,28 ± 4,93	18,35 ± 3,40	7,38 ± 1,99

Semaine	LG			LG + 6% PC			témoin		
	AB	PL (% Mole)	CH	AB	PL (% Mole)	CH	AB	PL (% Mole)	CH
4	79,93 ± 3,10	15,27 ± 2,13	4,80 ± 1,15	81,69 ± 2,64	13,91 ± 1,67	4,40 ± 1,20	82,12 ± 2,44	16,44 ± 1,80 ^b	1,44 ± 0,63 ^{a,b}

Le pourcentage molaire (%mole) est obtenue par la division du nombre de moles de chacun des trois composants biliaires sur le nombre total de ces composants. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± l'écart type.

^a = p < 0,05 quand comparé au groupe LG pour une même durée de traitement.

^b = p < 0,05 quand comparé au groupe LG + 6% PC pour une même durée de traitement.

4.8. L'indice de saturation de cholestérol

Les figures 12 et 13 montrent l'indice de saturation de CH sous forme de pourcentage de la bile hépatique et vésiculaire des différents groupes de souris. On observe que la supplémentation de la diète LG en PC à 2% a entraîné une diminution du % de CSI, un marqueur de la saturation de la bile en CH par rapport à la diète LG. Cette diminution était significative dans la bile vésiculaire après 4 semaines de traitement (fig.12). Dans la bile hépatique, le % de CSI chez les souris témoins était 75% et 90% chez celles soumises à la diète LG + 6% PC. Les % de CSI chez ces 2 groupes étaient significativement plus petits que le pourcentage observé chez les souris soumises à la diète LG (115%). De même dans la bile vésiculaire, les % de CSI, chez les souris soumises à la diète témoin (35%) ou LG + 6% PC (87%), étaient inférieurs à celui chez les souris soumises à la diète LG (95%) sauf que la différence est significative uniquement entre les groupe LG et témoin (Fig.13).

4.9. La concentration d'APF dans la bile hépatique et vésiculaire

Les figures 14 et 15 montrent la concentration d'APF chez les souris soumises aux diètes LG ou LG + 2% PC après 4 et 8 semaines ainsi que chez celles soumises aux diètes LG, LG + 6% PC ou témoin après 4 semaines. La concentration d'APF présente n'était pas constante entre la bile hépatique et vésiculaire du même groupe. Elle était plus élevée dans la bile vésiculaire que dans la bile hépatique, sauf chez le groupe témoin où elle était similaire ($0,013 \pm 0,001$ et $0,014 \pm 0,001$ nmoles/ul dans la bile hépatique et vésiculaire, respectivement). On observe également que les diètes LG ou

LG enrichie avec 2 et 6% PC ont entraîné l'augmentation de la concentration d'APF présente par rapport à la diète témoin. Quant à l'effet de la supplémentation de la diète en PC par rapport à la diète LG sur la concentration d'APF, la figure 14 montre que dans la bile hépatique, elle était significativement supérieure chez les souris soumises à la diète LG + 2% PC après 4 et 8 semaines. Cependant, dans la bile vésiculaire, elle n'était supérieure qu'après 8 semaines tandis qu'elle était significativement inférieure après 4 semaines. À l'opposé, la concentration d'APF était légèrement supérieure dans la bile hépatique et vésiculaire chez le groupe LG par rapport au groupe LG + 6% PC après 4 semaines (fig.15).

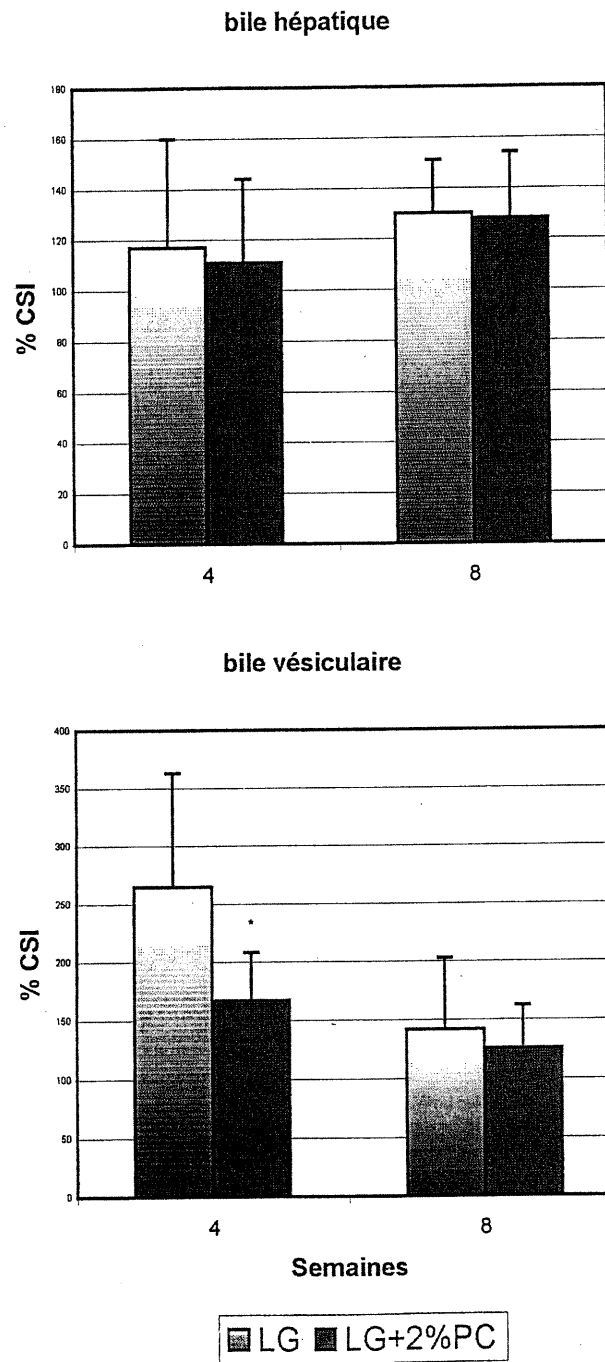


Fig.12. L'indice de saturation en cholestérol de la bile hépatique et vésiculaire des souris soumises à la diète LG ou LG+2%PC après 4 et 8 semaines de traitement.

les valeurs sont exprimées en moyenne \pm l'écart-type.

* différent significativement du groupe LG.

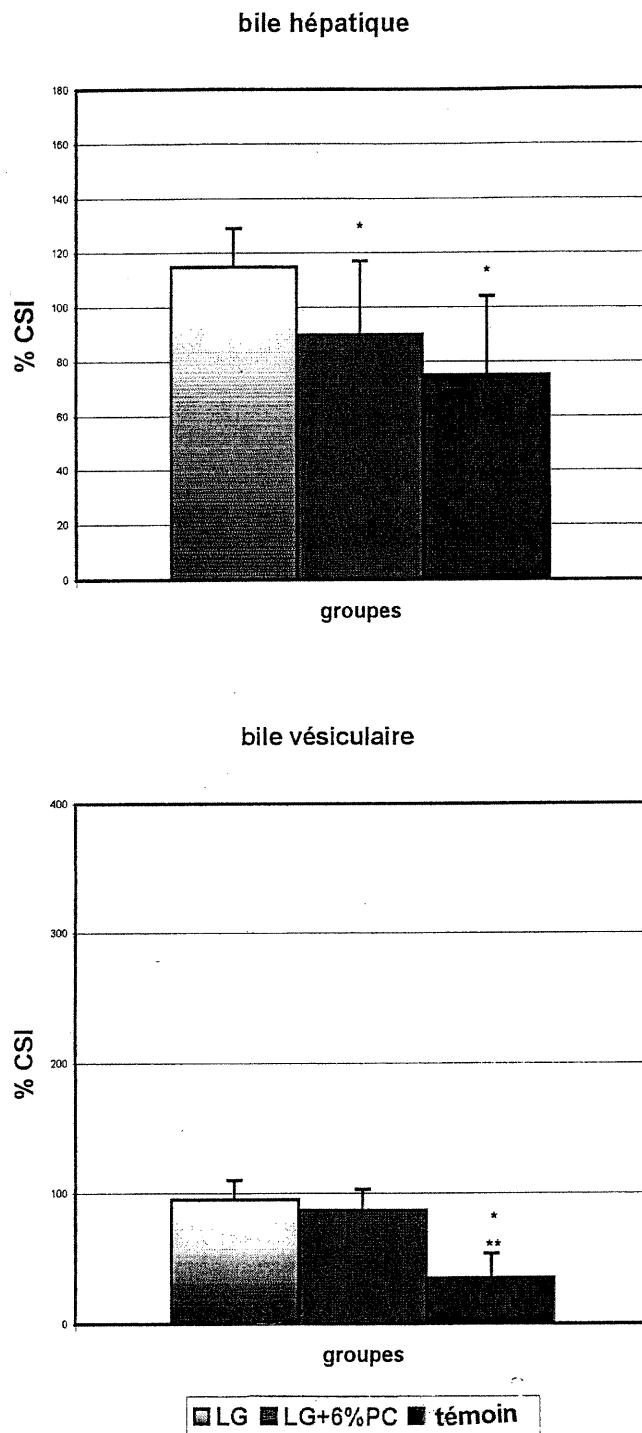


Fig.13. L'indice de saturation en cholestérol de la bile hépatique et vésiculaire des souris soumises à la diète LG, LG+6%PC ou témoin après 4 semaines de traitement.

les valeurs sont exprimées en moyenne \pm l'écart-type.

* différent significativement du groupe LG.

** différent significativement du groupe LG + 6% PC.

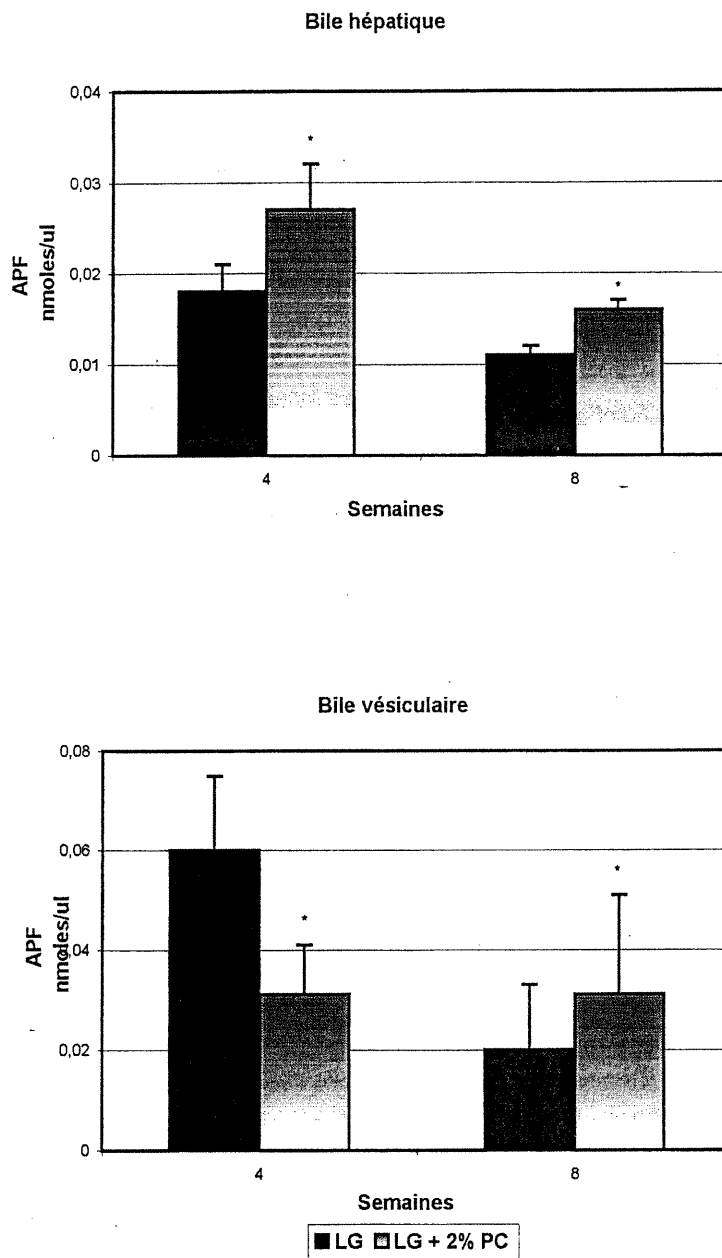


Fig.13. La concentration d'APF présente dans la bile hépatique et vésiculaire chez les souris soumises à la diète LG ou LG + 2% PC après 4 et 8 semaines. les valeurs sont exprimées en moyenne \pm l'écart-type.

* différent significativement du groupe LG pour une même durée de traitement.

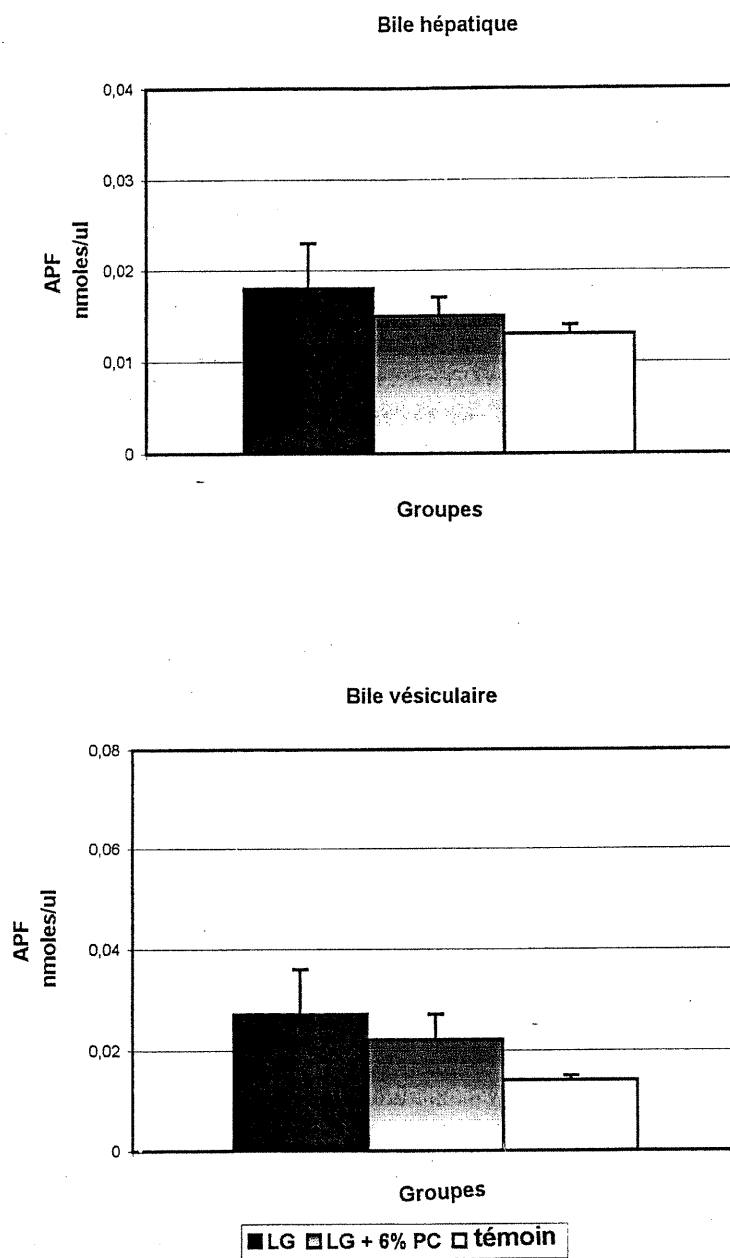


Fig.14. La concentration d'APF présente dans la bile hépatique et vésiculaire chez les souris soumises à la diète LG, LG + 6% PC ou témoin après 4 semaines. les valeurs sont exprimées en moyenne \pm l'écart-type. Aucune différence significative entre les groupes.

5. Discussion et conclusion

Plusieurs facteurs sont associés avec la lithiase cholestérolique. Cependant, la génétique et la nutrition sont les deux facteurs majeurs impliqués. L'importance des facteurs génétiques est évidente chez les animaux, Fujihara et *al* (1978) ont reporté que la prévalence des calculs biliaires de CH variait entre 0 à 100% chez 6 souches de souris de laboratoire. Chez les humains, la lithiase cholestérolique peut être familiale (Kesaniemi et *al*, 1989) et chez certaines populations de l'Amérique du nord et du sud, un haut pourcentage d'adultes développent des calculs biliaires de CH (Weiss et *al*, 1984). Les gènes *Lith* contrôlent la susceptibilité à la formation des calculs biliaires de CH chez certaines souches de souris. Cependant, la lithiase cholestérolique ne se manifeste pas spontanément et la diète LG est essentielle à son développement (Khanuja et *al*, 1995; Wang et *al*, 1997). Les phénotypes des souris avec les allèles *Lith* susceptibles sont l'hypersécrétion du CH biliaire, la sursaturation en CH de la bile vésiculaire, la cristallisation et une incidence élevée à la formation des calculs biliaires de CH (Wang et *al*, 1997a,b).

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet de la supplémentation alimentaire en PC sur la formation des calculs biliaires de CH chez les souris susceptibles à la lithiase cholestérolique. Les PC étant des PL présents en majorité dans la bile ont démontré un effet bénéfique sur la solubilité et la cristallisation du CH dans la bile artificielle et humaine (après cholecystéctomie). De plus, des études effectuées chez le rat ont démontré que la supplémentation en PC améliore la formation de la bile en augmentant le transport maximal d'AB et la sécrétion des lipides biliaires. Dans notre étude, nous avons constaté que la supplémentation à 2% en PC retarde la formation des calculs

biliaires de CH à 8 semaines par rapport à 4 semaines (tableau IV). Ceci a été associé avec une réduction de l'indice de saturation en CH (fig.12) et avec une augmentation significative de la concentration de la protéine antinucléante hépatique (APF) (fig.14). De plus, l'augmentation de la supplémentation à 6% en PC, la prévient complètement à 4 semaines (tableau IV), et ceci principalement par une réduction significative de l'indice de saturation en CH de la bile hépatique (fig.13) et par l'augmentation significative du flux biliaire et celle des AB et des PL (fig.4).

Dans les pays industrialisés, la lithiase cholestérolique représente une maladie d'une grande importance économique (Hess et Maki, 1992). Elle affecte plus que 20 millions d'Américains et coûte 6 billions de dollars annuellement ce qui représente 1% des soins de la santé (Paigen, 1995). La lithiase biliaire cholestérolique est multifactorielle et aucune anomalie précise n'a déjà été identifiée (Hay et Carey, 1990; Johnston et Kaplan, 1992). Cependant, le défaut clé dans la lithiase biliaire cholestérolique humaine, est l'hypersécrétion du CH induisant ainsi la formation de la bile lithogénique (Carey et LaMont, 1992; LaMont et Carey, 1992; Carey, 1993). Durant le processus de la formation des calculs biliaires de CH, la sursaturation de la bile en CH est suivie par la nucléation du CH (Sedaghat, 1980), précipitation des cristaux de CH qui s'agglomèrent pour former des calculs de CH (Carey, 1996). Les anomalies métaboliques sous-jacentes à la sursaturation de la bile en CH ne sont pas encore complètement déterminées. Toutefois, cette dernière se produit quand la concentration en CH excède la capacité de solubilisation des lipides biliaires. Le rôle bénéfique des PL biliaires s'exercerait de plusieurs façons. D'abord, le CH étant insoluble dans l'eau, il est solubilisé d'abord par les PL et ensemble ils forment des vésicules. Celles-ci sont solubilisées par la suite par les AB pour former des micelles mixtes (Strasberg et

Harvey, 1990). Également, les PC alimentaires semblent augmenter la sécrétion lipidique biliaire et ainsi le flux biliaire, chez le rat, ce qui est critique pour l'homéostasie du CH (Leblanc et *al*, 1998). De plus, les PC auraient une influence sur la prolongation du temps de nucléation de CH dans la bile artificielle (Halpern et *al*, 1993).

Le modèle murin est un outil de recherche valable dans l'investigation de la lithiase biliaire humaine à cause de l'homologie présente entre les génomes humain et murin (Debry et Seldin, 1996), de la caractérisation de son génome, du progrès en technologies génétiques (Paigen, 1995) et de la disponibilité de cette espèce. Le choix des souris susceptibles nous a paru le plus convenable à cause de leur potentiel commun, éliminant ainsi l'interférence des facteurs génétiques et l'effet observable serait uniquement attribuable aux PC.

En accord avec les résultats d'autres études (Bergman et *al*, 1970; Whiting et Watts, 1987; Spady et Cuthbert, 1992) nous avons observé une augmentation significative du poids du foie des souris nourries avec la diète LG par rapport à la diète témoin. Ceci s'applique aussi chez les souris nourries avec la diète LG + 2 et 6% PC. Ceci est dû au contenu des diètes LG et LG + 2 ou 6% PC en CH qui entraîne une augmentation de 3x le CH total et de 8x le CH estérifié hépatique (Reihner et Ståhlberg, 1996).

Dans notre étude, nous avons observé que la supplémentation de la diète LG à 2% en PC après 4 et 8 semaines de traitement, n'a pas augmenté le débit biliaire par rapport à la diète LG. Également, il n'y avait pas de différence marquante dans la sécrétion des AB et celle des lipides biliaries (fig.3). Cependant, la supplémentation de la diète LG à

6% en PC a causé une augmentation significative du débit biliaire chez les souris soumises à cette diète par rapport à la diète LG. Cette augmentation était attribuée à l'augmentation notée dans la sécrétion des AB et PL biliaires (fig.4). L'augmentation du débit biliaire pourrait être expliquée par l'augmentation de la disponibilité des PL biliaires exogènes tel qu'il a été rapporté par Rioux et *al* (1994). L'augmentation de la sécrétion des PL dans la bile pourrait être due au fait que les PC alimentaires peuvent stimuler la captation des HDL-PC par le foie ainsi que la relâche des PC du 'pool' préformé ou nouvellement synthétisé (Polichetti et *al*, 1996). Alternativement, les diètes peuvent moduler la mobilisation du 'pool' ainsi que les protéines impliquées dans le transport de la PC et sa sécrétion dans la bile (Leblanc et *al*, 1998). Des études récentes ont démontré l'implication de MDR2 dans le transport des PL à travers la membrane canaliculaire (Van Nieuwerk et *al*, 1997). Suite à cela, nous pourrions émettre des hypothèses telles que: l'expression du gène *mdr2* favorisée par la diète enrichie en PC ou encore une augmentation de la translocation de la protéine *mdr2* au niveau canaliculaire.

Les différents PL peuvent influencer la cristallisation du CH que ce soit dans la bile artificielle (Konikoff et *al*, 1994) ou dans la bile humaine (Jüngst et *al*, 1993). Les PC saturées retardent la cristallisation du CH tandis que les PC polyinsaturées l'accélèrent dans la bile artificielle (Konikoff et *al*, 1992). Nos résultats démontrent comme le suggère la littérature (Leblanc et *al*, 1998) que la supplémentation de la diète LG en PC n'affecte ni les espèces ni la composition en acides gras des PC biliaires.

Comme rapporté dans l'étude de Fuchs et al (1998b) nous avons observé que chez les souris susceptibles, les allèles *Lith* favorisent l'hypersécrétion du CH dans la bile en réponse à la diète LG. En effet, l'hypersécrétion du CH était significativement plus élevée chez tous les groupes de souris soumises aux diètes LG ou LG + 2 et 6% PC par rapport à la diète témoin. La supplémentation de la diète en PC semble diminuer l'hypersécrétion du CH par rapport à la diète LG (fig.3 et 4). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le cholestérol libre associé avec les HDL est utilisé préférentiellement par le foie comme substrat pour la synthèse des AB (Halloran et al, 1978). Sachant que la PC augmenterait les HDL, ainsi le CH serait éliminé par catabolisme en AB préférentiellement à la sécrétion biliaire du CH.

Une autre constatation était la diminution du %CSI (marqueur de la saturation de la bile en CH, tient compte de la solubilité max du CH par les AB et les PL) chez les souris soumises aux diètes LG enrichie en PC à 2% et à 6% par rapport à la diète LG. La diminution significative du %CSI chez les souris soumises à la diète LG + 6% PC par rapport à la diète LG est probablement due à l'augmentation de la sécrétion des PL et la diminution de celle de CH.

De façon générale, l'AB trouvé de façon prédominante, chez la souris, est l'acide Muri. Le CA est également présent tandis que le taux de le DOC est bas car l'enzyme hépatique, 7α -hydroxylase l'hydroxyle pour former du CA (Beher et al, 1969; Haslewood, 1978). La supplémentation avec CA a entraîné une augmentation d'excrétion de CA et une diminution de CDC et de Muri (Yamanaka et al, 1986; Uchida et al, 1991). Tel qu'attendu, le CA est l'AB principal chez ces groupes-ci, également, il

y avait une diminution significative du pourcentage de Muri. Par contre, il n'y avait pas de changement dans le pourcentage de CDC. Plusieurs études démontrent l'augmentation des taux du DOC biliaire chez les sujets ayant des calculs biliaires de CH (Marcus et Heaton, 1988; Hussaini *et al*, 1995). Cette augmentation favorise une cristallisation rapide du CH et ainsi la formation des calculs biliaires de CH (Donovan, 1997). En effet, le DOC, hautement hydrophobe, a déjà été associé avec la lithiase cholestéroliques humaine (Berr *et al*, 1994). Dans notre étude, nous avons observé une augmentation significative du taux de DOC biliaire chez les souris soumises à la diète LG ou LG enrichie de PC par rapport à celles soumises à la diète témoin. Cependant, la supplémentation de la diète LG en PC ne semblait pas affecter le taux du DOC par rapport à la diète LG. Par contre, nous avons observé la présence d'une corrélation positive entre le pourcentage de DOC et CH biliaire présent et entre le pourcentage de DOC et CSI, uniquement chez les souris soumises à la diète LG pour 4 semaines. Plus le DOC est élevé, plus le CSI est élevé plus grande est la probabilité de former des calculs biliaires. L'équipe de Van Berge Henegouwen (1987) a d'ailleurs observé un effet du DOC sur la formation des calculs biliaires de CH chez l'humain.

Alexander et Portman (1987), ont examiné le profil de conjugaison des AB chez les souris C57BL/6. Au moins 93% des AB étaient conjugués avec la taurine (majoritairement TCA) avant de consommer la diète LG tandis que les conjugués avec la glycine n'étaient pas détectable. Après que les souris aient consommé la diète LG, une quantité significative d'AB a été conjuguée avec la glycine (jusqu'à 7% après 8 semaines de traitement). Nos résultats démontrent que la diète LG + PC n'a pas affecté la conjugaison des AB. Toutes les souris des groupes LG ou LG + PC, avaient le même

profil de conjugaison (94% des AB étaient conjugués à la taurine et 4 à 6 % à la glycine).

Konikoff et *al* (1997), ont démontré que l'APF stabiliserait les vésicules sursaturées en CH qui interféreraient avec le processus de précipitation de CH. Nos résultats concernant l'APF, montrent que l'augmentation significative du taux d'APF hépatique, présente uniquement chez les souris nourries avec la diète LG + 2% PC par rapport à la diète LG, suggère que son rôle est plus marqué lorsque le pourcentage de la supplémentation en PC est à 2%. Quand la supplémentation en PC est augmenté à 6%, l'APF hépatique ne semble pas intervenir dans le processus de prévention de la formation des calculs biliaires de CH. Par contre, les résultats obtenues dans la bile vésiculaire ne semblent pas suivre celles de la bile hépatique. Ceci pourrait être dû à une variation dans le mécanisme d'absorption vésiculaire qui n'est pas encore tout à fait élucidé.

Bien que l'hypersécrétion de la mucine est un précurseur dans la formation de calculs biliaires, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la saturation de la bile en CH qui est le pré-requis essentiel dans le processus de la lithiase cholestérolique.

Cette étude comporte certaines limites. Elle ne permet pas de comparer statistiquement les effets de 2% vs 6% PC puisque que ces expériences n'ont pas été effectuées au même moment. De plus, il faut considérer la variation inter-groupes. Dans l'avenir, il serait intéressant de comparer l'effet des diètes LG, LG + 2% et 6% PC après 4 et 8 semaines de traitement dans la même experimentation.

En conclusion, la supplémentation alimentaire en PC peut dépendamment de la dose et de la durée de traitement, diminuer ou prévenir la formation des calculs biliaires de CH chez les souris, génétiquement susceptibles à la lithiase cholestérolique, soumises à une diète LG. Ceci se fait par la réduction du %CSI hépatique et par l'augmentation significative de la concentration de la protéine anti-nucléante APF lorsque la supplémentation est à 2% en PC ou par l'augmentation du flux biliaire et la sécrétion des AB et PL nécessaires à la solubilisation de l'excès de CH et la réduction significative du %CSI hépatique, lorsque la supplémentation est augmentée à 6% en PC. De plus, l'ensemble de nos résultats confirme le fait que la sursaturation de la bile en CH est le facteur majeur dans la formation des calculs biliaires de CH.

6. Bibliographie.

- Afdhal N.H., Gong D., Niu N., Turner B.S., Lamont J.T. et Offner G.D.** (1993). Cholesterol cholelithiasis in the prairie dog: role of mucin and non-mucin glycoproteins. *Hepatology* 17: 693-700.
- Afdhal N.H., Ostrow J.D., Koehler R.K., Niu N., Groen A.K., Veis A., Nunes D.P. et Offner G.D.** (1995). Interaction of bovine gallbladder mucin and calcium-binding protein: effects on calcium phosphate precipitation. *Gastroenterology* 109: 1661-1672.
- Ahlberg J., Angelin B. et Einarsson K.** (1981). Hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and biliary lipid composition in man: relation to cholesterol gallstone disease and effects of cholic acid and chenodeoxycholic acid treatment. *J. Lipid Res.* 22: 410-422.
- Alexander M. et Portman O.W.** (1987). Different susceptibilities to the formation of cholesterol gallstones in mice. *Hepatology*. 7: 2: 257-265.
- Angelin B., Backman L., Einarsson K., Eriksson L. et Ewerth S.** (1982). Hepatic cholesterol metabolism in obesity: Activity of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Lipid Res.* 23: 5: 770-773.
- Angelin B., Ewerth S. et Einarsson K.** (1983). Ursodeoxycholic acid treatment in cholesterol gallstone disease: effects on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity, biliary lipid composition and plasma lipid levels. *J. Lipid Res.* 24: 461-468.
- Balisteri W.F., Heubi J.E. et Suchy F.J.** (1983). Immaturity of the enterohepatic circulation in early life: Factors predisposing to physiologic maldigestion and cholestasis. *J. Pediatr. Gastroent. Nutr.* 2: 346-354.
- Bartlett. G.R.** (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234: 466-468.
- Bateson M.C., Bouchier I.A.D., Trash D.B., Maudgal D.P. et Northfield T.C.** (1981). Calcification of radiolucent gallstones during treatment with ursodeoxycholic acid. *Br. Med. J.* 283: 645-646.
- Beher W.T., Filus A.M., Rao B. et Beher M.E.** (1969). A comparative study of bile acid metabolism in the rat, mouse, hamster and gerbil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130: 4: 1067-1074.
- Benedetti A., Alvaro D., Bassotti C., Gigliozzi A., Ferretti G., La Rosa T., DiSario A., Baiocchi L. et Jezequel A.M.** (1997). Cytotoxicity of bile salts against biliary epithelium: A study in isolated bile ductile fragments and isolated perfused rat liver. *Hepatology* 26: 9-21.
- Bennion L.J. et Grundy S.M.** (1975). Effects of obesity and caloric intake on biliary lipid metabolism in man. *J. Clin. Invest.* 56: 996-1011.

Bergman F., Juul A.H. et Van der Linden W. (1970). Development and regression of morphological and biochemical changes in hamsters and mice fed a cholesterol cholic containing diet. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 78: 179-191.

Berr F., Pratschke E., Fisher S. et Paumgartner G. (1992). Disorders of bile acid metabolism in cholesterol gallstone disease. *J. Clin. Invest.* 90: 859-868.

Berr F., Mayer M., Sackmann M.F., Sauerbruch T., Holl J. et Paumgartner G. (1994). Pathogenic factors in early recurrence of cholesterol gallstones. *Gastroenterology* 106: 215-224.

Bevans M. et Mosbach E.H. (1956). Biological studies on dihydrocholesterol. Production of biliary concretions and inflammatory lesions of the biliary tract in rabbits. *A.M.A. Arch. Path.* 62: 112-117.

Bligh. E.G. et Dyer.W.T. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37: 911-917.

Borgman R.G. (1965). Gallstone formation in rabbits as affected by dietary fat and protein. *Am. J. Vet. Res.* 26: 1167-1171.

Botham K.M. et Bravo E. (1995). The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models. *Prog. Lipid Res.* 34: 71-97.

Bremer J. et Greenberg D.M. (1961). Methyl transferring enzyme system of microsomes in the biosynthesis of lecithin (phosphatidylcholine). *Biochem. Biophys. Acta* 46: 205-216.

Brenneman D.E., Connor W.E., Forker E.L. et Den Besten L. (1972). The formation of abnormal bile and cholesterol gallstones from dietary cholesterol in prairie dog. *J. Clin. Invest.* 51: 1495-1952.

Carey M.C. et Small D.M. (1978a). The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *J. Clin. Invest.* 61: 4: 998-1026.

Carey M.C. (1978b). Critical tables for calculating the cholesterol saturation of native bile. *J. Lipid Res.* 19: 945-955.

Carey M.C., Montet J.C., Philips M.C., Armstrong J. et Mazer N.A. (1981). Thermodynamic and molecular basis for dissimilar cholesterol solubilizing capacities by micellar solutions of bile salts: cases of sodium chenodeoxycholate, sodium ursodeoxycholate and their glycine and taurine conjugates. *Biochemistry* 20: 3637-3648.

Carey M.C. et O'Donovan M.A. (1984). Gallstone disease : Current concepts on the epidemiology, pathogenesis, and management. Dans: **Peterdorf R.G., Adams R.D., Braunwald E. et al. (eds)** : *Harrison's Principles Of Internal Medicine, Update V.* New York, McGraw-Hill, 573-616.

Carey M.C. et Cohen D.E. (1987). Biliary transport of cholesterol in vesicles, micelles and liquid crystals. Dans : **Paumgartner G., Stiehl A. et Gerok W. (eds)**. Bile acids and the liver. Lancaster, MTP press.

Carey M.C. et LaMont J. T. (1992). Cholesterol gallstone formation. 1. Physical-chemistry of bile and biliary lipid secretion. *Prog. Liver Dis.* 10: 139-163.

Carey M.C. (1993). Pathogenesis of gallstones. *Recenti. Prog. Med.* 83: 379-391.

Carey M.C. et Duane W.C. (1994). Enterohepatic circulation. dans: **Arias I.M., Boyer J.L., Fausto N., Jackoby W.B., Schachter D.A. et Shafritz D.A. (eds)**. The liver : Biology and Pathology. Third Edition. Raven Press Ltd. New York. 719-767.

Carey M.C. (1996). Formation and growth of cholesterol gallstones: the new synthesis. Dans: **Fromm H. et Leuschner U. (eds)**. Bile Acids, Cholestasis-Gallstones. Kluwer, Dordrecht. 147-175.

Cetta F.M. (1986). Bile infection documented as initial event in the pathogenesis of brown pigment biliary stones. *Hepatology* 6: 482-489.

Chanussot F., Lafont H., Hauton J., Tuchweber B. et Yousef I. (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.

Chijiwa K. (1990). The effects of ethinylestradiol, a glucose diet and streptozotocin-induced diabetes mellitus on gallstone formation and biliary lipid composition in the hamster. *Jpn. J. Surg.* 20: 567- 576.

Childs S., Yeh R.L., Hui D. et Ling V. (1995a). Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer Res.* 58: 18: 4160-4167.

Childs S., Yeh R.L., Georges E. et Ling V. (1995b). Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer Res.* 55: 2029-2034.

Cohen B.I., Mosbach E.H., Ayyad N., Yoshii M. et McSherry C.K. (1991). Aspirin does not prevent cholesterol cholelithiasis in two established animal models. *Gastroenterology* 101: 1109-1116.

Cohen D.E., Kaler E.W. et Carey M.C. (1993). Cholesterol carriers in human bile: are "lamella" involved?. *Hepatology* 18: 1522-1531.

Cooper A.D. Guest editor. (1999). Bile salts, metabolic, pathologic and therapeutic consideration : Physical and metabolic factors in gallstone pathogenesis. *Gastroent. Clinics of North Am.* 28: 1: 75-91.

Corradini S.G., Yamashita G., Nuutinen H., Chernosky A., Williams C., Hays L., Shiffman M.L., Walsh R.M., Svanvik J., Della Guardia P., Capocaccia L. et Holzbach R.T. (1998a). Human gallbladder mucosal function. Effects on intraluminal fluid and lipid composition in health and disease. *Dig. Dis. Sci.* 43: 335-343.

Corradini S.G., Ripani C., Della Guardia P., Giovannelli L., Elisei W., Cantafora A., Pisanelli M.C., Tebala G.D., Nuzzo G., Corsi A., Attili A.F., Capocaccia L. et Ziparo V. (1998b). The human gallbladder increases cholesterol solubility in bile by differential lipid absorption: A study using a new in vitro model of isolated intra-arterially perfused gallbladder. *Hepatology* 28: 314-322.

Corradini S.G., Elisei W., Giovannelli L., Ripani C., Guardia P.D., Corsi A., Cantafora A., Capocaccia L., Ziparo V., Stipa V., Chirletti P., Caronna R., Lomanto D. et Attili A.F. (2000). Impaired human gallbladder lipid absorption in cholesterol gallstone disease and its effect on cholesterol solubility in bile. *Gastroenterology* 118 : 912-920.

Cox M.R., Wilson T.G., Luck A.J., Jeans P.L., Padbury R.T. et Toouli J. (1993). Laparoscopic cholecystectomy for acute inflammation of the gallbladder. *Ann. Surg.* 218: 630-634.

Dam H. et Christensen F. (1952). Alimentary production of gallstones in hamsters. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 30: 236-242.

Dam H. et Christensen F. (1961a). Alimentary production of gallstones in hamsters. 8. Influence of dietary fat. *Z. Ernährungswiss.* 2: 36-41.

Dam H. et Christensen F. (1961b). Alimentary production of gallstones in hamsters. 9. Influence of different carbohydrate sources on gallstone formation, diarrhea and growth. *Z. Ernährungswiss.* 2: 91-102.

Dam H., Prange I. et Sondergaard E. (1974). Alimentary production of gallstones in hamsters. 27. Influence of supplementation of the gallstone producing diet with squalene, cholesterol, certain other sterols, fish oil fatty acid ethyl esters and modification of the basal diet on gallstone production and levels of cholesterol in serum and liver. *Z. Ernährungswiss.* 13: 208-236.

Danzinger R.G., Hofmann A.F., Shoenfield L.J. et Thistle J.L. (1972). Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid. *N. Engl. J. Med.* 286: 1: 1-8.

Danzinger R.G., Hofmann A.F., Thistle J.L. et Schoenfield L.J. (1973). Effect of oral chenodeoxycholic acid on bile acid kinetics and biliary lipid composition in women with cholelithiasis. *J. Clin. Invest.* 52: 2809-2821.

Davison J.S., Fridhandler T.M., Kelly J. et Shaffer E.A. (1982). Reduced gallbladder contractility associated with increased bile lithogenicity in the ground squirrel. *J. Physiol.* 329: 41.

Debry R.W. et Seldin M.F. (1996). Human/mouse homology relationships. *Genomics* 33: 337-351.

Domingo N., Botta D., Martgne-Cros M., Lechène de la Porte P., Pak Leung P., Hauton J. et Lafont H. (1990). Evidence for the synthesis and secretion of APF, a bile lipid associated protein by isolated rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1044: 243-248.

Domingo N., Grosclaude J., Bekaert E.D., Mège D., Chapman M.J., Shimizu S., Ayrault-Jarrier M., Ostrow J.D. et Lafont H. (1992). Epitope mapping of the human biliary amphipathic, anionic polypeptide: similarity with a calcium-binding protein isolated from gallstones and bile, and immunologic cross-reactivity with apolipoprotein A-1. *J.Lipid Res.* 33: 1419-1430.

Domingo N., Lafont H., Halpern Z., Peled Y., Grosclaude J. et Gilat T. (1993). Anionic polypeptide fraction in bile of patients with and without gallstones. *Hepatology* 17: 778-780.

Domingo N., Debono E., Reynier M.O., Crotte C., Thorin B., Charbonnier M., Clerc T., Grillasca J., Chanussot F. et Lafont H. 1999. Effects of dexamethasone and linoleic acid on hepatic secretion of biliary lipids and anionic polypeptide factor: in vivo and in vitro studies. *Digestion* 60: 515-521.

Donovan J.M., Carey M.C. (1990). Separation and quantification of cholesterol "carriers" in bile. *Hepatology* 12: 94s-105s.

Donovan J.M. (1997). Pathogenesis of gallstones. *Gastroenterology and Hepatology: The comprehensive visual reference.* St Louis, Mosby. 7.1-7.22.

Donovan J.M. (1999). Physical and metabolic factors in gallstone pathogenesis. Dans: **Cooper A.D. Guest editor.** Bile salts, metabolic, pathologic and therapeutic consideration. *Gastroenterology Clinics of North Am.* 28: 1: 75-97.

Dowling R.H., Veysey M.J., Pereira S.P., Hussaini S. H., Thomas L. A., Wass J.A. et Murphy G.M. (1997). Role of intestinal transit in the pathogenesis of gallbladder stones. *Can. J. Gastroenterol* 11 :57-64.

Duane W.C. (1993). Formation of gallstones. Dans: **Kaplowitz N. (ed).** Liver and biliary diseases. 148-161.

Duane W.C. (1995). Abnormal bile acid absorption in familiar hypertriglyceridemia. *J.Lipid Res.* 36: 96-107.

Dumont M., Jacquemin E., D'Hont C., Descout C., Cresteil D., Haouzi D., Desrochers M., Stieger B., Hadchouel M. et Erlinger S. (1997). Expression of the liver Na⁺-independent organic anion transporting polypeptide (oatp-1) in rats with bile duct ligation. *J. Hepatol.* 27: 6: 1051-1060.

Einarsson K., Hellstrom K. et Kallner M. (1975). Gallbladder disease in hyperlipoproteinaemia. *Lancet* 1: 484-487.

Einarsson K. et Grundy S.M. (1980). Effects of feeding cholic acid and chenodeoxycholic acid on cholesterol absorption and hepatic secretion of biliary lipids. *J. Lipid Res.* 21: 1: 23-34.

Einarsson K., Nilsell K., Leijd B. et Angelin B. (1985). Influence of age on secretion of cholesterol and synthesis of bile acids by the liver. *N. Engl. J. Med.* 313: 277-282.

Erlinger S., Le Go A., Husson J.M. et Fevery J. (1984). Franco-Belgian cooperative study of ursodeoxycholic acid in the medical dissolution of gallstones: a double-blind, randomized, dose-response study, and comparison with chenodeoxycholic acid. *Hepatology* 4: 308-314.

Erlinger S. (1996). Do intracellular organelles have any role in transport of bile acids by hepatocytes? *J. Hepatol.* 24 Suppl. 1: 88-93.

Everhart J.E. (1993). Contributions of obesity and weight loss to gallstone disease. *Ann. Intern. Med.* 119: 1029-1035.

Everhart J.E., Khare M., Hill M. et Maurer K.R. (1999). Prevalence and ethnic differences in gallbladder disease in the united states. *Gastroenterology* 117: 632-639.

Everson G.T., Mckinley C. et Kern F Jr. (1991). Mechanisms of gallstone formation in women. Effects of exogenous estrogen (Premarin) and dietary cholesterol on hepatic lipids metabolism. *J. Clin. Invest.* 87: 237-246.

Everson G.T. (1992). Gastrointestinal motility in pregnancy. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 21: 751-756.

Everson G.T. (1993). Pregnancy and gallstones. *Hepatology* 17: 156-160.

Flynn G.L., Shah Y., Prakongpan S., Kwan K.H., Higuchi W.I. et Hofmann A.F. (1979). Cholesterol solubility in organic solvents. *J. Pharm. Sci.* 68: 9: 1090-1097.

Folch.J. et Lees. M. (1957). A simple method for the isolation and the purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509.

Fridhandler T.M., Davison J.S. et Shaffer E.A. (1983). Defective gallbladder contractility in the ground squirrel and the prairie dog during the stages of cholesterol gallstone formation. *Gastroenterology* 85: 830-836.

Fromm H., Roat J.W., Gonzalez V., Sarva R.P. et Farivar S. (1983). Comparative efficacy and side effects of ursodeoxycholic and chenodeoxycholic acids in dissolving gallstones. A double-blind controlled study. *Gastroenterology* 85: 1257-1264.

Fromm H. (1984). Gallstone dissolution and the cholesterol--bile acid--lipoprotein axis. Propitious effects of ursodeoxycholic acid. *Gastroenterology* 87: 229-233.

Fromm H. (1986). Gallstones dissolution therapy. Current status and future prospects. *Gastroenterology* 91: 6: 1560-1567.

Fromm H. et Malavolti M. (1992a). Bile acid dissolution therapy of gallbladder stones. Dans: **Sakmann M. (ed).** *Diagnosis and management of biliary stones.* London, Bailliere's Clinical Gastroenterology. International Practice and Research. Bailliere Tindall, 689-697.

Fromm H. et Malavolti M. (1992b). Gallstone recurrence after medical therapy. *Viewpoints on Digestive Diseases* 24:1.

Fuchs M., Steimann G., Müller O., Schalla C., Bartsch P. et Stange E.F. (1998a). Hepatic overexpression of class B scavenger receptor (Sr-b1) during cholesterol gallstone formation in inbred mice. *Hepatology* 28: 502A.

Fuchs M., Lammert F., Wang D., Paigen B., Carey M.C. et Cohens D. (1998b). Sterol carrier protein 2 participates in hypersecretion of biliary cholesterol during gallstone formation in genetically gallstone-susceptible mice. *Biochem. J.* 336: 33-37.

Fujihara E., Kaneta S. et Oshima T. (1978). Strain difference in mouse cholelithiasis and the effect of taurine on the gallstone formation in C57BL/C mice. *Biochem. Med.* 19: 211-217.

Gollish S.H., Burnstein M.J., Ilson R.G., Petrunka C.N. et Strsberg S.M. (1983). Nucleation of cholesterol monohydrate crystals from hepatic and gallbladder bile of patients with cholesterol gallstones. *Gut* 24: 836-844.

Groen A.K., Noordam C., Drapers J.A.G., Egbers P., Jansen P.L.M. et Tytgat N.J. (1990). Isolation of a potent cholesterol nucleation promoting activity from human gallbladder bile. *Hepatology* 11: 525-533.

Halloran G.L., Schwartz C.C., Vlahcevic Z.R., Nisman R.M. et Swell L. 1978. Evidence for high-density lipoprotein-free cholesterol as the primary precursor for bile-acid synthesis in man. *Surgery* 84: 1: 1-7.

Halpern Z., Dudley M.A., Kibe A., Lynn M.P., Breuer A.C. et Holzbach R.T. (1986). Rapid vesicle formation and aggregation in abnormal human biles. A time-lapse video-enhanced contrast microscopy study. *Gastroenterology* 90: 875-885.

Halpern Z., Moshkowitz M., Laufer H., Peled Y. et Gilat T. (1993). Effect of phospholipids and their molecular species on cholesterol solubility and nucleation in human and model biles. *Gut* 34: 110-115.

Hardison W.G. et Grundy S.M. (1984). Effect of ursodeoxycholate and its taurine conjugate on bile acid synthesis and cholesterol absorption. *Gastroenterology* 87: 1: 130-135.

Haslewood G.A.D. (1978). Distribution of bile salts in the animal kingdom. Dans: **Haslewood G.A.D. (ed)**. The biological importance of bile salts. Elsevier North Holland, Amsterdam. 79-118.

Hauton J.C., Vigne J.L., Nalbone G., Lafont H., Lairon D et Augeire-Charbonnier M. (1982). Implications of a dynamic theory on the behavior of the bile salt-lecithin association in water. Dans : **Boulanger P. et Roche J. (eds)**. Exposés annuels de biochimie médicale 35 : 39-73.

Hay D.W. et Carey M.C. (1990). Pathophysiology and pathogenesis of cholesterol gallstone formation. *Semin. Liver Dis.* 10: 159-170.

Hays K.C., Khosla P., Kaiser A., Yeghiazarians V. et Pronczuk A. (1992a). Dietary fat and cholesterol modulate the plasma lipoprotein distribution and production of pigment or cholesterol gallstones in hamsters. *J. Nutr.* 122: 2: 374-384.

Hays K.C., Livingston A. et Trautwein E.A. (1992b). Dietary impact on biliary lipids and gallstones. *Annu. Rev. Nutr.* 12: 299-326

Hess W. et Maki T. (1992). Cholelithiase dans: **Basoli A., Blumgart L.H., Cirenei A., Chirletti P., Dagradi A., Hess W. et Maki T.** Pathologie et clinique. Partie II dans: **Hess W., Cirenei A., Rohner A. et Akovbiantz A. (eds)** Maladies des voies biliaires et du pancreas. Tome I. Piccin Nuova Libreria S.P.A., Padoue (Italie). 113-196.

Heuman R., Norrby S., Sjö Dahl R., Tiselius H.G. et Tagesson C. (1980). Altered gallbladder bile composition in gallstone disease. Relation to gallbladder wall permeability. *Scand. J. Gastroenterol.* 15 :581-586.

Heuman D.M., Vlahcevic Z.R., Bailey M.L. et Hylemon P.B. (1988). Regulation of bile acid synthesis. II. Effect of bile acid feeding on enzymes regulating hepatic cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *Hepatology* 8: 4: 892-897.

Heuman D.M., Moore E.W. et Vlahcevic Z.R. (1996). Biliary tract disease: Pathogenesis and dissolution of gallstones. Dans: **Zakim D. et Boyer T.D. (eds)**. *Hepatology : a textbook of liver disease.* 3^d edition, volume II, 1833-1876.

Heuman D.M., Wassef W.Y. et Vlahcevic Z.R. (1999). Gallstones. Dans: **Shiff E.R., Sorrell M.F. et Masldrey W.C. (eds)**. *Shiff's diseases of the liver.* 8th edition . Lippincott-Raven publishers, Philadelphia. 631-647.

Hofmann A.F., Schmack B., Thistle J.L. et Babayan V.K. (1981). Clinical experience with monooctanoïn for dissolution of bile duct stones:" an uncontrolled multicenter trial. *Dig. Dis. Sci.* 26: 10: 954-955.

Hofmann A.F. (1994). Bile acids dans : **Arias I.M., Boyer J.L., Fausto N., Jackoby W.B., Schachter D.A. et Shafritz D.A. (eds)** *The liver : Biology and Pathology.* Raven Press Ltd. New York. 677-718.

Holan K.R., Holzbach R.T., Hermann R.E., Cooperman A.M. et Claffey W.J. (1979). Nucleation time : a key factor in the pathogenesis of cholesterol gallstone disease. *Gastroenterology* 77: 611-617.

Holzbach R.T., Kibe A., Thiel E., Howell J.H., Marsh M. et Hermann R.E. (1984). Biliary proteins:unique inhibitors of cholesterol crystal nucleation in human gallbladder bile. *J. Clin. Invest.* 73: 35-45.

Holzbach R.T. et al. (1987). Biliary vesicles aggregation and cholesterol crystal nucleation: evidence for a coupled relationship. Dans: : **Paumgartner G., Stiehl A. et Gerok W. (eds)**. *Bile acids and the liver.* Lancaster, MTP press.

Hussaini S.H., Pereira S.P., Murphy G.M. et Dowling R.H. (1995). Deoxycholic acid influences cholesterol solubilization and microcrystal nucleation time in gallbladder bile. *Hepatology* 22: 1735-1744.

Igimi H. et Carey M.C. (1981). Cholesterol gallstone dissolution in bile : dissolution kinetics of crystalline (anhydrate and monohydrate) cholesterol with chenodeoxycholate, ursodeoxycholate and their glycine and taurine conjugates. *J. Lipid Res.* 22: 2: 254-270.

Ito T., Kawata S., Imai Y., Kakimoto H., Trzaskos J.M. et Matsuzawa Y. (1996). Hepatic cholesterol metabolism in patients with cholesterol gallstones : Enhanced intracellular transport of cholesterol. *Gastroenterology* 110: 1619-1627.

Jazrawi R.P., Pigozzi M.G., Galatola G., Lanzini A. et Northfield T.C. (1992). Optimum bile acid treatment for rapid gall stone dissolution. *Gut* 33: 381-386.

Johnston D.E. et Kaplan M.M. (1992). Pathogenesis and treatment of gallstones. *N. Engl. J. Med.* 328: 412-421.

Jüngst D., Lang T., Huber P., Lange V. et Paumgartner G. (1993). Effect of phospholipids and bile acids on cholesterol nucleation time and vesicular/micellar cholesterol in gallbladder bile of patients with cholesterol stones. *J. Lipid Res.* 34:1457-1464.

Kennedy E.P et Weiss S.B. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. *J. Biol. Chem.* 222: 193-215.

Kesaniemi Y.A., Kosekenuvo M., Vuoristo M. et Miettinen T.A. (1989). Biliary lipid composition in monozygotic and dizygotic pairs of twins. *Gut* 30: 12: 1750-1756.

Khanuja B., Cheah Y-C., Hunt M., Nishina P.M., Wang D.Q.-H., Chen H.W., Billheimer J.T., Carey M.C. et Paigen B. (1995). *Lith1*, -a major gene affecting cholesterol gallstone formation among inbred strains of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 7729-7733.

Kibe A., Holzbach R.T., LaRusso N.F. et Mao S.J. (1984). Inhibition of cholesterol crystal formation by apolipoproteins in supersaturated model bile. *Science* 225: 514-516.

Konig J., Nies A.T., Cui Y., Leier I. et Keppler D. (1999). Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochem. Biophys. Acta* 1461: 377-394.

Konikoff F.M., Chung D.S., Donovan J.M., Small D.M. et Carey M.C. (1992). Filamentous, helical and tubular microstructures during cholesterol crystallization from bile. Evidence that biliary cholesterol does not nucleate classic monohydrate plates. *J. Clin. Invest.* 90: 1156-1161.

Konikoff F.M., Cohen D.E. et Carey M.C. (1994). Phospholipid molecular species influence crystals habits and transition sequences of metastable intermediates during cholesterol crystallization from bile-rich model bile. *J. Lipid Res.* 35: 60-70.

Konikoff F.M., Lechene de la Porte P., Laufer H., Domingo N., Lafont H. et Gilat T. (1997). Calcium and the anionic polypeptide fraction (APF) have opposing effects on cholesterol crystallization in model bile. *J. Hepatol.* 27: 707-715.

Lammert F., Beier D.R., Wang D.Q-H., Carey M.C., Paigen B. et Cohen D.E. (1997). Genetic mapping of hepatocanalicular transporters establishes sister-P-glycoprotein (*Spgp*) as a candidate for the major gallstone gene (*Lith1*). *Hepatology* 26: 358A.

Lammert F., Wang D.Q., Paigen B. et Carey M.C. (1999). Phenotypic characterization of *Lith* genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: integrated activities of hepatic lipid regulatory enzymes. *J. Lipid Res.* 40: 11: 2080-2090.

LaMont J.T., Turner B.S., Dibenedetto D., Handin R. et Shafer A.I. (1983). Arachidonic acid stimulates mucin secretion in prairie dog gallbladder. *Am. J. Physiol.* 245: G92-G98.

LaMont J.T., Smith B.F. et Morre J.R.L. (1984). Role of gallbladder mucin in pathophysiology of gallstones. *Gastroenterology* 4: 51s-56s.

LaMont J.T. et Carey M.C. (1992). Cholesterol gallstone formation. 2. *Prog. Liver Dis.* 10: 165-191.

LaRusso N.F., Hofmann N.E., Hofmann A.F. Northfield T.C. et Thistle J.L. (1975). Effect of primary bile acid ingestion on bile acid metabolism and biliary lipid secretion in gallstone patients. *Gastroenterology* 69: 6: 1301-1314.

LaRusso N.F., Szczepanik P.A. et Hofmann A.F. (1977). Effect of deoxycholic acid ingestion on bile acid metabolism and biliary lipid secretion in normal subjects. *Gastroenterology* 72: 1:132-140

Leblanc M.J., Gavino V., Pérea A., Yousef I.M., Lévy E. et Tuchweber B. (1998). The role of dietary choline in the beneficial effects of lecithin on the secretion of biliary lipids in rats. *Biochem. Biophys. Acta* 1393: 223-234.

Lechéne de la porte P., Domingo N., Van Wijland M., Groen A.K., Ostrow J.D. et Lafont H. (1996). Distinct immuno-localization of mucin and other biliary proteins in human cholesterol gallstones. *J. Hepatol.* 25: 339-348.

Lee S.P., Park H.Z., Madani H. et Kaler E.W. (1987). Partial characterization of a nonmicellar system of cholesterol solubilization in bile. *Am. J. Physiol.* 252: G374-G383.

- Lee S.P., Lamont J.T. et Carey M.C.** (1981). Role of gallbladder mucus hypersecretion in the evolution of cholesterol gallstones : studies in the prairie dog. *J. Clin. Invest.* 67: 1712-1723.
- Lee S.P. et Nicholls J.F.** (1986). Nature and composition of biliary sludge. *Gastroenterology* 90: 677-686.
- Lee S.P., Maher K. et Nicholls J.F.** (1988). Origin and fate of biliary sludge. *Gastroenterology* 94: 170-176.
- Lefkof I.R., Frenkiel P.G., Lee D.W., Cohen H., Bonorris G.G., Gilmore C.J., Hamlin J.A., Komaiko M., Resser K., Marks J.W., et al.** (1986). Effect of diet on dissolution of gallstones by ursodeoxycholic acid, including a comparison between ultrasonography and cholecystography. *Mt. Sinai. J. Med.* 53: 4: 241-249.
- Leuschner U., Hellstern A., Schmidt K., Fischer H., Guldutuna S., Hubner K. et Leuschner M.** (1991). Gallstone dissolution with methyl tert-butyl ether in 120 patients--efficacy and safety. *Dig. Dis. Sci.* 36: 2: 193-199.
- Levenson D.E. et Fromm H.** (1996). Biliary tract disease: Medical management of gallbladder disease. Dans: **Zakim D. et Boyer T.D. (eds)**. *Hepatology: a textbook of liver disease*. 3^d edition, volume II, 1877-1897.
- Lillemo K.D., Kidder G.W., Harmon J.W., Gadacz T.R., Johnson L.F., Bunte R.M. et Hofmann A.F.** (1983). Tauroursodeoxycholic acid is less damaging than taurochenodeoxycholic acid to the gastric and esophageal mucosa. *Dig. Dis. Sci.* 28: 4: 359-364.
- Lowenfels A.B.** (1988). Gallstones and glaciers: the stone that came in from the cold. *Lancet* 1: 1385-1386.
- Luk A.S., Kaler E.W. et Lee S.P.** (1998). Protein lipid interaction in bile : effects of biliary proteins on the stability of cholesterol-lecithin vesicles. *Biochem. Biophys. Acta* 1390: 282-292.
- Macpherson B.R., Pemsingh R.S. et Scott G.W.** (1987). Experimental cholelithiasis in the ground squirrel. *Lab. Invest.* 56: 138-145.
- Makino I., Shginozaky K., Yoshino K. et Nakagawa S.** (1975). Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid. *Jpn. J. Gastroenterol.* 72: 6: 690-702.
- Malet P.F., Takabayashi A., Trotman B.W., Soloway R.D. et Weston N.E.** (1984). Black and brown pigment gallstones differ in microstructure and microcomposition. *Hepatology* 4: 227-234.
- Marcus S.N. et Heaton K.W.** (1988). Deoxycholic acid and the pathogenesis of gallstones. *Gut* 29: 522-533.

- Marks J.W. et Schoenfield L.J.** (1993). Formation and treatment of gallstones. Dans: **Shiff L. et Schiff E.R. (eds)**. Diseases of the liver. Seventh Edition, J.B. Lippincott Company, Philadelphia 427-447.
- Martigne M., Domingo N., Chanussot F., Nalbhone G., Lafont H. et Hauton J.** (1988). Effect of bile anionic polypeptide fraction on the fate of cholesterol carried by liposomes in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 187: 2: 229-234.
- Martins I.J., Lenzo N.P. et Redgrave T.G.** (1989). Phosphatidylcholine metabolism after transfer from lipid emulsions injected intravenously in rats. Implications for high-density lipoprotein metabolism. *Biochem. Biophys. Acta* 1005: 217-224.
- Marks J.W., Bonorris G.G. et Schoenfield L.J.** (1991). Roles of deoxycholate and arachidonate in the pathogenesis of cholesterol gallstones in obese patients during rapid loss of weight. *Dig. Dis. Sci.* 36: 957-960.
- Marks J.W. et Schoenfield L.J.** (1993). Formation and treatment of gallstones. Dans: **Schiff L. et Schiff E.R.** Diseases of the liver, seventh edition. 427-447.
- Mazer N.A., Benedek G.B. et Carey M.C.** (1980). Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems: Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. *Biochemistry* 19: 601-615.
- Meier P. J., Eckhardt U., Schroeder A., Hagenbuch B. et Stieger B.** (1997). Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. *Hepatology* 26: 1667-1677.
- Montet J.C.** (1991). Formation des calculs cholestéroliques. Données actuelles. Dans : **Erlinger S.** La lithiase biliaire. Progrès en hépato-gastroentérologie. 17-31.
- Moore E.W., Hofmann A. F.** (1993). Physiology of the biliary tract. Slides/Text. AGA undergraduate teaching project. Baltimore, Milner-Fenwick.
- Nervi F., Cavarrubias C., Bravo P., Velasco N., Ulloa N., Cruz F., Fava M., Severin C. et Del Pozo R.** (1989). Influence of legume intake on biliary lipids and cholesterol saturation in young Chilean men. *Gastroenterology* 96: 825-830.
- Nilsell K., Angelin B., Leijd B. et Einarsson K.** (1983). Comparative effects of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on bile acid Kinetics and biliary lipid secretion in man. Evidence for different modes of action on bile acid synthesis. *Gastroenterology* 85: 1248-1256.
- Nishina, P.M., Vertuyft, J. et Paigen, B.** (1990). Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J. Lipid Res.* 31: 859-869.
- Nishioka T., Tazuma S., Yamashita G. et Kajiyama G.** (1999). Partial replacement of bile salts causes marked changes of cholesterol crystallization in supersaturated model bile systems. *Biochemical Society*: 445-451.

Northfield T.C. et Hofmann A.F. (1975). Biliary lipid output during three meals and an overnight fast. I. Relationship to bile acid pool size and cholesterol saturation of bile in gallstone and control subjects. *Gut* 16: 1-11.

O'Leary D.P., Lamorte W.W., Scott T.E., Booker M.L. et Stevenson J. (1991). Inhibition of prostaglandin synthesis fails to prevent gallbladder mucin hypersecretion in the cholesterol-fed prairie dog. *Gastroenterology* 101: 812-820.

Ortiz D.F., Li S., Iyer R., Zhang X., Novikoff P. et Arias I.M. (1999). MRP3, a new ATP-binding cassette protein localized to the canalicular domain of the hepatocyte. *Am. J. Physiol.* 276: G1493-G1500.

Ostrow J.D. (1992). APF/CBP, an anionic polypeptide in bile and gallstones that regulate calcium salt and cholesterol precipitation from bile. *Hepatology* 16: 1493-1496.

Oude Elferink R.P.J., Ottenhoff R., van Wijland M., Smit J.J., Schinkel A.H. et Groen A.K. (1995). Regulation of biliary lipid secretion by mdr2 P-glycoprotein in the mouse. *J. Clin. Invest.* 95: 1: 31-38.

Oude Elferink R.P.J., Ottenhoff R., van Wijland M., Frijters C.M., van Nieuwkerk C. et Groen A.K. (1996). Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol secretion in mice with reduced expression of mdr2 P-glycoprotein. *J. Lipid Res.* 37: 1065-1075.

Oude Elferink R.P.J. et Groen A.K. (1999). The mechanism of biliary lipid secretion and its defects. Dans: **Cooper A.D. Guest editor.** Bile salts, metabolic, pathologic and therapeutic consideration. *Gastroenterology Clinics of North Am.* 28: 1: 59-74.

Paigen B. (1995). Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 458s-462s.

Paigen B. et Carey M.C. (1999). Gallstones. Dans: **King R.A., Rotter J.I. et Motulsky A.C. (eds).** Genetic basis of common diseases. 2nd ed. London: Oxford University Press. (in Press).

Palmer R.H. (1976). Toxic effects of lithocholate on the liver and biliary tree. Dans: **Taylor W. (ed).** The hepatobiliary system: fundamental and pathological mechanisms. New York, Plenum Press, 227-240.

Pattinson N.R. (1985). Solubilisation of cholesterol in human bile. *Fed. Europ. Biochem. Soc.* 181: 339-342.

Paul R., Ramesha C.S., Parthasarathy S. et Ganguly J. (1978). Effect of dietary lipids on the secretion of biliary lipids in rats. *Indian J. Biochem. Biophys.* 15: 401-406.

Paulusma C.C., Kool M., Bosma P.J., Scheffer G.L., ter Borg F., Scheper R.J., Tytgat G.N., Borst P., Baas F. et Oude Elferink R.P. (1997). A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 25: 1539-1542.

Perwaiz S., Tuchweber B., Mignault D., Gilat T. et Yousef I. M. 2001. Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 42: 114-119.

Podda M., Zuin M., Battezzati P.M., Ghezzi C., de Fazio C. et Dioguardi M.L. (1989). Efficacy and safety of a combination of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid for gallstone dissolution: a comparison with ursodeoxycholic acid alone. *Gastroenterology* 96: 222-229.

Polichetti E., Diaconescu N., De La Porte P.L., Malli L., Portugal H., Pauli A.M., Lafont H., Tuchweber B., Yousef I. et Chanussot F. (1996). Cholesterol-lowering effect of soyabean lecithin in normolipidaemic rats by stimulation of biliary lipid secretion. *Br. J. Nutr.* 75: 3: 471-478.

Portal I., Clerc T., Sbarra V., Portugal A-N.P., Lafont H., Tuchweber B., Yousef I et Chanussot F. (1993). Importance of high-density lipoprotein-phosphatidylcholine in secretion of phospholipid and cholesterol in bile. *The Am. Phys. Soc.* 264: G1052-G1056.

Reihner E. et Ståhlberg D. (1996). Lithogenic diet and gallstone formation in mice: integrated response of activities of regulatory enzymes in hepatic cholesterol metabolism. *British J. of Nutrition* 76: 765-772.

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

Rioux F., Perea A., Yousef I.M., Lévy É., Malli L., Carrillo M.C. et Tuchweber B. (1994). Short-term feeding of a diet enriched in phospholipids increases bile formation and the bile acid transport maximum in rats. *Biochem. Biophys. Acta* 1214: 193-202.

Robins S.J., Fasulo J.M., Collins M. et Patton G.M. (1991). Utilization of different fatty acids for hepatic and biliary phosphatidylcholine formation and the effect of changes in phosphatidylcholine molecular species on biliary lipid secretion, *J. Lipid Res.* 32 : 985-922.

Roda E., Bazzoli F., Labate A.M., Mazzella G., Roda A., Sama C., Festi D., Aldini R., Taroni F. et Barbara L. (1982). Ursodeoxycholic acid vs. chenodeoxycholic acid as cholesterol gallstone- dissolving agents: a comparative randomized study. *Hepatology* 2: 804-810.

Ronald P.J., Elferink O. et Groen A.K. (1999). The mechanism of biliary lipid secretion and its defects. Dans: **Cooper A.D. Guest editor.** Bile salts, metabolic, pathologic and therapeutic consideration. *Gastroent. Clinics of North Am.* 28:1: 59-74.

Roslyn J.J., Binns G.S., Hughes E.F.X., Saunders-Kirkwood K., Zinner M.J. et Cates J.A. (1993). Open cholecystectomy: a contemporary analysis of 42,474 patients. *Ann. Surg.* 218: 2: 129-137.

Sahlin S., Ahlberg J., Reihner E., Stahlberg D. et Einarsson K. (1992). Cholesterol metabolism in human gallbladder mucosa : Relationship to cholesterol gallstone disease and effects of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid treatment. *Hepatology* 16: 320-326.

Sackmann M., Pauletzki J., Aydemir U., Holl J., Sauerbruch T., Hasford J. et Paumgartner G. (1991). Efficacy and safety of ursodeoxycholic acid for dissolution of gallstone fragments: comparison with the combination of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid. *Hepatology* 14: 1136-1141.

Sarin S. K., Negi V.S., Dewan R., Sasan S. et Saraya A. (1995). High familial prevalence of gallstones in the first degree relatives of gallstone patients. *Hepatology* 22: 138-141.

Sedaghat A et Grundy S.M. (1980). Cholesterol crystals and the formation of cholesterol gallstones. *N. Engl. J. Med.* 302: 1274-1277.

Setchell., K.D.R. et Worthington J. (1982). A rapid method for the quantitative extraction of bile acids and their conjugates from serum using commercially available reverse-phase octadecylsilane bonded silica cartridge. *Clin. Chim. Acta.* 125: 135-144.

Sherlock S. et Dooley J. (1997). Gallstones and inflammatory gallbladder diseases. Dans : *Diseases of the liver and biliary system*, tenth edition. 593-619.

Small D.M. (1980). Cholesterol nucleation and growth in gallstone formation. *N. Engl. J. Med.* 302: 1305-1307.

Smit J.J., Schinkel A.H., Oude Elferink R.P.J., Groen A.K., Wagenaar E., Van Deemter L., Ottenhoff R., Van der Lugst N.M., Van Roon M.A., Van der Valk M.A., Offerhaus G.J.A., Berns A.J.M. et Borst P. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* p-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to a liver disease. *Cell* 75: 451-462.

Smith B.F. et Lamont J.T. (1984). Hydrophobic binding properties of bovine gallbladder mucin. *J. Biol. Chem.* 259: 12170-12177.

Smith B.F. et Lamont J.T. (1985a). Gallbladder mucin and gallstone formation. Dans: **Cohen S. et Soloway R.D. (eds).** *Contemporary issues in gastroenterology : gallstones.* New York, Churchill living-stone.

Smith B.F. et Lamont J.T. (1985b). Identification of gallbladder mucin-bilirubin complex in human cholesterol gallstone matrix : effects of reducing agents on in vitro dissolution of matrix and intact gallstones. *J. Clin. Invest.* 76: 439-445.

Spady D.K. et Cuthbert A. (1992). Regulation of hepatic sterol metabolism in the rat. Parallel regulation of activity and mRNA for 7 α -hydroxylase but not 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase or low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 5584-5591.

Stolk M.F.J., Van de Heijning B.J.M., Van Erpecum K.J., Van de Broek A.M.W.C., Renooij W. et Van Berge Henegouwen G.P. (1994). The effect of bile acid hydrophobicity of several types of cholesterol crystals from model bile vesicles. *J. Hepatol.* 20: 802-810.

Stolz A., Takikawa H., Sugiyama Y., Kuhlenkamp J. et Kaplowitz N. (1987). 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity of the Y' bile acid binders in rat liver cytosol. Identification, kinetics, and physiologic significance. *J. Clin. Invest.* 79: 2: 427-434.

Strasberg S.M. et Harvey P.R.C. (1990). Biliary cholesterol transport and precipitation : Introduction and overview of conference. *Hepatology* 12: 1s-5s.

Strichartz S.D., Abedin M.Z., Song M.K. et Roslyn J.J. (1989). Altered biliary prostaglandins and cholesterol gallstones: an in vivo study. *J. Surg. Res.* 46 : 6: 620-624.

Sugerman H.J., Brewer W.H., Shiffman M.L., Brodin R.E., Fobi M.A., Linner J.H., MacDonald K.G., MacGregor A.M., Martin L.F., Oram-Smith J.C., Popoola D., Schirmer B.D. et Vickers F.F. (1995). A multicenter, placebo-controlled, randomized, double-blind, prospective trial of prophylactic ursodiol for the prevention of gallstone formation following gastric-bypass-induced rapid weight loss. *Am. J. Surg.* 169: 1: 91-96.

Takikawa H., Stolz A., Sugimoto M., Sugiyama Y. et Kaplowitz N. (1986). Comparison of the affinities of newly identified human bile acid binder and cationic glutathione S-transferase for bile acids. *J. Lipid Res.* 27: 6: 652-670.

Tepperman J., Caldwell F.T. et Tepperman H.M. (1964). Induction of gallstones in mice by feeding a cholesterol-cholic acid containing diet. *Am. J. Physiol* 206: 628-634.

Thistle J.L. et Schoenfield L.J. (1971). Lithogenic bile among young Indian women: lithogenic potential decrease with chenodeoxycholic acid. *N. Engl. J. Med.* 284: 4: 177-181.

Thistle J.L. et Hofmann A.F. (1973). Efficacy and specificity of chenodeoxycholic acid therapy for dissolving gallstones. *N. Engl. J. Med.* 289: 13: 655-659.

Thistle J.L., May G.R., Bender C.E., Williams H.J., LeRoy A.J., Nelson P.E., Peine C.J., Petersen B.T. et McCullough J.E. (1989). Dissolution of cholesterol gallbladder stones by methyl tert-butyl ether administered by percutaneous transhepatic catheter. : *N. Engl. J. Med.* 320: 10: 633-639.

Traversol L.W. (1976). Carl Langenbuch and the first cholecystectomy. *Am. J. Surg.* 132: 81-89.

Tritapeppe R., Dipadova C., Zuin M., Bellomi M. et Podda M. (1976). Lithogenic bile after conjugated estrogen. *N. Engl J. Med.* 295: 961-962.

Trotman B.W., Ostrow J.D. et Soloway R.D. (1974). Pigment vs cholesterol cholelithiasis: comparison of stone and bile composition. *Am. J. Dig. Dis* 199: 585-590.

Turley. S.D. et dietsy. J.M. (1978). Re-evaluation of the the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *J. Lipid. Res.* 9: 924-928.

Uchida K., Akiyoshi T., Igimi H., Takase H., Nomura Y. et Ishihara S. (1991). Differential effects of ursodeoxycholic acid on the formation of biliary cholesterol crystals in mice. *Lipids* 26: 7: 526-530.

Ulissi A., Purdum P.P. et Moore E.W. (1992). Inhibition of luminal acidification by amiloride in cultured human gallbladder (GB) epithelia. *Hepatology* 16: 155A.

Van Berge Henegouwen G.P., Van der Werf S.D. et Ruben A.T. (1987). Fatty acid composition of phospholipids in bile in man: promoting effect of deoxycholate on arachidonate. *Clin. Chim. Acta* 165: 1: 27-37.

Van der Linden W. (1972). Gallstone formation in animals. Dans: **Fisher M.M., Goresky C.A., Shaffer E.A. et Strasberg S.M. (eds).** *Gallstones.* Plenum Press. New York and London. 213-222.

Van der Linden W. et Bergman F. (1977). Formation and dissolution of gallstones in experimental animals. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 17: 174-233.

Van Erpecum K.J., Portincasa P., Gadellaa M., Van de Heijning B.J.M., Van Berge-Henegouwen G.P. et Renooij W. (1995). Effects of bile salt hydrophobicity on nucleation behaviour of cholesterol crystals in model bile. dans: **Portincasa P.A.M.** *Galolbladder and bile in health and gallstone disease. The role of motility, gallstones and bile lipid composition.* Chap 13: 186-197.

Van Epercum K.J. et Van Berge-Henegouwen G.P. (1999). Gallstones : an intestinal disease? *Gut* 44: 435-438.

Van Nieuwerk C.M., Groen A.K., Ottenhoff R., van Wijland M., van den Bergh Weerman M.A., Tytgat G.N., Offerhaus J.J. et Oude Elferink R.P. (1997). The role of bile salt composition in liver pathology of *mdr2* (-/-) mice: differences between males and females. *J. Hepatol.* 26: 1: 138-145.

Velasco N., Braghetto I. et Csendes A. (1983). Treatment of retained common bile duct stones: a prospective controlled study comparing monoocetanolin and heparin. *World J. Surg.* 7: 2: 266-270.

Villanova N., Bazzoli F., Taroni F., Frabboni R., Mazzella G., Festi D., Barbara L. et Roda E. (1989). Gallstone recurrence after successful oral bile acid treatment. A 12-year follow-up study and evaluation of long-term postdissolution treatment. *Gastroenterology* 97: 726-731.

Vlahcevic Z.R., Bell C.C. Jr., Buhac I., Farrar J.T. et Swell L. (1970). Diminished bile pool size in patients with gallstones. *Gastroenterology* 59: 165-173.

Vlahcevic Z.R., Pandak W.M. et Stravitz R.T. (1999). Regulation of bile acid biosynthesis. Dans: **Cooper A.D. Guest editor.** Bile salts, metabolic, pathologic and therapeutic consideration. *Gastroenterology Clinics of north Am.* 28: 1: 1-25.

Von Bergmann K., Epple-Gutsfeld M. et Leiss O. (1984). Differences in the effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid on biliary lipid secretion and bile acid synthesis in patients with gallstones. *Gastroenterology* 87: 136-143.

Wang D.Q-H., Paigen B. et Carey M.C. (1997a). Phenotypic characterization of *Lith* genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: physical-chemistry of gallbladder bile. *J. Lipid Res.* 38: 1395-1411.

Wang D.Q-H., Lammert F., Paigen B. et Carey M.C. (1997b). *Lith* genes induce biliary cholesterol hypersecretion as a prelude to cholesterol gallstone formation in inbred mice. *Gastroenterology* 112: A1411.

Wang D.Q-H., Paigen B. et Carey M.C. (1998). Genetic variations in cholesterol absorption efficiency are associated with cholesterol gallstone formation in inbred mice. *Hepatology* 28: 163A.

Wang D.Q.H., Lammert F., Cohen D.E., Paigen B. et Carey M.C. (1999a). Cholic acid aids absorption, biliary secretion and phase transitions of cholesterol in murine cholelithogenesis. *Am. J. Physiol.* 276: G751-G760.

Wang D.Q-H., Lammert F., Paigen B. et Carey M.C. (1999b). Phenotypic characterization of *Lith* genes that determine susceptibility to cholesterol cholelithiasis in inbred mice: Pathophysiology of biliary lipid secretion. *J. Lipid Res.* 40: 2066-2079.

Weiss K.M., Ferrell R.E., Hanis C.L. et Styne P.N. (1984). Genetics and epidemiology of gallbladder disease in New World native peoples. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 6: 1259-1278.

Welch C.L., Xia Y.R., Shechter I., Farese R., Mehrabian M., Mehdizadeh S., Warden C.H. et Lusic A.J. (1996). Genetic regulation of cholesterol homeostasis: chromosomal organization of candidate genes. *J. Lipid Res.* 37: 7: 1406-1421.

Whiting M.J. et Watts J. McK. (1987). Role of cholic acid in the dietary induction of cholesterol gallbladder stones in mice. *J. Gastroenterology and Hepatology* 2: 547-555.

Wolkoff A.W., Suchy F.J., Moseley R.H., Meier P.J., Gollan J.L., Freimer N., Fitz J.G., Boyer J.L., Berk P.D. et Scharschmidt B.F. (1998). Advances in Hepatic Transport: Molecular Mechanisms, Genetic Disorders, and Treatment. A Summary of the 1998 AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 28: 1713-1719.

Xia Y.R., Bachinsky D.R., Smith J.A., McCluskey R.T., Warden C.H. et Lusic A.J. (1993). Mapping of the glycoprotein 330 (*Gp330*) gene to mouse chromosome 2. *Genomics* 17: 3: 780-781.

Yamanaka Y., Tsuji K. et Ichikawa T. (1986). Stimulation of chenodeoxycholic acid excretion in hyper cholesterolemic mice by dietary taurine. *J. Nutri. Sci. Vitaminol.* 32: 3: 287-296.

Yousef I.M., Tuchweber B., Vonk. R.J., Masse D., Audet M. et Roy C.C. (1981). Lithocholate cholestasis. Sulfated glycolithocholate induced intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterology* 80: 233-241.

Yu P.R., Chen Q.A., Biancani P. et Behar J. (1996). Membrane cholesterol alters gallbladder muscle contractility in prairie dogs. *Am.J. Physiol* 34 : G56-G61.

Zakko S.F. et Hofmann A.F. (1990). Microprocessor-assisted solvent-transfer system for gallstone dissolution. In vitro and in vivo validation. *Gastroenterology* 99: 1807-1813.