

2m 11. 2714. 3

Université de Montréal

Effets comparatifs des acides tauroursodeoxycholique, taurocholique
et taurodeoxycholique sur la dissolution des phospholipides
et la fluidité membranaire

par

Josué Thomas

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

Décembre 1998

© Josué Thomas, 1998



2nd 11/11/99

W
4
U38
1999
V.080

Department of Health

Public Health Service

Division of Field Epidemiology

1600 Clarendon Avenue

Atlanta

Georgia 30333

Department of Epidemiology

1600 Clarendon Avenue

Atlanta, Georgia 30333

Telephone: (404) 621-4300

Facsimile: (404) 621-4300

Internet: www.cdc.gov

1999

Atlanta, Georgia 30333



Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce Mémoire intitulé :

Effets comparatifs des acides tauroursodeoxycholique, taurocholique
et taurodeoxycholique sur la dissolution des phospholipides
et la fluidité membranaire

Présenté par Josué thomas

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes.

Marielle Gascon-Barré

Ibrahim Yousef

Victor Gavino

Mémoire accepté le: 99-06-17

SOMMAIRE

L'accumulation des acides biliaires dans l'hépatocyte durant la cholestase intrahépatique peut avoir un effet délétère sur la membrane cellulaire et son métabolisme. L'acide ursodeoxycholique est couramment utilisé dans le traitement des maladies du foie telle la cholestase intrahépatique. L'un des mécanismes proposés pour expliquer l'effet thérapeutique de l'acide ursodeoxycholique est la protection de la membrane cellulaire contre les dommages causés par des concentrations élevées d'acides biliaires. L'objectif de cette étude est d'examiner l'effet de l'acide tauroursodeoxycholique sur la dissolution des phospholipides membranaires des hépatocytes qui affecte en général, la fonction et la fluidité de la membrane. Aussi, l'effet détergent de l'acide tauroursodeoxycholique était comparé à celui de l'acide taurodeoxycholique (un acide biliaire hydrophobe) et de l'acide taurocholique, un acide biliaire hydrophile comme l'acide ursodeoxycholique. Les effets de ces acides biliaires étaient testés en utilisant un système de membranes artificielles imprégnées de phospholipides et ensuite perfusées à une vitesse constante avec des concentrations différentes de ces acides. De plus, l'effet de ces acides biliaires sur la fluidité membranaire des cellules hépatiques a été examiné. Les résultats ont démontré que les trois acides biliaires testés dissolvaient les phospholipides contenu dans les membranes artificielles proportionnellement à la concentration des acides. L'acide taurodeoxycholique était le plus détergent à toutes les concentrations et à tous les temps de la perfusion suivi de l'acide taurocholique et de l'acide tauroursodeoxycholique.

La fluidité des membranes cellulaires hépatiques n'était pas modifiée par l'acide tauroursodeoxycholique, elle était réduite par les acides taurocholique et taurodeoxycholique dont l'effet était plus marqué. En conclusion, les résultats de notre étude suggèrent que l'acide tauroursodeoxycholique peut protéger la membrane cellulaire contre les effets nocifs des acides biliaires d'une part du fait qu'il possède un faible effet détergent et d'autre part en stabilisant la fluidité de la membrane.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIREiii
LISTE DES TABLEAUX.....	.x
LISTE DES FIGURES.....	.xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	.xii
REMERCIEMENTS.....	.xiii
INTRODUCTION.....	1
1. ANATOMIE FONCTIONNELLE DU FOIE.....	2
1. Anatomie et physiologie	2
2. Les constituants cellulaires.....	6
2. LA BILE.....	9
2.1 Composition de la bile.....	9
2.2 Acides biliaires.....	9
2.2.1 <i>Biosynthèse des acides biliaires.....</i>	<i>10</i>
2.2.2 <i>Régulation de la biosynthèse des acides biliaires.....</i>	<i>13</i>
2.2.3 <i>Propriétés physicochimiques des acides biliaires.....</i>	<i>14</i>
2.2.4 <i>Action des acides biliaires toxiques sur les membranes.....</i>	<i>16</i>
2.3 Biotransformation.....	17
2.3.1 <i>Conjugaison des acides biliaires.....</i>	<i>18</i>
2.3.1.1 <i>Amidation.....</i>	<i>18</i>

2.3.1.2	<i>Sulfatation</i>	19
2.3.1.3	<i>Glucuronidation</i>	20
2.3.1.4	<i>Glucosylation et N-acétylglucosamisamination</i>	20
2.3.2	<i>Hydroxylation du noyau</i>	21
2.4	Lipides biliaires.....	22
2.4.1	<i>Phospholipides biliaires</i>	23
2.4.2	<i>Cholestérol biliaire</i>	24
3.	FLUX BILIAIRE	25
3.1	Formation de la bile.....	25
3.2	Débit biliaire dépendant des acides biliaires.....	27
3.2.1	<i>Capture des acides biliaires</i>	27
3.2.2	<i>Transport intracellulaire des acides biliaires</i>	28
3.2.3	<i>Sécrétion canaliculaire des acides biliaires</i>	29
3.3	Débit biliaire indépendant des acides biliaires.....	30
4.	CIRCULATION ENTÉROHÉPATIQUE	32
5.	CHOLESTASE	36
5.1	Définition.....	36
5.2	Cholestase induite par les acides biliaires.....	37
5.3	Altération de la capture et du transport des acides biliaires.....	40
5.4	Altération de la composition membranaire des hépatocytes.....	41

5.5	Les acides biliaires dans la cholestase.....	44
6.	FLUIDITÉ MEMBRANAIRE.....	47
6.1	La membrane plasmique.....	47
6.2	Les membranes hépatocytaires dans la cholestase.....	50
6.3	Facteurs influençant la fluidité membranaire.....	51
6.4	Méthodes d'évaluation de la fluidité.....	52
6.4.1	<i>Anisotropie de fluorescence.....</i>	<i>53</i>
6.5	Locations des sondes fluorescentes.....	54
7.	UDCA DANS LE TRAITEMENT DES MALADIES CHOLESTATIQUES DU FOIE	56
7.1	Synthèse et métabolisme de l'acide UDC.....	56
7.2	Propriétés de l'acide UDC.....	58
7.3	Effets neutralisants de l'UDC.....	58
7.3.1	<i>Diminution de l'hydrophobie du pool des acides biliaires endogènes..</i>	<i>59</i>
7.3.2	<i>Action sur la sécrétion des acides biliaires.....</i>	<i>60</i>
7.3.3	<i>Accroissement de la sécrétion canaliculaire des composés cholestatiques.....</i>	<i>61</i>
7.3.4	<i>Augmentation du métabolisme de l'agent toxique.....</i>	<i>62</i>
7.4	Effet cytoprotecteur.....	62
7.4.1	<i>Préservation de la fonction membranaire.....</i>	<i>64</i>
7.5	Effet sur le métabolisme cellulaire.....	65
7.6	Expérience clinique.....	65

7.7	Effet immunologique.....	66
7.8	Effets comparatifs des autres acides biliaires.....	67
8.	OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	69
9.	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	70
9.1	Etudes in vitro.....	70
9.2	Études ex vivo.....	73
9.2.1	<i>Isolement des membranes plasmiques et canaliculaires.....</i>	<i>73</i>
9.3	Techniques de mesure.....	75
10.	RÉSULTATS.....	76
10.1	Incorporation de PC au niveau des filtres en fonction de la concentration de la solution.....	76
10.2	Évaluation du pouvoir détergent des acides biliaires sur PC au niveau des filtres.....	76
10.2.1	<i>Effets des acides biliaires à 1 μmoles.....</i>	<i>79</i>
10.2.2	<i>Effets des acides biliaires à 2 μmoles.....</i>	<i>79</i>
10.2.3	<i>Effets des acides biliaires à 4 μmoles.....</i>	<i>79</i>
10.3	Études de la fluidité lipidique des membranes plasmiques et canaliculaires du foie.....	86
10.3.1	Anisotropie de fluorescence des membranes plasmiques (PM) Et canaliculaires (BCM).....	86

11. DISCUSSION.....	91
11.1 Effets détergents de TCA, TUDCA et TDCA.....	91
11.2 Effets détergents des acides biliaires en fonction du CMC.....	93
11.3 Effets des acides biliaires sur la fluidité membranaire.....	95
11.4 Prévention de la cholestase par l'acide ursodeoxycholique.....	99
12. CONCLUSION.....	102
BIBLIOGRAPHIE.....	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Quantité de PC incorporé dans les membranes artificielles.....	77
Tableau II:	Quantité de PC dissous dans les membranes artificielles en fonction de la durée la perfusion.....	78
Tableau III:	Pourcentage de PC dissous par rapport au PC total contenu dans les membranes artificielles.....	81
Tableau IV:	Anisotropie de fluorescence du PC évalué à l'aide du TMA-DPH.....	88
Tableau V:	Effets des acides biliaires sur l'anisotropie de fluorescence des fractions membranaires plasmatiques (PM).....	89
Tableau VI:	Effets des acides biliaires sur l'anisotropie de fluorescence des fractions membranaires canaliculaires (BCM).....	89

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Structure microscopique d'un lobule hépatique.....	3
Figure 2:	Représentation schématique d'une travée cellulaire hépatique.....	5
Figure 3:	Structure des acides biliaires.....	11
Figure 4:	Biosynthèse des acides biliaires chez l'humain.....	15
Figure 5:	Relation entre le flux biliaire et la sécrétion des acides biliaires.....	26
Figure 6:	Concept courant des transporteurs impliqués dans la formation de la bile chez l'humain.....	31
Figure 7:	Circulation entérohépatique et digestion des lipides.....	33
Figure 8:	Schéma d'une membrane biologique.....	49
Figure 9:	Localisation de UDCA et TUDCA dans une membrane phospholipidique.....	68
Figure 10:	Système de la perfusion.....	72
Figure 11:	Quantité de PC incorporé dans les membranes artificielles en fonction de la concentration du PC.....	78
Figure 12:	Effets des acides biliaires sur PC contenu dans les membranes artificielles.....	83
Figure 13:	Effets des acides biliaires sur PC contenu dans les membranes artificielles.....	84
Figure 14:	Profil de PC dissous sous l'action des acides biliaires TUDCA, TCA et TDCA en fonction de la concentration et du temps de la perfusion.....	85
Figure 15:	Effets des acides biliaires TUDCA, TCA et TDCA sur l'anisotropie de fluorescence du Phosphatidylcholine (PC), des membranes plas- matiques (PM) et canaliculaires (BCM) évalués à l'aide du TMA-DPH.....	90

LISTE DES ABREVIATIONS**Acides biliaries**

A.B:	Acides biliaries
TUDCA:	Tauroursodeoxycholic acid
TCA:	Taurocholic acid
TDCA:	Taurodeoxycholic acid
UDCA:	Ursodeoxycholic acid
LCA:	Lithocholic acid
DCA:	Deoxycholic acid
CA:	Cholic acid

Autres:

HPLC:	High performance liquid chromatography
PL:	Phospholipides
PC :	Phosphatidylcholine
μM:	Micromole

REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu pour le privilège qu'il m'a accordé de pouvoir accomplir ce travail. J'aimerais témoigner ma gratitude envers le Docteur Ibrahim Yousef du Département de Pharmacologie qui a assumé la direction de mes études ainsi que pour son soutien constant à ma formation. Son accueil, sa disponibilité et ses conseils ont été des éléments précieux et indispensables à la réalisation de ce travail de recherche.

Les études sur la fluidité membranaire n'auraient pu être réalisés sans la collaboration étroite du Docteur Tuchweber du Département de Nutrition. Je la remercie sincèrement pour ses encouragements et sa contribution significative à ma formation scientifique.

Mes remerciements vont également à Diane Mignault et Maurice Audet qui ont beaucoup contribué à ma formation technique ainsi qu'à tous mes collègues de travail, particulièrement Christian Jr.

Finalement, je voudrais remercier ma femme Magdala pour son soutien, sa compréhension et son aide précieuse durant mes études. Je voudrais remercier mon père Enoc et mon frère aîné, Docteur Berman pour leur contribution dans ma formation académique. Mes remerciements à mon frère Daumec et ma soeur Jocelyne pour leur soutien. Ce mémoire est dédié à ma fille Dhartie.

INTRODUCTION

Les acides biliaires jouent un rôle important dans la dissolution des lipides provenant de l'alimentation, facilitant leur absorption intestinale. Une stagnation de la bile, résultant d'une défaillance de sa formation telle qu'observée dans la cholestase intrahépatique, peut entraîner une accumulation des acides biliaires toxiques et induire des désordres physiologiques importants; en particulier des dommages au niveau des membranes cellulaires hépatiques. L'usage de l'acide ursodeoxycholique (UDCA) s'est avéré bénéfique dans le traitement de plusieurs pathologies cholestatiques chez l'homme; ses mécanismes d'action demeurent cependant largement inconnus. En vue de mieux comprendre certains aspects, ce travail vise à comparer les effets de la forme tauroconjuguée de l'acide ursodeoxycholique avec celle des acides cholique et déoxycholique sur des membranes artificielles et sur des membranes hépatocytaires de rats.

1. ANATOMIE FONCTIONNELLE DU FOIE

1.1 ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE

Le foie, l'organe le plus volumineux du corps, est une glande endocrine et exocrine jouant un rôle primordial dans la biotransformation des déchets endogènes, des médicaments et des toxines exogènes. Il contribue à la régulation du flux sanguin et capte efficacement les acides aminés, les carbohydrates, les lipides et les vitamines en assurant leur stockage et leur libération dans le sang et la bile. Il transforme les substances hydrophobes en substances hydrophiles facilitant ainsi leur élimination.

Le foie est incomplètement séparé par des septums fibreux en quatre lobes qui sont eux-mêmes divisés en lobules. Le lobule, unité morphologique du foie, est une structure hexagonale ayant à chaque coin: une branche de la veine porte qui conduit du sang veineux riche en nutriments provenant des viscères digestifs et responsable de 80% du débit, une artère, un canal biliaire, des lymphatiques et des nerfs (fig. 1). Autour de la veine centrale située au centre du lobule, irradiant des traveées de cellules hépatiques ou hépatocytes entre lesquelles sont disposés des canaux appelés sinusoides de sorte qu'un hépatocyte présente au moins deux faces cellulaires en contact avec le sang facilitant les échanges métaboliques entre la cellule et le sang (fig. 2). La paroi des sinusoides est constituée de cellules endothéliales (20% des cellules hépatiques) munies de larges fenêtres (100-150nm), permettant les échanges entre le sinusoides et les hépatocytes puis de cellules de Kupffer qui sont des macrophages appartenant au système de phagocytes.

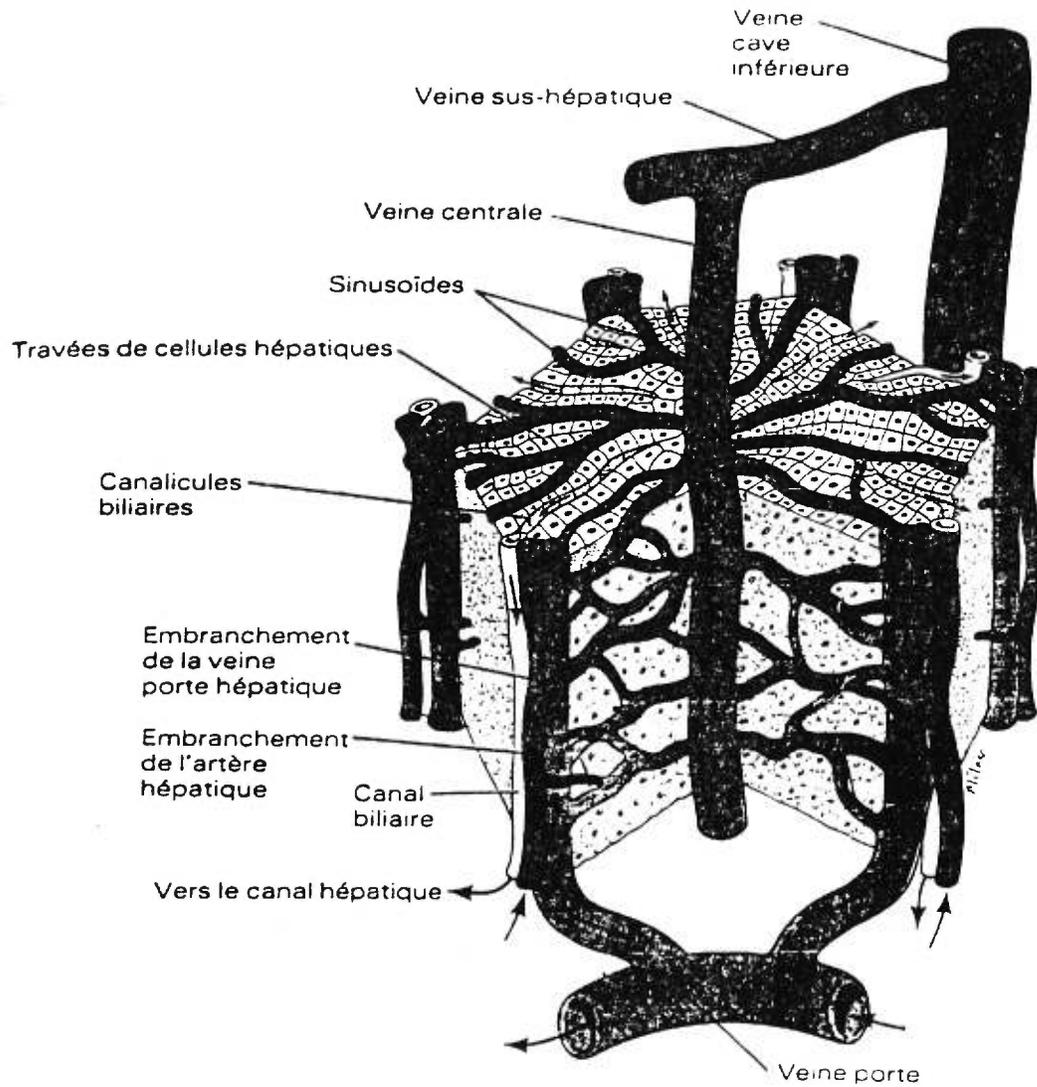


Figure 1: Structure microscopique d'un lobule hépatique.

Les flèches indiquent la direction des flux sanguin et biliaire. (Spence et Masson 1983)

mononucléés, capables de débarrasser le foie des débris de cellules, de microorganismes et des particules étrangers. Entre les cellules endothéliales et les hépatocytes se trouvent: l'espace de Disse renfermant des fibrilles de réticuline, et des cellules étoilées stockant surtout la vitamine A. Le sang et la bile circulent à contre courant permettant aux hépatocytes de modifier en permanence la composition des solutés délivrés à la circulation générale et dans la bile (Roger Marthan 1996).

On doit à Rappaport le modèle acinaire représentant le mieux l'unité fonctionnelle hépatique qui apparait comme une organisation de cellule parenchymateuse autour de la triade porte (Wright, N. and al., 1984; Albert, L.J., 1996). Trois zones concentriques de limite imprécise sont définies à partir des vaisseaux afférents: les cellules de la zone 1 reçoivent du sang en premier et sont moins sujet à la nécrose comparée aux zones 2 et 3 recevant du sang moins nutritif et possiblement moins résistant aux hépatotoxines (Albert, L.J., 1996). Le pouvoir de captation des cellules de la zone 1 est important pour les acides biliaires et crée un gradient de concentration de la zone 1 à 3 (Groothuis et coll., 1982, Albert, L.J., 1996).

Le canalicule biliaire de $0.75\mu\text{m}$ de diamètre (Watanabe N, 1991) est formé par l'accolement de membrane d'hépatocytes contigües qui sont délimités par des jonctions serrés fonctionnellement perméables et permettant les échanges entre le plasma et les canalicules (Gatmaitan C.Z and al 1994, Oda, M., 1974). Il représente la branche proximale et la plus petite de l'arbre biliaire. Le canalicule biliaire compte pour 13% de la surface de l'hépatocyte. Les hépatocytes ont une organisation de surface unique en rapport à beaucoup d'autres cellules épithéliales polarisées.

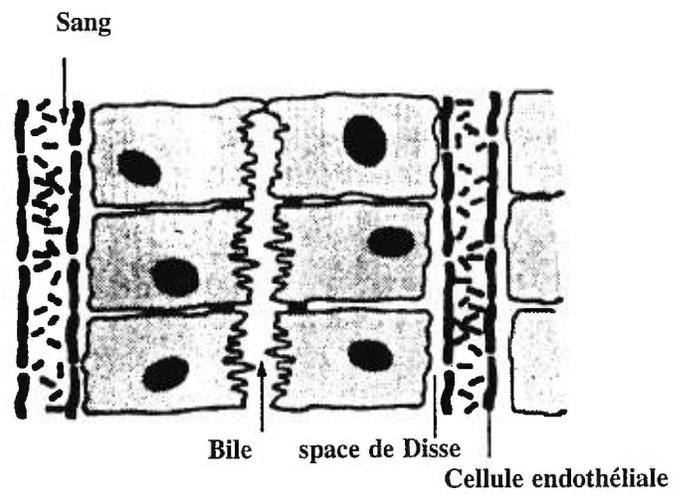


Figure 2. Représentation schématique d'une travée cellulaire hépatique

Des travaux expérimentaux ont montré la présence de filaments de myosine et d'actine autour du canalicule (Watanabe N. et co 1991). Les microvilli contiennent des filaments d'actine qui s'étendent de la membrane plasmique à l'espace canaliculaire. Ces filaments sont abondants dans l'ectoplasme péricanaliculaire (Erlinger 1984, Klassen and Watkins, 1984). Ils stabilisent la membrane canaliculaire, régularisent la contractilité du canalicule biliaire et la perméabilité des jonctions serrées (Phillip and Satir_1988). La polymérisation des filaments d'actine est sous le contrôle d'ATP (Cooper, J.A., 1991, Carlier, M.F., 1991). La déplétion cellulaire en ATP, telle celle survenant au cours de l'hypoxie (Florine, C.K. et co., 1991) peut entraîner des changements pathologiques au niveau des microvilli (Florine, C.K. et co., 1991).

1.2 Les constituants cellulaires

Le foie est constitué de cellules multiples dont les cellules parenchymateuses ou hépatocytes de type épithéliale représentent 65% des cellules hépatiques, les cellules endothéliales des sinusoides 20%, les cellules de Kupffer 10%, les cellules étoilées 5%, les "Pit cell" (Roger Marthan, 1996). Les cellules hépatiques, organisées en travées de 15 à 20 cellules, bordent un sinusoides depuis la terminaison d'une veinule porte jusqu'à la terminaison d'une veinule hépatique (Roger Marthan, 1996). Les hépatocytes, les principales cellules du parenchyme hépatique, possèdent une structure et une fonction sécrétoire bien définies. Il représentent l'unité fonctionnelle du foie dans la formation de la bile (Albert, L.J., 1996). L'hépatocyte, de forme polyhédrique, possède trois surfaces membranaires morphologiquement et fonctionnellement différentes: sinusoidale (basale)

72%, latérale (intercellulaire) 15% et apicale (canaliculaire)13% (Hubbard A.L. and al 1994, Rodriguez B 1989).

La membrane sinusoidale est constituée d'une couche de cellules endothéliales hautement poreuses; elle manque la structure conventionnelle de la membrane basale des capillaires. Une telle structure permet les échanges de métabolites entre le sang et les cellules de manière sélective (Fahimi 1982, Miyai, K., 1991); par exemple les chylomicrons nouvellement produits dans le tractus digestif doivent être réduits dans le courant sanguin avant de traverser la membrane et captés par les hépatocytes. Les cellules endothéliales jouent donc un rôle protecteur contre les expositions de quantités excessives de triglycerides. (De Zanger and Wisse, 1982). Elle renferme des pompes ioniques responsables des gradients intra et extracellulaires et des récepteurs. Le pourcentage de lipides contenu dans la membrane sinusoidale est différente de celui des autres membranes, elle est riche en phosphatidylcholine (Schachter, D., 1994; Arias, I.M., 1987).

La région basolatérale établit les contacts avec les cellules entre elles par le biais des desmosomes et des jonctions intermédiaires, les jonctions communicantes assurent la communication cellulaire. Les jonctions serrées possèdent une certaine perméabilité et permettent le passage sélectif d'eau et de certains ions (Cerejido, M., 1989; Fisher, A., 1991). La membrane canaliculaire comporte de nombreuses microvillosités, son contenu en sphingolipides est supérieur au phosphatidylcholine de même que la proportion de cholestérol par rapport de glycolipides (Schachter, D., 1988; Van Meer G., 1989). Elle

possède une fluidité moindre que les portions membranaires adjacentes, ce qui la confère une meilleure résistance aux fortes concentrations d'acides biliaires (Alvaro D. 1994; Boyer 1986).

La cellule hépatique est très polarisée, sa structure reflète son double rôle de captation et de sécrétion (Hubbard, A.L., 1994). Trois types de jonction existent entre les hépatocytes: le desmosome, la jonction intermédiaire, la jonction serrée. Cette dernière est la plus importante et sépare la lumière canaliculaire de l'espace intercellulaire; elle est perméable au passage d'eau, d'électrolytes (Boyer, 1980; Erlinger 1982; Klassen et Watkins, 1984).

2. LA BILE

2.1 Composition de la bile

La bile est une sécrétion aqueuse complexe exclusivement formée dans le foie. Elle joue un rôle important dans la digestion et l'absorption des graisses, l'élimination de plusieurs substances exogènes (Mattern, S., 1996). La concentration des constituants de la bile varie au sein des espèces; elle est principalement composée d'eau 97-98%, et de 2-3% de substances organiques et inorganiques. Parmi les matières organiques, on retrouve des acides biliaires, le glutathione, le cholestérol, des phospholipides, des protéines (albumine surtout), des pigments biliaires. Le Na^+ , K^+ , Ca^{++} et HCO_3^- représentent les principaux éléments inorganiques (Richard Moseley 1992). Le pH de la bile se situe entre 7,0 et 7,5. Son osmolarité est identique à celle du plasma.

2.2 Acides biliaires

Les acides biliaires sont exclusivement synthétisés dans le foie à partir du cholestérol dont ils représentent les principaux métabolites. La quantité totale d'acides biliaires chez l'humain, 2-4 g, est maintenue constante par la synthèse journalière de 250-500 mg d'acides biliaires en raison de la perte fécale (Hofmann, A.F., 1982; Setchell, K.D.R., 1988). Les acides biliaires s'accumulent et se concentrent dans la vésicule biliaire, puis ils sont sécrétés dans l'intestin suite à l'ingestion d'un repas. Chez le rat, il n'y a pas de vésicule biliaire, les acides biliaires sont sécrétés directement dans l'intestin. La synthèse des acides biliaires se fait suivant un rétrocontrôle négatif (Sheila S. 1988) et est influencé par la quantité d'acides biliaires retournant au foie par la circulation entérohépatique. Les acides biliaires sont des acides carboniques saturés de 24 carbones; ils sont constitués d'un

noyau stéroïde cyclopentanophénanthrène portant un groupe hydroxyl, une chaîne latérale de 5 atomes de carbone se terminant par un acide carboxylique, avec un groupe carboxyl terminal et deux groupes méthyles en C18 et C19 (Vlahcevic, Z.R., 1996) (fig. 3).

2.2.1 Biosynthèse des acides biliaires

Les acides biliaires primaires: acide cholique (CA: 3α , 7α , 12α - tri-hydroxy- 5β cholanolic acid) et acide chenodeoxycholique (CDCA: $3\alpha,7\alpha$ -dihydroxy-5 cholanolic acid) sont continuellement synthétisés dans le foie à partir du cholestérol. La biosynthèse des acides biliaires représente la voie d'élimination majeure du cholestérol de l'organisme des mammifères (Scheibner, J. et al., 1996). La molécule de cholestérol subit une série de transformation tant au niveau de son noyau qu'au niveau de la chaîne latérale. L'étape initiale de la synthèse des acides biliaires est l'hydroxylation en position 7α du noyau stéroïde du cholestérol dans le réticulum endoplasmique pour donner le 7α -hydroxycholestérol, (Bjökerm, I., 1985) sous l'action du 7α -hydroxylase (fig. 4). Cette enzyme est contrôlée par une rétroaction négative produite par les acides biliaires provenant de la circulation entérohépatique (Vlahcevic, 1991). Le 7α -hydroxycholestérol est converti via une isomérase et une réductase en 7α -hydroxy-4cholesten-3-one, intermédiaire commun dans la synthèse des acides biliaires, conduisant à la synthèse du cholate ou du chenodeoxycholate sous l'influence du 12α hydroxylase microsomiale (Ananthanarayanan, M. et co., 1988; Von, Dippe P. et co., 1986). Le dérivé Δ^4 -3oxo- 7α , 12α -dihydroxy obtenu est réduit pour donner le noyau 5β des acides biliaires de la plupart des vertébrés ou le 5α chez les animaux inférieurs.

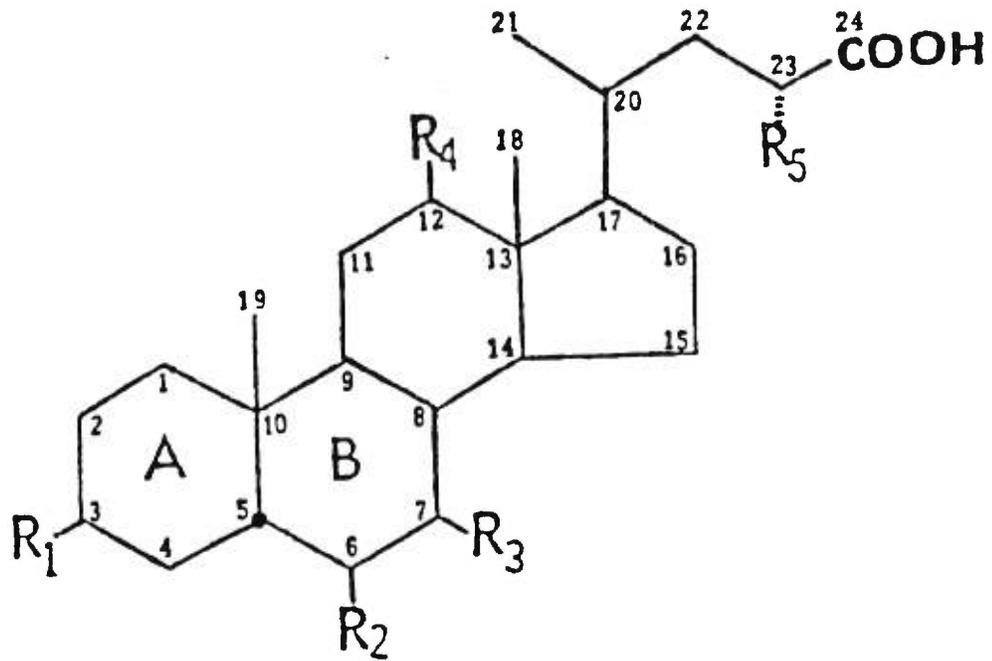


Figure 3. Structure des acides biliaries C₂₄ où le R montre la position des groupements hydroxyles. Le point en C₅ indique l'atome hydrogène qui peut être β ou α (Hofmann, 1988)

La chaîne latérale du stéroïde à 27 atomes de carbone subit une dégradation oxydative en plusieurs étapes. Sous l'action du cytochrome P-450 hydroxylase, il se produit au niveau des mitochondries une hydroxylation en C27, suivie d'une β -oxydation pour former l'acide carboxylique en C27 (Björkhem, I., 1992). Cette étape comporte l'introduction d'une double liaison en C24 suivie d'une 24 hydroxylation et un clivage oxydatif d'un fragment de 3 carbones conduisant aux acides biliaires matures à 24 carbones.

Sous l'action des bactéries intestinales, les acides biliaires primaires sont déconjugués puis déshydroxylés pour donner les acides biliaires secondaires tels: l'acide désoxycholique (dihydroxylé) (DCA) formé à partir de l'acide cholique et les acides lithocholique (monohydroxylé) et 7-oxo-lithocholique dérivés de l'acide chenodésoxycholique. Les acides biliaires tertiaires sont formés à partir des acides biliaires secondaires: la sulfatation hépatique de l'acide lithocholique conduit à l'acide sulfolithocholique et la réduction bactérienne ou hépatique de l'acide 7-oxo-lithocholique donne l'acide ursodésoxycholique (Matern et Gerok 1979). Certains auteurs suggèrent que l'UDCA pourrait être considéré comme un acide biliaire secondaire (produit dans l'intestin) ou un acide biliaire tertiaire (produit dans le foie) (Fromm H. et co 1980,1983). Les acides biliaires cholique (CA), chenodeoxycholique (CDCA) et désoxycholique (DCA) prédominent dans la bile chez l'homme; l'acide lithocholique compte pour moins de 5% de la quantité totale des acides biliaires (Hofmann, 1994). D'autres acides biliaires sont présents dans la bile en faible quantité tel l'acide ursodeoxycholique (UDCA) dans une proportion de 5% environ (Hirano, S. et co., 1981). Cependant, parmi les différentes espèces étudiées, la composition des acides biliaires de la bile montrent des variations

marquées. Chez le rat par exemple, l'acide β -muricholique, formé dans le foie à partir du CDCA, prédomine dans la bile contrairement chez l'humain (Danielson H. et co 1973).

2.2.2 Régulation de la biosynthèse des acides biliaires

Il est généralement admis que la circulation entérohépatique des acides biliaires est le déterminant majeur de la synthèse des acides biliaires dans le foie (Vlahcevic, Z.R. et al 1991; Scheibner, J. et co 1996). Le rôle précis des acides biliaires individuels est à l'étude chez certaines espèces. Quoique encore non clair, on a cru que la biosynthèse des acides biliaires étaient sujet à une inhibition par un mécanisme de rétroaction (Hofmann, A.F., 1989; Heuman, D.M. et al., 1988, Vlahcevic, Z.R. et al 1991). Récemment, Strativtz et co (1993) ont suggéré que l'effet inhibiteur d'un apport d'acide biliaire est négligeable et démontré que les acides biliaires contrôlent le cholestérol 7α -hydroxylase en régularisant le ARNm de l'enzyme. Certains auteurs suggèrent que le cholestérol nouvellement synthétisé est d'une importance particulière dans la modulation du 7α -cholestérol hydroxylase (Pandak, W.M. et co., 1990). Selon Princen HMG et co. (1997), les acides biliaires présents dans la bile régularisent les enzymes clés intervenant dans les différentes voies de synthèse des acides biliaires. Un mécanisme hormonal a été évoqué reposant sur le glucagon qui augmente le niveau d'AMPc hépatocytaire et fait la régulation à la baisse, ce qui peut expliquer la baisse d'acides biliaires durant le jeûne (Hylemon, P.B. et co., 1992). Alors que chez le rat, la synthèse des acides biliaires est proportionnelle à l'apport de cholestérol, chez l'homme, une absorption élevée du cholestérol est équilibré par une sécrétion élevée du cholestérol (Everson, G.T. et co., 1991).

2.2.3 Propriétés physicochimiques des acides biliaires.

Les acides biliaires sont des molécules amphiphiliques, c'est à dire ayant une extrémité polaire hydrophile (hydrosoluble) à cause des groupements hydroxyles et une extrémité non polaire hydrophobe (liposoluble) dûe à la présence du noyau stéroïdien et des groupements méthyls (Coleman 1987; Hofmann,1988). La balance hydrophile-hydrophobe des sels biliaires est déterminé par un nombre de facteurs incluant: la position, l'orientation, le nombre des groupe oxy sur le noyau stérol, la conjugaison à la taurine ou glycine, l'ionisation de la chaîne latérale, la présence ou l'absence de substituants nucléaires additionnels tels le sulfate ou le glucuronate, le degré d'hydroxylation (Heuman, D.M.,1989; Donovan, J.M. et co., 1993; Armstrong et Carey, 1982). Les substitutions hydroxy en position équatoriale favorisent l'accroissement de la portion hydrophile chez certains acides biliaires tel l'acide UDC qui, étant un stéréo-isomère de l'acide CDC, possède un taux de sécrétion maximal (SRm) plus élevé que la plupart des acides biliaires endogènes (Zouboulis-Vafiadis et coll., 1982; Hardison et coll., 1981). Les acides biliaires, de par leur structure amphiphile, constituent de puissants détergents naturels capables de dissoudre les lipides et de faciliter leur absorption intestinale. Le potentiel détergent et le pouvoir toxique des acides biliaires paraissent en relation avec l'importance de leur portion hydrophobe (Hofmann, 1988). En fonction de leur hydrophobicité décroissante, on peut citer: $ALC > ADC > ACDC > AC > UDC$ (Ostrow, J.D., 1993). L'acide lithocholique est généralement le plus toxique tandis que l'acide UDC n'induit pas de toxicité.

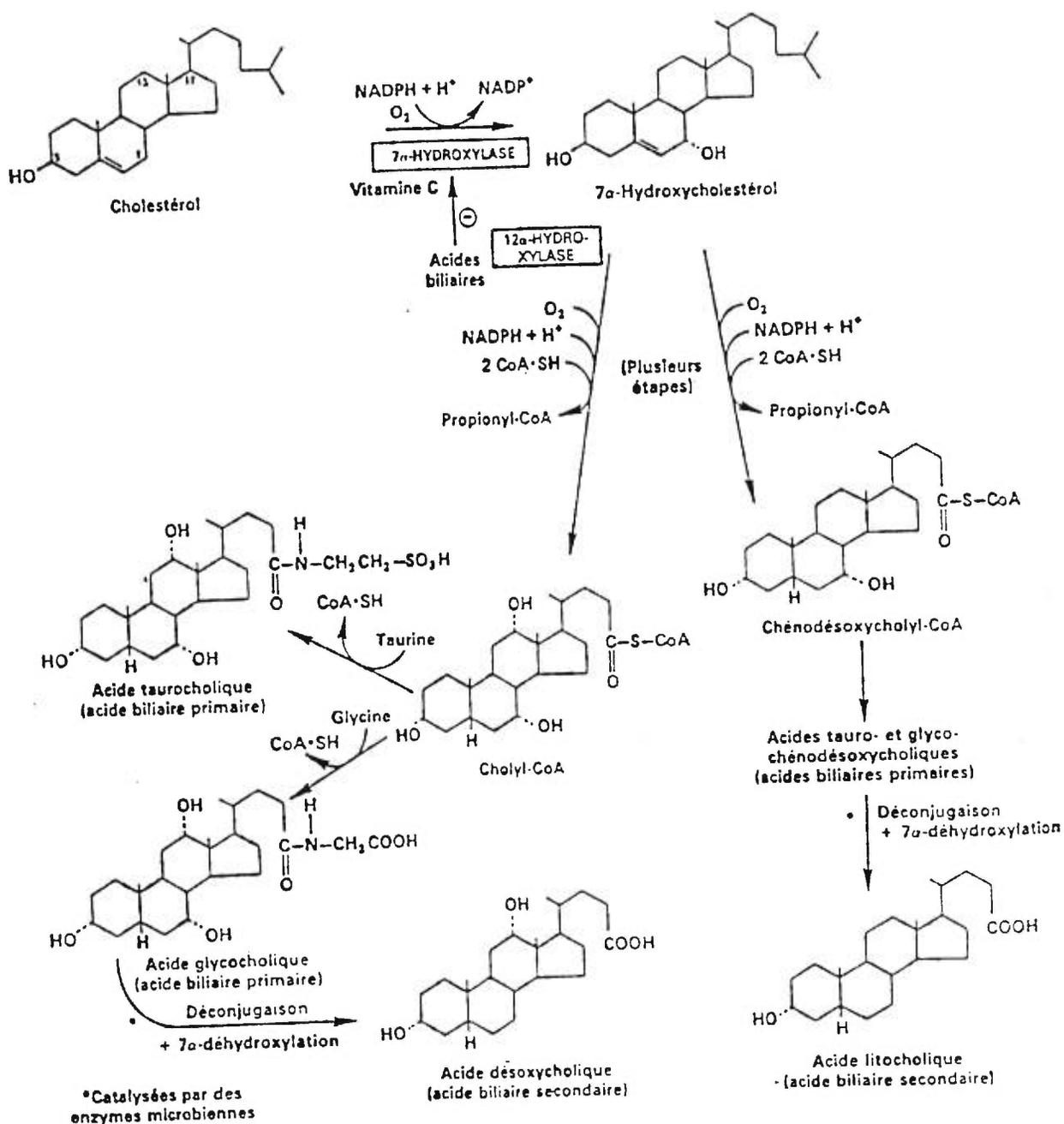


Figure 4. Biosynthèse des acides biliaires chez l'humain (Mayes 1989)

Les anions des acides biliaires s'associent dans l'eau pour former des agrégats appelés micelles. Une telle agrégation survient progressivement à l'approche d'une certaine concentration dite concentration micellaire critique (CMC) (Roda A. et al., 1983; Hofmann, A.F. et al 1988). Le CMC des acides biliaires dans la bile varie en moyenne de 3 à 10 mM et selon le milieu environnant (Hofmann, A.F., 1963). Au-dessous du CMC, les acides biliaires existent sous forme de monomères en solution. Les acides biliaires ayant un CMC élevé produisent un flux biliaire plus grand que ceux qui ont une bonne capacité de former des micelles (Hardisson, W.G.M., 1971). Le CMC de l'acide UDC est de 7 mM soit le double de l'acide CDC, ce qui implique une solubilité et une stabilité accrues sous forme monomérique (Hofmann et Roda, 1984; Montet, 1991; Roda A et al., 1989) et une solubilisation des lipides nettement inférieure (Carey, 1985; Scholmerich et coll., 1984). Même à fortes concentrations, UDC ne provoque pas de toxicité cellulaire.

2.2.4 Action des acides biliaires toxiques sur les membranes

La nature de l'association des sels biliaires avec les membranes n'est pas compris complètement. Le degré d'incorporation et de diffusion passive des acides biliaires dans les membranes épithéliales, leur affinité pour les régions lipidiques des membranes cellulaires, semblent en relation avec le degré d'hydrophobie (Hofmann, 1990; Hofmann et Roda, 1984; Donovan J.M. et al., 1993). A des concentrations milimolaires, les acides biliaires toxiques peuvent solubiliser les lipides membranaires tels le phosphatidylcholine, le cholestérol et entraîner une perte de la perméabilité membranaire. En vertu de leur

effet surfactant, ces acides biliaires peuvent entraîner la rupture des membranes plasmiques et canaliculaires (Coleman R et al., 1977) et causer la mort de la cellule (Coleman, R. et al 1980; Vyvoda, O.S. et al 1977; Schubert, R. et al., 1988). Coleman et al ont montré que les acides biliaires toxiques peuvent dissoudre les membranes canaliculaires. L'infusion des acides biliaires toxiques chez le rat a entraîné la libération dans la bile d'enzymes membranaires canaliculaires tels phosphatases alcaline et des lipides membranaires structurels tels sphingomyeline qui normalement ne sont pas trouvés en quantité significative dans la bile. Dans les conditions physiologiques normales, de fortes concentrations d'acides biliaires sont observées dans le système biliaire et dans le petit intestin sans causer des dommages aux cellules. On ignore comment l'épithélium de l'arbre biliaire et intestinal résistent aux effets nocifs des acides biliaires (Coleman, R. et co., 1977). Les acides biliaires peuvent entraîner des dommages au foie dans des circonstances particulières qui seront étudiées dans le chapitre consacré à la cholestase.

2.3 Biotransformation des acides biliaires

Suite à leur synthèse hépatique, les acides biliaires sont biotransformés. Ce processus suit plusieurs étapes dont: la conjugaison, l'oxido-réduction des groupes oxo, l'hydroxylation du noyau et de la chaîne latérale (Elliott WH. 1985). Du point de vue chimique, la conjugaison des acides biliaires comporte l'amidation avec la taurine ou à la glycine, l'estérification avec le glucuronate, le sulfate, le glucose ou le N-acétylglucosamine. La sulfatation et la glucuronidation représentent une voie mineure de

conjugaison des acides biliaires (Hofmann, 1994). D'autres processus intéressent le métabolisme des acides biliaires tels: l'oxidation et la réduction des groupes oxo, l'hydroxylation du noyau et de la chaîne latérale possiblement (Hofmann, 1994).

2.3.1 Conjugaison des acides biliaires

2.3.1.1 Amidation

Chez l'homme, les acides biliaires sont conjugués dans le foie avec les acides aminés glycine ou taurine dans un rapport de 3 pour 1 pour former des dérivés amides avant d'être excrétés dans la bile (Suchy et al., 1985; Hofman,1994a; Elliott,1985). La conjugaison des acides biliaires est nécessaire à leur transport, leur sécrétion et au maintien de leur solubilité dans l'environnement aqueux intestinal (Hofman, 1994; 1998; Balisteri et al, 1983). Elle prolonge leur activité biologique en augmentant leurs propriétés détergentes (Hofmann, A.F. 1984; Vlahcevic. Z.R. et al., 1991), ce qui facilite la stabilisation de la bile (Stolz, A. et al., 1991), la réabsorption intestinale (Charles, L.,1991; Hofmann, 1994). Physiologiquement, le comportement des acides biliaires est modulé après leur amidation principalement avec la taurine. Leur pKa se trouve diminué, permettant l'ionisation à un pH plus faible, semblable au pH de la lumière intestinale, et un accroissement de la solubilité (Strange, 1984). L'effet sur la concentration micellaire critique est pourtant négligeable (Hofmann,1994).

L'amidation des acides biliaires se produit en deux étapes: la transformation

des acides biliaires (X-COOH) en dérivés co-A par l'acide co-A ligase microsomiale suivi du transfert du groupe carboxyl activé au groupe amine de l'acide aminé par le N-acyltransférase cytoplasmique. (Petzinger, E et al., 1984; Wieland, T. et al., 1984; Killenberg, 1978; Lim et Jordant, 1981; Hofmann, 1994). Les mécanismes, la distribution et la régulation des enzymes impliqués dans la conjugaison des acides biliaires ne sont pas bien connus. Chez le rat, le rapport des conjugués de glycine/taurine est de 1 sur 8 (Haslewood, 1978; Spaeth et Schneider, 1974; Hofmann, 1994)

2.3.1.2 Sulfatation

La sulfatation des acides biliaires semble représenter un mécanisme de protection (Sherlock et Dooley, 1993). La sulfatation du groupement hydroxyle en position 3α de l'acide lithocholique par l'enzyme sulfotransférase cytoplasmique augmente sa solubilité facilitant son excrétion urinaire empêchant ainsi son absorption intestinale (Stiehl et al., 1976; Loof et Wengle, 1979). La sulfatation des acides biliaires n'est pas un mécanisme de détoxification général puisque l'acide taurolithocholique sulfaté n'est pas cholestatique alors que l'acide glycolithocholique sulfaté est cholestatique (Yousef et al., 1981).

Chez le macaque rhésus et le babouin, l'acide lithocholique est formé dans le côlon à partir de l'acide CDC endogène, mais l'acide LC n'est pas présent en quantité appréciable dans la bile en dépit de l'incapacité de ces espèces à sulfater l'acide LC. L'absence de l'acide LC peut être expliquée par son élimination avec les résidus de la

diète, puisque ces animaux consomment de la nourriture riche en fibres. La sulfatation des autres acides biliaires est une voie de biotransformation mineure chez l'homme excepté dans la cholestase où l'acide CDC est sulfaté efficacement et éliminé dans les urines (Steihl, A., 1977; Raedsch, R. et al., 1981; Hedenborg, G. et al., 1984). Chez le hamster la sulfatation peut contribuer à l'élimination rapide des acides biliaires dans la cholestase (Galeazi, R. et al., 1977). Il peut aussi contribuer à l'élimination des acides biliaires secondaires rares qui sont peu conjugués durant le transport hépatocytaire.

2.3.1.3 *Glucuronidation*

Le processus de glucuronidation, comme la sulfatation, rend les acides biliaires plus polaires facilitant ainsi leur excrétion urinaire (Balisteri et al., 1983). Ce processus peu fréquent normalement est augmenté dans la cholestase (Sherlock et Dooley, 1993; Matern et Gerok, 1979). L'enzyme UDP-glucuronyl-transférase microsomiale est responsable de la glucuronidation (Kirkpatrick et al., 1984) qui peut se faire sur le groupement 3 hydroxyle ou sur le groupement carboxyl des acides biliaires (Shattuck et al., 1986; Parquet et al., 1985).

2.3.1.4 *Glucosilation et N-acétylglucosamination*

La glucosilation représente aussi une forme de conjugaison d'une importance physiologique, elle est catalysée par le glucosyltransférase retrouvé dans le foie, les reins et

les fractions microsomales intestinales. Le dolichyl phosphoglucose a été identifié comme le co-substrat de la glucosilation des acides biliaires chez l'homme (Radomska et al., 1993).

Il a été observé chez les patients souffrant de cholestase intrahépatique et recevant de l'UDCA, que 32% de l'UDCA était excrété sous forme de conjugué de N-acétylglucosamine. Ces études et d'autres ont montré que la conjugaison avec le N-acétylglucosamine est une voie sélective pour la 7-hydroxylation des acides biliaires (Radomska A et al 1993).

2.3.2 Hydroxylation du noyau

L'hydroxylation du noyau peut se faire en position 6 ou 12 à côté de l'hydroxylation en position 7 chez la plupart des mammifères (Hagey, L.R,1992). L'hydroxylation hépatique en position 6 ou 7 des acides biliaires 7-deoxy (LCA, DCA, murideoxycholate et hydeoxycholate) varie parmi les espèces (Elliott, W.H., 1985) et est d'une signification pathologique considérable. L'hydroxylation du LCA se fait en position 6 chez le rat (Elliott, W.H.,1985; Clerici et al.,) et en position 7 chez le hamster et le cochon d'Inde (Crombie et al., 1992). L'étendue de l'hydroxylation des acides biliaires en position 7 peut aussi influencer leur effet cholérétique. L'homme, le lapin, le macaque rhésus, le babouin et le chien ne peuvent pas hydroxyler en position 7.

L'acide β -muricholique prédomine chez le rat et serait formé par 6 β -hydroxylation de l'acide chénodésoxycholique qui donnerait de l'acide α -muricholique puis par épimérisation du groupement 7 α -hydroxyl (Hsia,1971). L'acide β -hyocholique est formé par épimérisation bactérienne de l'acide β -muricholique (Sacquet, 1979). L'acide hyodésoxycholique serait formé par 6 α -hydroxylation de l'acide lithocholique; l'hydroxylation de ce dernier en position 6 conduit à l'acide muridésoxycholique. Chez le rat, les acides biliaires secondaires peuvent être réhydroxylés. Sous l'action d'une 7-réhydroxylation, l'acide deoxycholique (DCA) et lithocholique (LCA) donnent respectivement acide cholique et acide chénodeoxycholique (CDCA) contrairement à l'homme où cette réhydroxylation ne peut avoir lieu.

2.4 Lipides biliaires

Le cholestérol libre et le phosphatidylcholine (lécithine) constituent les principaux lipides biliaires. Leur sécrétion est réglée par les acides biliaires par un mécanisme non clair (Erlinger, 1986; Rahman et al, 1986). Il existe une relation presque linéaire entre le taux de sécrétion des lipides biliaires et celui des acides biliaires (Hofman et coll., 1975). Pour un taux très haut ou très bas, cette relation ne se maintient pas (Hardison et Apter, 1972; Wheeler et King, 1972). Coleman (1987b) a démontré que pour des concentrations d'acides biliaires très élevées, le taux maximal du débit lipidique est semblable dans toutes les situations. L'efficacité d'une faible concentration pour provoquer la sécrétion des lipides est reliée à leur hydrophobicité: l'acide CDC et l'acide DC sont plus efficaces que

la cholique.

Les lipides de la bile existent sous forme de vésicules et de micelles mixtes avec les acides biliaires (Somjen et Gilat, 1985; Coleman, 1987a; Turley et Dietschy, 1988) mais, les micelles ne se forment pas à l'intérieur des hépatocytes vu la faible concentration des acides biliaires dans la cellule hépatique ($<0.2\text{mM}$), cette valeur étant au-dessous du $\text{CMC} > 2\text{mM}$ (Coleman, 1987b). La solubilisation du cholestérol sous forme micellaire ou vésiculaire est fonction du taux de sécrétion et de l'hydrophilicité des acides biliaires. Pour un débit d'acides biliaires normal ou élevé ou contenant moins d'acides biliaires hydrophiles, la majorité du cholestérol est transporté dans des micelles mixtes (Leigton et Carey, 1984; Cohen et coll., 1986). Tandis que pour un débit faible d'acides biliaires, le cholestérol est transporté surtout dans des vésicules de phospholipides (Cohen et coll 1986). La sécrétion des lipides biliaires dépend de l'intégrité des microtubules (Barnwell et al., 1984).

2.4.1 *Phospholipides biliaires*

Le phosphatidylcholine (lecithine) est le principal phospholipide de la bile. D'autres types de phospholipides sont aussi retrouvés dans la bile tel phosphatidyléthanolamine. La concentration des phospholipides biliaires varie de 0.2 à 0.8g /100ml, ils sont synthétisés par les microsomes de l'hépatocyte (Yousef et al., 1975) à partir du 1,2-diacylglycérol ou de l'acide phosphatidique (Harper 1982). Les

phospholipides biliaires se composent de 80-95% de phosphatidylcholine (PC) alors que ceux des membranes contiennent seulement 33% de PC, 25% de sphingomyeline et 40% d'autres lipides (Kremmer et coll., 1976). Selon Yousef et coll. (1977), les phospholipides biliaires proviennent d'un pool des microsomes hépatiques réglés par le flux des acides biliaires entérohépatiques. Selon les travaux de Gregory et coll.(1975) confirmés par Yousef et co. (1977), une infusion d'acide taurocholique au foie de rat isolé et perfusé peut stimuler la synthèse de lécithine sans influencer l'activité de la cytidine diphosphocholine diglycéride transférase (CDP-choline diglycéride transférase), un enzyme responsable de la synthèse de novo de PC dans la membrane canaliculaire.

2.4.2 *Cholestérol biliaire*

Le cholestérol de la bile provient des lipides circulant dans le plasma surtout des lipoprotéines à haute densité (HDL) (Schwartz et al, 1978). Sa synthèse peut se faire à partir du foie, du cortex surrénalien, de la peau, des testicules et de l'aorte à partir de l'acétyl-coA, la principale source des atomes de carbone dans cette synthèse(Harper et al 1982).

3. FLUX BILIAIRE

3.1 formation de la bile

La bile est formée au niveau des hépatocytes et sécrétée dans les canalicules. Elle subit lors de son passage dans les différents canaux biliaires, des modifications par des processus de réabsorption et de sécrétion d'eau et d'électrolytes (Erlinger, 1988; Loria et al., 1991).

La production du flux biliaire repose sur la filtration osmotique d'eau et d'électrolytes par voie paracellulaire et transcellulaire (Erlinger, 1988; Lester, 1989) et en grande partie à la haute polarité de la cellule hépatique permettant un transport du pôle sinusoidal au domaine apical (Nathanson et Boyer, 1991). Plusieurs transporteurs actifs ont été identifiés au niveau des sinusoides et des canalicules facilitant une régulation importante de la sécrétion canaliculaire (Meier, 1989; Nathanson et Boyer, 1991). Chez plusieurs espèces étudiées, il a été démontré une relation linéaire entre le flux biliaire et la sécrétion des acides biliaires (Erlinger, 1988; Hofmann, 1989; O' Maille, 1980). La pente de la ligne de corrélation représente le volume d'acide biliaire formé par quantité d'acides biliaires sécrétés. Mais lorsque la droite de régression du débit biliaire en fonction de l'excrétion des acides biliaires est extrapolée à une sécrétion d'acides biliaires nulle, il y a un débit résiduel, ce qui suggère que le flux biliaire était composé d'au moins de deux fractions: le débit biliaire dépendant des acides biliaires et le débit biliaire indépendant des acides biliaires (Fig. 5) (Hofmann, 1989; Erlinger, 1988).

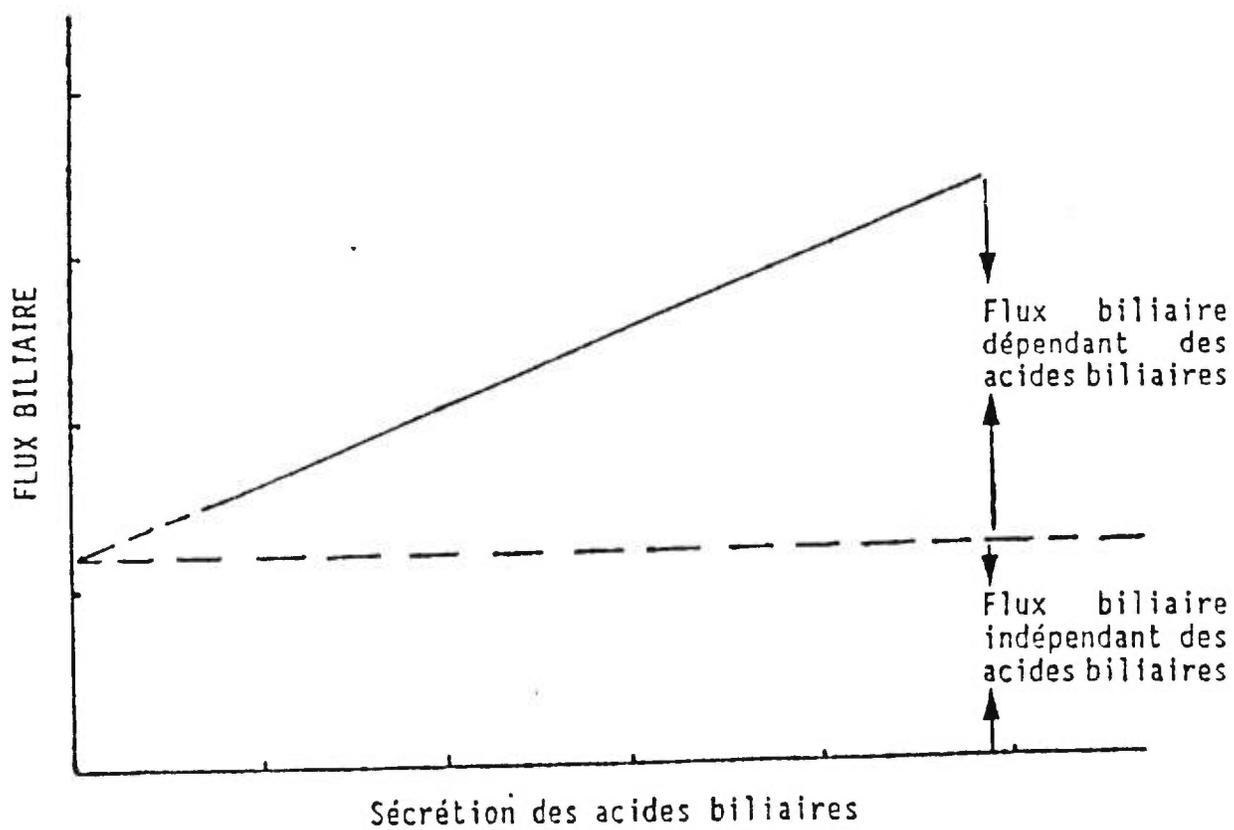


Figure 5. Relation entre le flux biliaire et la sécrétion des acides biliaires. L'extrapolation de la droite de régression jusqu'à l'ordonnée à l'origine indique le flux biliaire indépendant des acides biliaires. (Adapté d'après Erlinger, 1988)

3.2 Débit biliaire dépendant des acides biliaires

Les acides biliaires, sécrétés activement dans le canalicule, créent un gradient osmotique avec appel d'eau de l'hépatocyte et des espaces intercellulaires vers la lumière canaliculaire (Suchy J.F. et al 1997; Sperber 1965). Le pouvoir osmotique des acides biliaires peut être réduit quand ils se trouvent associés sous forme de micelles. Ce débit peut être considéré comme la portion de bile formée par la sécrétion active des acides biliaires dans la lumière canaliculaire. Il a été démontré qu'il existe une corrélation positive entre la sécrétion des acides biliaires et le débit biliaire, cela suggère que les acides biliaires ont une grande influence sur le débit biliaire canaliculaire (Hofmann, 1989; Meier-Abt, 1990). Plusieurs mécanismes ont été évoqués pour expliquer l'existence de cette fraction biliaire dépendant des acides biliaires: capture des acides biliaires par les hépatocytes, leur transport et leur sécrétion dans la bile.

3.2.1 Capture des acides biliaires

La membrane sinusoidale renferme beaucoup de récepteurs, de canaux ioniques et systèmes de transport permettant la capture des acides biliaires par les hépatocytes. Ce processus nécessite l'intégrité de la Na^+, K^+ , adénosine triphosphate (ATPase) fournissant de l'énergie essentielle au bon fonctionnement de ce phénomène (Erlinger, 1981, 1988; Loria et al 1991). Deux polypeptides membranaires de poids moléculaire 54kDa et 48kDa impliqués dans la capture des acides biliaires ont été identifiés (Kramer et al, 1982;

Fricke,1987). Un système secondaire actif dépendant de l'ion sodique couplé à une protéine de transport transmembranaire: de poids moléculaire de 49 KDa a été aussi identifié dans la capture des acides biliaires (Ananthanarayanan et coll. 1988). De récents travaux ont démontré que la capture des acides biliaires par les hépatocytes se produit au moyen d'un transporteur NTCP (Na^+ -taurocholate cotransporting) localisé exclusivement au niveau de la membrane sinusoidale (Meier PJ. 1995; Meier et al 1997; Karpen, S.J. et co., 1996). D'autres transporteurs tels OATP 1 et 2 (organic anion transporting polypeptide) ont été identifiés récemment sur les membranes (Jaquemin, E. et al., 1994, Kullak-Ublick G.A. et al., 1997) (fig. 6).

3.2.2 Transport intracellulaire des acides biliaires

Le transport vésiculaire intracellulaire et le transport cytosolique sont deux mécanismes principaux de transport (Meier 1989). Le transport vésiculaire des acides biliaires a lieu dans le réticulum endoplasmique lisse et l'appareil de Golgi (Jones et Coll., 1979; Suchy et coll., 1983). Le transport cytosolique des acides biliaires se fait en solution ou lié aux protéines telles la glutathione transférase B et deux autres protéines les Binder 1 et Binder 2, la 3α hydroxystéroïde déshydrogénase (Sugiyama et al., 1983; Stolz et al., 1984,1989, Erlinger 1988, Blitzer et Boyer, 1982).

3.2.3 *Sécrétion canaliculaire des acides biliaires*

La sécrétion des acides biliaires dans la bile se fait contre un gradient de concentration et par conséquent est un processus saturable (Erlinger, 1988) et dépend du sodium. Elle nécessite l'intégrité fonctionnelle et structurale des canaux ioniques et d'autres systèmes de transport (Meier 1988). Le cytosquelette est composé de filaments intermédiaires, de microtubules et principalement de microfilaments qui possèdent le rôle le mieux défini dans la sécrétion par leur présence en quantité dans la région péricanaliculaire et dans les microvillosités (French et Davis, 1975). Les microfilaments seraient impliqués dans le maintien de la forme cellulaire, le transport vésiculaire et la contractilité du canalicule biliaire. Coleman (1987) et Meier (1988) suggèrent une glycoprotéine de 100 KDa comme protéine transporteuse des acides biliaires vers le canalicule biliaire. Blitzer et Boyer (1982) soutiennent l'hypothèse de la diffusion membranaire qui suit un gradient électrochimique et les mécanismes d'exocytose (Erlinger 1985). Les études faites à partir de vésicules de membranes canaliculaires de rat ont défini plusieurs mécanismes de transport des acides biliaires tel un système d'une faible affinité et de haute capacité indépendant du Na^+ qui compte pour 50% dans la sécrétion canaliculaire totale des acides biliaires (Nathanson et Boyer 1991). D'autres études ont démontré la présence possible d'un système de transport de taurocholate dépendant d'ATP à travers la membrane canaliculaire. Ce système comporterait les glycoprotéines-P "multidrug resistance" mdr 1 et 2 et MRP (multidrug resistance-associated protein) (Smit, J.J. et al., 1993; Mayer, R. et al., 1995) (Fig.6). Il a été découvert aussi dans le foie du porc et d'autres mammifères une glycoprotéine appelée spgp, appartenant à la famille des

transporteurs dépendant d'ATP (Suchy, F.J. et al., 1997).

3.3 Débit biliaire indépendant des acides biliaires

Cette fraction représente 40% du débit total d'acides biliaires et comporte l'action combinée des autres constituants de la bile osmotiquement actifs, elle varie selon les espèces (Klassen and Watkins, 1984). Plusieurs études ont démontré que le débit biliaire peut persister en l'absence de toute sécrétion d'acides biliaires. Le phénobarbital peut augmenter le débit malgré une diminution de la sécrétion des acides biliaires (Berthelot et coll., 1970; Okuda et coll., 1988). La pompe $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase, l'ion bicarbonate, le glutathione (Bouchard, G. et al., 1997) contribuent à la formation de ce flux biliaire (Klassen et Watkins, 1984; Loria et al., 1991) ainsi que les jonctions serrées (Klassen and Watkins, 1984; Coleman 1987a). Des travaux récents ont démontré que le glutathion y joue un rôle important, au moins chez le rat (Ballatori, N. et al., 1992; 1989). Les cellules tapissant les canalicules biliaires (cholangiocytes) contribuent de façon significative à la formation de la bile par la sécrétion de HCO_3^- et de Cl^- (Alvaro D. et al 1997; Schlenker, T. et co., 1997).

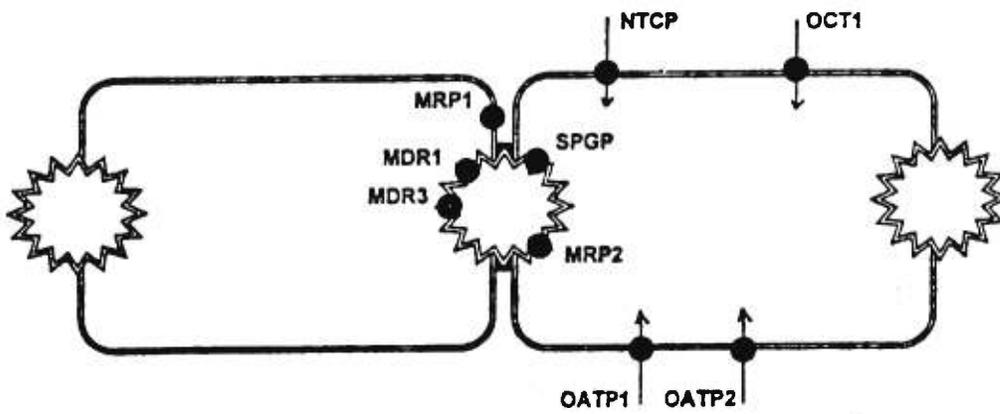


Figure 6: Concept courant des transporteurs impliqués dans la formation de la bile chez l'humain. (Meier PJ1988, Müller M et al 1997)

4. CIRCULATION ENTÉROHÉPATIQUE

Les acides biliaires sont synthétisés et conjugués dans le foie puis sécrétés dans la bile. La bile hépatique est stockée temporairement dans la vésicule biliaire, concentrée entre les repas (Vlahcevic, Z.R. et co., 1996). La vidange de la vésicule est généralement, mais non exclusivement, initiée après les repas par la libération de cholecystokinine (Mok, H.Y.I. et co., 1980). Les sels biliaires sont absorbés passivement le long du tractus gastrointestinal à tous les niveaux (Carey, M.C., 1994). L'iléon est le site majeur de la réabsorption des sels biliaires (95-98%) chez les animaux et les humains. Il est muni d'un système de transport de haute capacité et d'une faible affinité pouvant absorber activement les acides biliaires et les fait passer dans le sang portal où ils sont conduits au foie par la veine porte, principalement liés à l'albumine et aux lipoprotéines (Roda et coll., 1982; Vlahcevic, Z.R. et co., 1996). Ce cycle des acides biliaires entre le foie et les intestins constitue la circulation entérohépatique (Fig. 7).

Le transport à travers les iléocytes dépend des ions Na^+ (Dietschy, J.M. et al; Wilson, F.A., 1991). Le transport des sels biliaires avec les ions sodium montrent l'importance des forces de conduction électrochimique du sodium produit par le Na^+K^+ -ATP-ase dans les membranes des cellules iléales (Schreiber, A.J. et al., 1983). L'absorption passive au niveau du petit intestin et du colon peut se faire par diffusion ionique (sels biliaires) ou non ionique (acide biliaire); le déterminant principal du degré de diffusion passive est la polarité de l'acide biliaire ou du sel biliaire, son pH et son pKa. (Carey, M.C., 1994; Dietschy, J.M., 1968).

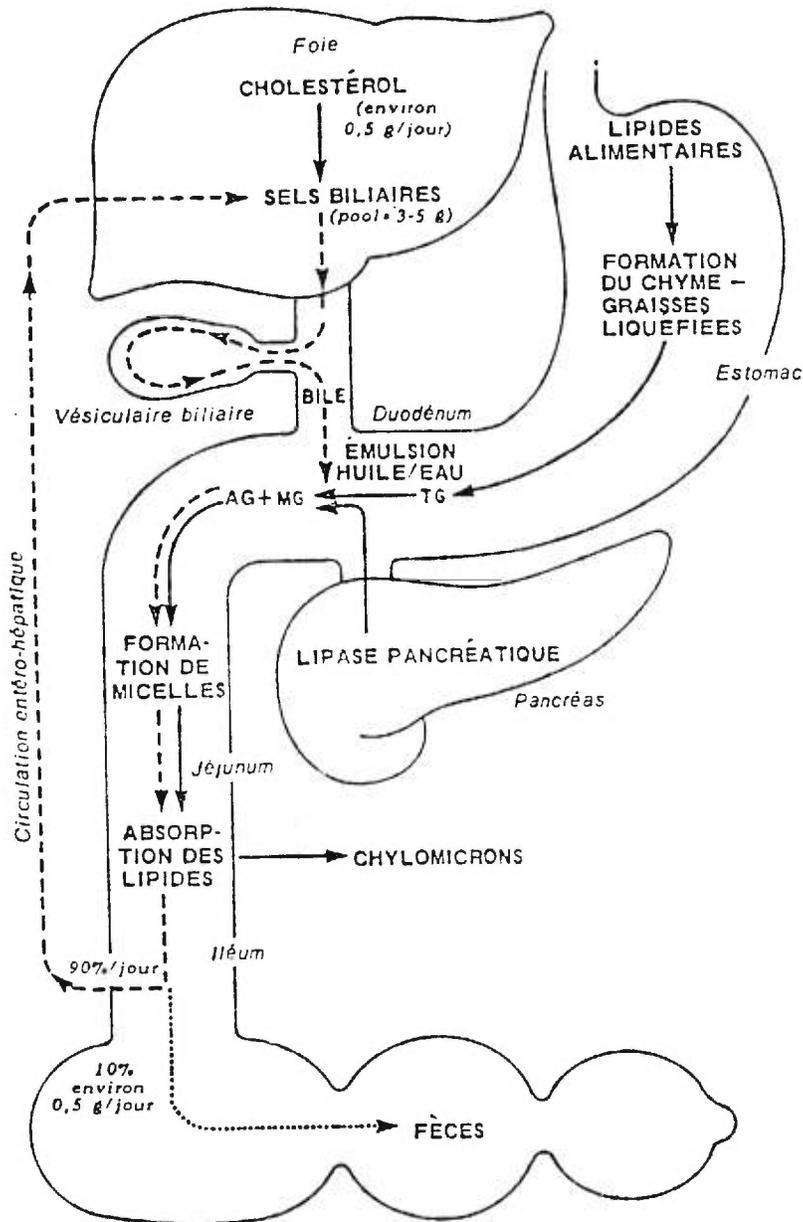


Figure 7. Circulation entérohépatique et digestion des lipides (Harper 1982)

Dans le sang portal, 60-80% d'acides biliaires sont captés par le foie après un premier passage (Hofmann, A.F., 1976; 1977). La force de conduction dérive du gradient de Na^+ produit par le $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATP-ase situé sur les membranes basolatérales (Schreiber, A.J. et al., 1983). La captation par diffusion non ionique n'a pas été bien documentée (Meier, P.J., 1991). La captation hépatique a une corrélation positive avec la polarité des sels biliaires (O' Donovan, M.A., 1993; Aldini, R. et al., 1982) et est inversement en relation avec la force de liaison à l'albumine et aux lipoprotéines (Roda, A. et al., 1982). La capacité du foie de capter les sels biliaires dépasse le pouvoir de sécrétion maximal (Poupon, R.E. et al., 1976). L'acide ursodeoxycholique, sous forme non ionisée se lie plus fermement à l'albumine que l'acide chenodeoxycholique (Roda, A. et co., 1982).

Les principaux produits de la biotransformation des sels biliaires étant la déconjugaison et la 7α -déshydroxylation, sous l'action des bactéries intestinales, les acides biliaires primaires sont déconjugés par des cholyamidases bactériennes libérant des acides biliaires non conjugués. L'acide cholique est converti en acide désoxycholique par une déshydroxylation en 7α ; le chenodésoxycholate subit une déshydrogénation en 7α pour donner le 7-oxolithocholate qui à son tour peut être épimérisé par les enzymes bactériennes en acide ursodésoxycholique (Hylemon, P.B., 1985). Ces acides biliaires sont réabsorbés et réconjugés dans le foie avec la taurine ou la glycine (Elliott, W.H., 1985). De la quantité d'acide deoxycholique (DCA) formé, 30 à 50% retournent au foie où ils sont conjugués avec la taurine ou la glycine; il n'est pas réhydroxylé chez l'homme (Elliott, W.H., 1985). Aproximativement 20% d'acide lithocholique est absorbé à partir du colon vu qu'il est moins soluble que DCA à pH intestinale et à la température corporelle (Carey,

M.C. et co., 1994), il n'est pas réhydroxylé comme DCA. Les récepteurs des membranes sinusoidales des hépatocytes constitue un autre système de haute affinité de liaison et de captation des acides biliaires. L'efficacité de ces deux systèmes expliquent la présence de faibles quantités d'acides biliaires dans les selles et dans le sang périphérique $< 60\mu\text{M}$.

La circulation entérohépatique est facilitée par la production continue et active de bile, la contraction intermittente de la vésicule biliaire, l'activité péristaltique du petit intestin, le transport actif par les cellules iléales et le flux veineux portal. Le shunt choléhépatique ultrarapide de l'arbre biliaire permet la récapture des traces de sels biliaires hydrophobiques non conjugués (Hofmann, A.F., 1993). Dans le côlon, les sels biliaires qui échappent au cycle entérohépatique (200 à 500 mg/jour) sont déconjugués complètement pour former des acides biliaires libres qui sont alors excrétés dans les fécès (Carey M.C. et co 1994).

5. CHOLESTASE INTRAHÉPATIQUE

5.1 Définition

Ce terme a été introduit par Popper et Schaffner (1970) pour décrire une stagnation de la bile dans le foie et l'incapacité de la bile à atteindre le duodénum. Parmi les définitions proposées par les physiologistes, les histopathologistes, les biochimistes et les cliniciens, celle des physiologistes a été retenue; celle-ci considère la cholestase comme étant une stagnation de la bile résultant d'une défaillance de la formation de la bile (Ibrahim, M. Yousef et co., 1997). Cette définition fonctionnelle permet de comprendre les différents étapes de la formation de la bile, de l'excrétion des sels biliaires, des électrolytes et de l'eau. La diminution du débit biliaire peut résulter d'une diminution réelle de la production de la bile et d'un accroissement du reflux des composés biliaires et de l'eau de la bile au plasma. Notons que la diminution du flux biliaire peut résulter d'anomalies du flux d'eau et des constituants de la bile à plusieurs niveaux.

On distingue deux types de cholestase: extrahépatique et intrahépatique. La cholestase extrahépatique est secondaire à une obstruction mécanique des voies biliaires soit par des calculs biliaires, une tumeur, soit par l'atrésie biliaire. La cholestase intrahépatique est caractérisée par des critères histopathologiques, fonctionnels, cliniques et biochimiques. Du point de vue histopathologique, elle est marquée par une stase de la bilirubine au niveau de la zone 3 constatée dans les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les espaces canaliculaires (Desmet, 1992). Du point de vue fonctionnelle, les changements observés

dans l'hépatocyte reflètent les troubles de la sécrétion biliaire telle la rupture des microfilaments entourant les membranes canaliculaires (Loria, P., 1991; Sherlock, S). Le mécanisme est incertain, mais l'inhibition de la motilité canaliculaire et l'ouverture des jonctions serrées peuvent permettre le reflux de la bile vers les sinusoides.

5.2 Cholestase induite par les acides biliaires

Les acides biliaires semblent jouer un rôle important dans le développement de la cholestase vu leur potentiel toxique et cholestatique. La rétention hépatique et la diminution de la sécrétion des acides biliaires (Guslandi, 1990) ont été associés à plusieurs pathologies hépatiques chroniques. Poupon et ses coll. (1987) ont proposé que l'accumulation hépatique d'acides biliaires endogènes toxiques pourraient être responsables des dommages hépatiques retrouvés dans la cholestase chronique chez l'homme. Comme il a été précisé antérieurement, le transport des acides biliaires dans les hépatocytes suit trois étapes majeures (Boyer, J.L., 1995; Suchy, .FJ., 1993): la captation basolatérale, le transport intracellulaire et la sécrétion canaliculaire. Une altération au niveau de l'une de ces étapes pourrait être à l'origine de la cholestase. La réduction du transport des solutés affectant la sécrétion de la bile et l'augmentation du reflux de la bile entraînant une diminution du flux biliaire peuvent être évoquées.

Une corrélation semble exister entre la capacité de liaison des acides biliaires aux protéines et leur hydrophobicité. Avec des hépatocytes isolés, des dérivés de CA et de

CDCA sont rapidement transférés dans l'espace canaliculaire tandis que LCA s'accumule à l'intérieur de la cellule (Wilton, J.C. et co., 1994). L'affinité de certains acides biliaires aux protéines cytosoliques semble limiter leur sécrétion canaliculaire et favoriser leur accumulation dans la cellule hépatique comme il a été démontré dans certains travaux (Hardison, W.G., 1981). Cette réduction de la sécrétion est aussi associée à une altération de la composition lipidique canaliculaire (Kakis et Yousef, 1978). Dans la cholestase induite par LCA, il a été démontré que la liaison de cet acide avec les membranes plasmiques et microsomiales est augmentée et une baisse de cette liaison s'observe à la phase de récupération (Vu, D.D. et co., 1992). Quoique encore obscure, il a été proposé que la liaison du LCA aux membranes canaliculaires altère la structure de la membrane en modifiant sa perméabilité ainsi que sa capacité de transport (Yousef et co., 1997). L'accumulation d'acides biliaires dans l'appareil de Golgi après l'administration d'une forte dose d'acides biliaires témoigne du transport vésiculaire à côté de la liaison aux protéines (Erlinger, S., 1990; Lamri, Y. et co., 1988).

Les microfilaments, concentrés dans la zone péricanaliculaire, jouent un rôle dans la contraction canaliculaire et la propulsion de la bile (Wanatabe, S. et co., 1985), la régulation de la perméabilité des jonctions serrées et la translocation canaliculaire des vésicules (Desmet, V.J., 1994). La phalloïdine, l'acide tauro lithocholique ainsi que d'autres agents cholestatiques peuvent produire une polymérisation irréversible d'actine et de la cytochalasine qui détruit les microfilaments, conduisant à une baisse du flux biliaire (Vonk, R.J. et co., 1982; Phillips, M.J. et co., 1988). De tels phénomènes peuvent être en rapport à la dilatation des canalicules (Phillips, M.J., et co., 1975) considérée comme

un trait caractéristique de la cholestase. La destruction des microfilaments semble être précédée d'une mobilisation élevée de Ca^{++} intracellulaire. Tous les acides biliaires peuvent entraîner une élévation du Ca^{++} intracellulaire chez des hépatocytes isolés en fonction de la dose; mais il existe une corrélation positive entre cet effet et l'hydrophobicité des acides biliaires (Anwer, M.S. et co., 1988; Thibault, N. et co., 1993). De grandes quantités d'acides biliaires mono et di-hydroxylés entraînent une augmentation irréversible du Ca^{++} intracellulaire qui est associée à la toxicité (Thibault, N. et co., 1993). Cependant l'élévation du Ca^{++} intracellulaire à elle seule n'est pas suffisante pour expliquer la cholestase puisque dans le modèle de cholestase induite par l'acide lithocholique, cette augmentation de Ca^{++} n'a été associée à aucun signe de toxicité (Reichen, J. et co., 1994). Avec une concentration de Ca^{++} physiologique cytosolique de $1 \cdot 10^{-7}$ M, les protéines gelsolin, villin et α -actinin qui maintiennent des liaisons croisées avec les filaments d'actine se désintègrent et déstabilisent la surface de la membrane. Les acides biliaires cholestatiques TLC et LC mobilisent du Ca^{++} intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique des hépatocytes isolés (Combettes, L., et al., 1988). Les acides biliaires augmentent cette mobilisation dans l'ordre suivant: $\text{LCA} = \text{TLCA} > \text{CDCA} = \text{TCDCA} = \text{DCA} = \text{TDCA}$ (Anwer, M.S., et co 1988). Il a été démontré qu'une augmentation de Ca^{++} intracellulaire rompt les éléments cytosquelettiques. Les effets des A.B sur le foie pourraient aussi être indirects. À côté de la sécrétion des protéines, les membranes deviennent aussi poreuses aux substances intracellulaires. Ceci a été démontré par une excrétion élevée de LDH (Stolzenbach, F., 1966). Dans les conditions normales, LDH n'est pas sécrété dans la bile (Godfrey, P.P., et co., 1981; Mullock, B.M., et co 1978).

Une augmentation du Ca^{++} intracellulaire peut causer la mort cellulaire (Farber, J.L., 1990). L'évidence d'une élévation du Ca^{++} avec LCA suggère le rôle du Ca^{++} dans la cholestase induite par les acides biliaires. La liaison des acides biliaires, particulièrement les acides biliaires hydrophobiques, au Ca^{++} pourrait entraîner la formation d'agrégats insolubles conduisant au blocage des canalicules (Miyai K. et co., 1977).

5.3 Altération de la capture et du transport des acides biliaires

Les acides biliaires, pour être transportés à travers l'hépatocyte doivent être captés par la membrane sinusoidale et subir une translocation intracellulaire avant d'être excrétés dans la bile. Dans un modèle de cholestase induite par l'éthinyl oestradiol, une réduction de la capture des acides biliaires peut résulter des altérations dans la $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATP}$ -ase, dans la composition lipidique membranaire (Laffi, G. et al., 1994). La capture hépatocytaire ne semble pas être l'événement initial dans la cholestase (Tuchweber, B. et co., 1986). Les protéines apicale cytosoliques et vésiculaires jouent un rôle important dans le transport des acides biliaires et dans la cholestase induite par les acides biliaires. Le transport canaliculaire considéré comme l'étape limitante dans le transport hépatocytaire des acides biliaires est médié au moins par un transporteur électrogénique, un transporteur dépendant de l'ATP et d'un autre dépendant du MOAT (Oude, E.RP. et co., 1991, Elferink, R.P.J.O. et co., 1994; Reichen, J., 1993). La contribution de ces transporteurs dans la cholestase demeure inconnue et des informations limitées sont données sur le processus sécrétoire de la bile impliquant la contraction canaliculaire, les microfilaments quant à la

la survenue de la cholestase (Yousef et co., 1997). La régulation à la baisse du polypeptide transporteur d'anions (OATP1) observée dans la cholestase extrahépatique chez le rat, peut contribuer à réduire la capture des acides biliaires toxiques (Dumont, M. et al., 1997). Les différents mécanismes expliquant le développement de la cholestase ne s'excluent pas l'un l'autre mais constituent plutôt un processus intégré (Yousef et co., 1997).

7.4 Altérations de la composition membranaire des hépatocytes

Dans la cholestase, les acides biliaires hydrophobes tels: LCA et DCA, après avoir traversé l'espace de Disse, se concentrent autour des capillaires et entraînent des changements au niveau des membranes des cellules hépatiques. La toxicité de ces acides biliaires semble être en relation avec leurs propriétés détergentes et la balance hydrophobe-hydrophile (Atili, A.F. et co., 1986; Nakayama, R., et co 1980). Les membranes canaliculaires sont les premières à être altérées, ensuite suivent les membranes basolatérales, les organelles. Les changements au niveau des membranes plasmiques des cellules peuvent être dus aux effets directs des acides biliaires.

L'atteinte des membranes canaliculaires de l'hépatocyte est considérée comme la lésion la plus importante dans la cholestase intrahépatique. Les acides biliaires hydrophobes stimulent la synthèse et la sécrétion des enzymes entraînant la destruction éventuelle des microfilaments ectoplasmiques, conduisant à la dilatation des canalicules biliaires avec perte partielle ou totale de leurs microvillosités (Popper, 1981; Gentilini et co., 1975).

Elles deviennent tortueuses avec prolifération des lumières canaliculaires en vue de former de nouveaux canalicules (Vital, A. et co., 1982; De Vos, R. et co., 1975). Au niveau du cytoplasme, il se produit un épaissement des microfilaments péricanaliculaires, la formation de corps de Mallory (Gerber, M.A.,1973; MacSween, R.M.N. et co., 1973) faits principalement de filaments intermédiaires, une hypertrophie du réticulum endoplasmique lisse avec prolifération mitochondriale et l'altération des jonctions serrées.

Dans la cholestase induite par l'acide lithocholique, la diminution de l'activité de la Na^+,K^+ -ATPase a été notée dans les fractions membranaires enrichies de canalicules mais pas dans les fractions contenant les membranes sinusoidales (Kakis et Yousef 1978). L'inhibition de cet enzyme par les agents cholestatiques pourraient être attribuée à des changements structuraux dans la couche lipidique de la membrane. Le rôle de l'enzyme Mg^{2+} -ATPase prédominant dans les membranes canaliculaires n'est pas bien compris, son activité est inhibée de façon variable (Phillips et coll, 1978).

Les acides biliaires hydrophobes induisent leur effet cytotoxique en s'introduisant dans la double couche lipidique des membranes. Au niveau des sinusoides, l'accumulation des acides biliaires toxiques au niveau des membranes réduit la stabilité des ces dernières et induit la formation de vacuoles d'inclusion. Pour des concentrations élevées d'acides biliaires cytotoxiques, il se produit une autoagrégation des molécules d'acides biliaires, une altération de l'orientation des lipides membranaires, une dissolution micellaire de phospholipides faisant un appel d'eau à l'intérieur de la membrane (Keith, A.D. et co., 1973; Griffith, O.H., 1976) suivie d'une destruction de sa structure avec formation de

trous transitoires. La formation d'orifices et la solubilisation micellaire de lipide sont probablement les étapes successifs de la destruction de la membrane.

Les altérations de la membrane basolatérale hépatocytaire peut être induit par de faibles concentrations d'acides biliaires tandis que les changements au niveau des membranes canaliculaires semblent nécessiter de plus fortes concentrations. A l'état physiologique, puisque de plus fortes concentrations se retrouvent au pôle canaliculaire des hépatocytes, les membranes canaliculaires doivent être plus résistants que les membranes basolatérales. La résistance des membranes canaliculaires est due à leur contenu plus élevé en cholestérol (Güldütuna, S., et co 1993); ce qui explique le rôle modulateur du cholestérol dans la microviscosité et la perméabilité membranaire (Yousef et coll., 1988). La dilatation des canalicules biliaires résulte de la destruction des microfilaments (Phillips, M.J., et co., 1975) plutôt que des dommages à la membrane canaliculaire elle même. Il a été suggéré que la cholestase a un rapport avec la déplétion de phospholipides cellulaires qui sont probablement requis pour le remplacement des lipides dissous dans la bile, en provenance de la membrane canaliculaire (Yousef, I.M. et co 1987).

5.5 Les acides biliaires dans la cholestase

Chez l'homme sain, le cholate, le chenodeoxycholate et le deoxycholate prédominent dans un ratio 1: 1: 0.5 respectivement (Stiehl, A., 1994; Sjoval, 1960). Dans le foie cholestatique, la sécrétion des acides biliaires et des lipides diminuent dans la bile tandis que leur concentration augmente jusqu'à $1000\mu\text{mol/l}$ dans le sérum et à 742 nmol/g de foie (Greim, H., 1972). L'élévation de la concentration systémique et hépatique des acides biliaires est associée à l'efficacité réduite de la circulation entérohépatique et de la sécrétion biliaire (Stiehl, A., 1994; Ostrow, J.D., 1993). En raison des désordres survenus dans le cycle entérohépatique, il en résulte une baisse des acides biliaires secondaires formés dans l'intestin et une élévation des acides biliaires polyhydroxylés formés dans le foie.

Plusieurs travaux ont montré qu'il existe une corrélation positive entre la concentration intrahépatique des acides biliaires dihydroxylés et l'étendue des dommages histologiques du foie, d'où l'hypothèse soutenant que les acides biliaires dihydroxylés sont responsables des dommages hépatiques dans la cholestase (Greim, H., 1972). Il est évident que seuls les acides biliaires dihydroxylés relativement hydrophobiques tels les acides chenodeoxycholique et deoxycholique sont hépatotoxiques tandis que les acides biliaires hydrophiliques comme l'acide ursodesoxycholique ne l'est pas.

Plusieurs études ont démontré que l'accumulation de l'acide lithocholique dans différents cas de cholestase chez l'homme peut entraîner ou contribuer à des dommages hépatiques (Farrell, M.K. et co., 1982; Jazrawi, R.P. et co., 1994). Le LCA, le principal

acide biliaire monohydroxylé chez beaucoup d'espèces, est un puissant agent cholestatique. Son administration prolongée peut entraîner la rétention des acides biliaires et la cirrhose (Feuer, G. et co., 1992). La cholestase est associée à une diminution de la sécrétion biliaire des lipides, un transport maximum d'anions organiques réduit et une augmentation de la sécrétion des protéines membranaires et cytosoliques (Leuschner, U. et co., 1995; Scholmerich, J. et co., 1990). Les dommages cholestatiques ne sont pas pourtant spécifique à LCA bien qu'il soit le plus utilisé dans les cholestases expérimentales induites par les acides biliaires monohydroxylés (Miyai, K. et co., 1977). Le pouvoir cholestatique des acides biliaires monohydroxylés est modulé par les réactions de biotransformation (Feuer, G. et co., 1992; Kuipers, F. et co., 1985). Ces acides biliaires monohydroxylés ne sont pas les seuls responsable de la survenue de la cholestase. Les effets cholestatiques du LCA et des ses conjugués peuvent être contrecarrés par d'autres acides biliaires moins toxiques tels CDCA et CA (Kakis, G. et co., 1980; Zimniak, P. et co., 1990). Les effets protecteurs du TCA et du TUDCA ont été associés à une augmentation de la sécrétion du LCA, une diminution de biotransformation réduite du LCA et un pourcentage élevé de sécrétion de la forme libre (Scholmerich, J. et co., 1990, Kakis, G. et co., 1980).

L'administration de l'acide CDCA chez les animaux est associée à l'inhibition du flux biliaire et du taux de sécrétion des sels biliaires ainsi qu'à une élévation de l'albumine et de la sécrétion biliaire du lactate déshydrogénase (Kitani, K. et co., 1994). Le foie de rat mâle peut convertir le CDCA toxique en acide β -muricholique qui est moins hydrophobe (Yousef, I.M. et co., 1973). Le TCDCA et TDCA produisent des cholestases sévères et une nécrose hépatocellulaire dans les heures qui suivent leur administration (Heuman,

D.M. et co., 1991).

Les acides biliaires sécrétés sont presque totalement conjugués à la glycine ou à la taurine (Hardison, W.G.M., et co., 1977). Les études expérimentales ont démontré que la glyco et la tauroconjugaison n'abolissent pas le pouvoir cholestatique des acides biliaires (Kakis, G. et co., 1988; Dahlstrom-King, L. et co., 1989; Yousef, I.M et co.,1992). Les acides biliaires conjugués à la taurine démontrent un taux de sécrétion maximal plus grand que les glycoconjugués (Belli, D.C. et co., 1988) ce qui facilite la sécrétion hépatique. Les acides biliaires conjugués avec la glycine ou le sulfate demeurent des agents hautement cholestatiques (Yousef, I.M. et co., 1981). Le glycolithocholique sulfaté présente une forte capacité de lier le calcium et est précipité dans les canalicules, contrairement au taurolithocholique sulfaté (Van, der Meer R. et co., 1988; Kuipers, F. et co., 1992) qui peut solubiliser les phospholipides (Carey, M.C. et co., 1979) avec une baisse de la sécrétion biliaire.

6. FLUIDITÉ MEMBRANAIRE

6.1 La membrane plasmique

La membrane cellulaire ou membrane plasmique, est une structure visqueuse, bidimensionnelle et orientée qui sépare le milieu intracellulaire du milieu extracellulaire (Smith and Wood, 1996). Elle est responsable d'une grande variété de processus biologiques, biophysiques et biochimiques. Elle joue le rôle de barrière de diffusion en contrôlant l'entrée des nutriments dans la cellule (Phillip Yeagle, 1992), le transport des molécules, la transmission de l'information permettant des interactions coordonnées des protéines membranaires et les interactions intercellulaires (Roger Marthan, 1996; Phillip, Y., 1992). Ces fonctions sont rendues possibles grâce à la structure des membranes comportant une double couche lipidique associée à des protéines membranaires extrinsèques et intrinsèques reliées entre elles par des interactions non covalentes principalement (David, W.M., 1985) (Fig. 8). Toutes les membranes biologiques, qu'elles proviennent des cellules procaryotes ou eucaryotes ont les mêmes composants chimiques, une similarité dans l'organisation structurale et un nombre de propriétés en commun. Il existe des différences majeures dans la composition des lipides spécifiques, des protéines et des carbohydrates mais pas dans l'interaction physicochimique de ces molécules (Thomas, M. Delvin 1992).

Les composants lipidiques majeurs des membranes cellulaires des eucaryotes sont principalement les phospholipides (les plus abondants: lecithine), les sphingolipides et le

cholestérol (David, W. M., 1985). Les lipides membranaires sont amphiphiles c'est-à-dire ayant une extrémité hydrophobe (constituée d'un acide gras) et une extrémité hydrophile (renfermant un phospholipide ou un glycolipide) (Fig. 8). Dans un milieu aqueux, ces molécules amphiphiles ont tendance à s'agréger en exposant leur pôle hydrophile à l'eau et en dissimulant leur pôle hydrophobe au sein de l'agrégat. La présence de cholestérol dans la membrane cellulaire stabilise la bicouche lipidique. Le noyau de cholestérol s'insère entre les parties hydrophobes proche des parties hydrophiles des lipides membranaires tel qu'observé dans la figure 9. Les phospholipides sont constitués d'un groupe phosphate lié à un alcool puis d'une molécule de lipide. Ils sont définis en fonction de l'alcool; dans le cas de la choline, ils portent le nom de phosphatidylcholine (ou lecithine, le plus abondant dans les membranes). La molécule de cholestérol, dont le noyau est formé de quatre anneaux fusionnés, confère à la membrane une structure rigide, mais son rôle dans la membrane n'est pas du tout clair quoique ses propriétés physiques aient été bien étudiées; on pense qu'il jouerait un rôle dans la croissance de la membrane et dans sa stabilisation.

Quoique ayant une partie hydrophobe, les lipides se solubilisent dans l'eau à cause de leur groupe polaire (Sol, M.G., 1992). Pour de faibles concentrations du lipide, seulement des monomères sont présents dans la solution. A mesure que la concentration augmente, il atteint un point où des micelles commencent à se former; c'est la concentration micellaire critique (CMC). La taille de la fraction hydrophobique est directement proportionnelle à la grandeur de la micelle et inversement proportionnelle au CMC (Sol, M.G., 1992).

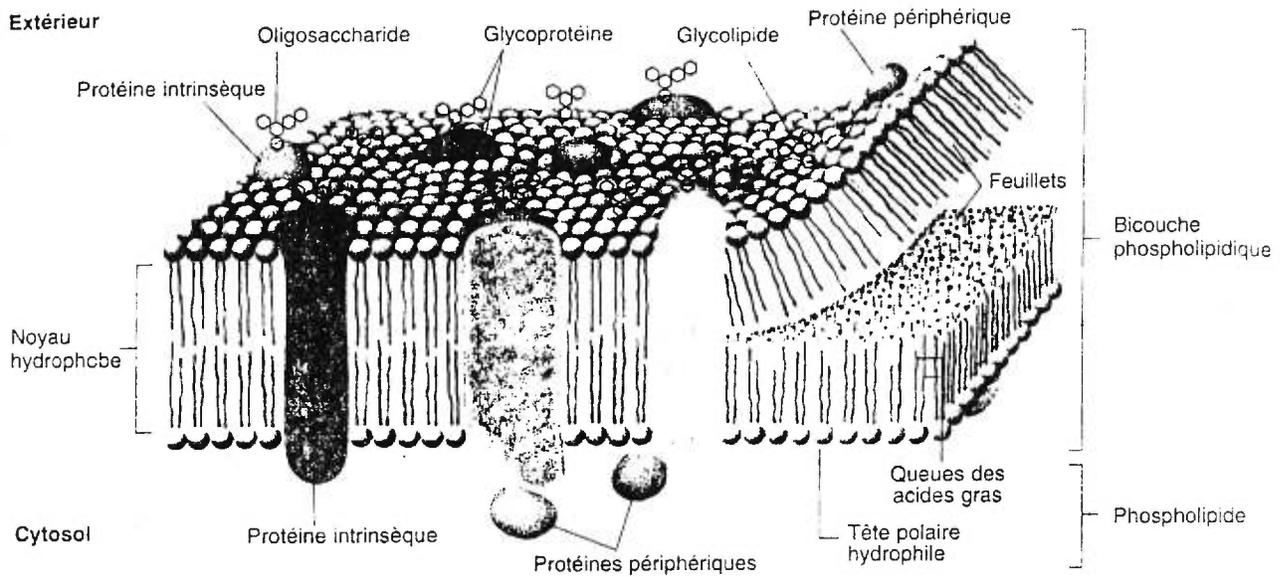


Figure 8: Schéma d'une membrane biologique montrant la bicouche phospholipidique dont les chaînes d'acides gras forment le cœur hydrophobe de la bicouche; les têtes polaires hydrophiles des phospholipides en bordent les deux faces.

Le modèle de Singer et Nicolson (1972) considère les membranes comme des solutions bidimensionnelles de lipides orientés et de protéines globulaires. La phase lipidique étant caractérisée par le terme de fluidité, un concept pauvrement défini (Shinitzky, M. and al 1979; 1984). Ce qui rend compte du fait que la membrane cellulaire n'est pas une structure figée; les lipides sont mobiles dans le plan de la membrane au sein de la double couche (Phillip, Y., 1992; Albert, B. et co., 1983) et interagissent avec les protéines et polyssacharides de façon dynamique (Alberts et co., 1983). La fluidité est généralement attribuée à la capacité des molécules de lipide membranaires de se mouvoir (Shinitzki et co., 1979; 1984; Smith et Gordon, 1987). Les molécules de lipides sont sujet à une diffusion latérale, rotationnelle et transversale (Smith, R.L. and co., 1984; Matko, J. and co., 1988). Leur structure chimique, telles la présence et la nature des groupes polaires, la longueur et la nature des chaînes hydrocarbonnées saturées ou non d'acides gras, influence leur mobilité (Israelachivili, J.N. and co., 1980).

6.2 Les membranes hépatocytaires dans la cholestase

Chez les patients atteints de pathologies cholestatiques du foie, la surface des lipoprotéines isolées sont enrichies en cholestérol et en lécithine avec une élévation du ratio Cholestérol/phospholipides et lécithine/sphingomyéline (Owen, J.S. et al., 1981; 1982; 1992). La proportion d'acides gras essentiels polyinsaturés (arachidonate) est réduite chez les patients cirrhotiques pour des raisons inconnues (Johnson, S.B. et al., 1985). Une augmentation de la concentration du méthionine circulant ainsi qu'un retard dans son

élimination ont été observé après une dose systémique dans la cirrhose chronique (Horowitz, J.H. et al., 1981). Tandis que dans une cirrhose modérée, aucune trace de méthionine n'a été trouvé suggérant sa conversion en cystéine. La première étape dans le métabolisme du méthionine est sa conversion en S-adenosyl methionine (SAME), le principal donneur de méthyl et le métabolite intermédiaire de cystéine et de glutathione. Chez le cirrhotique, il y a une baisse de l'utilisation du SAME dans le foie et une baisse de l'activité de l'enzyme phospholipide méthyl-transférase (Martin, D.A. et al., 1988; Ortiz, P. et al., 1987). Cet enzyme catalyse la méthylation séquentielle du phosphatidyléthanolamine en Phosphatidylcholine, le principal phospholipide membranaire via une voie métabolique utilisant le SAME comme donneur de méthyl. La baisse de la synthèse de phosphatidylcholine (PC) diminue la fluidité membranaire et l'activité de la $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$. La fluidité membranaire semble en partie jouer un rôle important dans les diverses fonctions de la membrane.

6.3 Facteurs influençant la fluidité membranaire

Le cholestérol, sphingomyéline et les acides gras semblent les principaux facteurs limitant la fluidité (Smith et Gordon, 1987; Reichen et Simon 1988). En général, l'élévation du contenu en cholestérol membranaire diminue la fluidité; le ratio molaire Cholestérol/Phospholipide entretient une relation inverse avec la fluidité membranaire. Comparativement au domaine sinusoidal de l'hépatocyte, le rapport molaire cholestérol/phospholipides du domaine canaliculaire est plus élevé, alors que son rapport

molaire phosphatidylcholine/sphingomyéline est bas (Meier et coll., 1984). Tenant compte de ces différences au point de vue de la composition lipidique, le domaine canaliculaire est significativement plus rigide que le domaine sinusoïdal (Schachter, 1984). Dans les cholestases induites par l'éthinyl oestradiol, une augmentation du cholestérol de la membrane plasmique hépatocytaire particulièrement sous forme estérifiée a été démontrée ainsi qu'une baisse de la fluidité membranaire (Smith et Gordon, 1984). Toutefois, le mécanisme responsable de la diminution de la fluidité membranaire dans une cholestase induite par les oestrogènes n'est pas tout à fait clair. La fluidité est diminuée pour un ratio élevé de sphingomyéline/lecithine. Le degré de saturation et la longueur des chaînes latérales d'acides gras des phospholipides sont des facteurs additionnels déterminant de la fluidité, de même que la taille et la forme des têtes polaires. Les têtes polaires de phosphatidyléthanolamine s'entassent dans de petites régions et rendent la double couche moins fluide que ne le ferait le PC (Hirata, F., Axelrod, J., 1978; 1980). La fluidité membranaire influence des enzymes importants physiologiquement tels Na^+K^+ ATP-ase (Grisham et co., 1972; Kimelberg, H.K. et co., 1974) l'adénylate cyclase (Brasitus, T.A. et co., 1980; Dipple, I., et co., 1978), module le processus de transport membranaire et le degré de perméabilité passive de la membrane (Deuticke, B., 1977; Simon, F.R. and al., 1990).

6.4 Méthodes d'évaluations de la fluidité

La mesure de l'anisotropie de fluorescence permet d'obtenir des informations sur le mouvement des fluorophores incorporé dans la membrane. L'application originale de

cette technique a pour but de mesurer la microviscosité des micelles détergentes (Schinitzky, M. et co., 1973). Le signal polarisé est hautement sensitif et les informations facilement interprétables. Cette technique convient le mieux pour déterminer les paramètres dynamiques et structurelles. Mais la sonde fluorescente, introduite dans le système membranaire peut perturber l'environnement. L'orientation et la localisation du fluorophore n'est pas toujours bien définie et l'hétérogénéité des environs de la sonde est difficile à analyser.

6.4.1 *Anisotropie de fluorescence*

Principes physiques: une courte lumière polarisée linéairement frappe une suspension isotropique de membrane contenant les molécules fluorescentes, les sondes extrinsèques ou la molécule fluorescente intrinsèquement. Seuls les fluorophores dans la membrane ayant des moments d'absorption dipolaires, approximativement parallèle à la direction de la polarisation seront absorbés. L'anisotropie de fluorescence est déterminée par les intensités d'émission à travers un analyseur orienté parallèlement et perpendiculairement à la direction de polarisation de la lumière d'excitation. Un grand nombre de molécules fluorescentes ont été utilisées comme sonde dans l'étude des membranes (Matko, J. et co., 1988).

Les sondes doivent posséder des caractéristiques bien définies tels: un coefficient d'absorption élevé, une durée de fluorescence assez longue, une différence appropriée

entre les longueurs d'onde d'émission et d'excitation, la photostabilité et la solubilité en phase liquide (Shinitzki, M. et co., 1988). La sonde la plus fréquemment utilisée est le 1,6-diphenyl-1-3-5-hexatriène (DPH) (Shinitzki, 1974). Il appartient au groupe des sondes qui s'incorporent spontanément dans les bicouches lipidiques. Son coefficient de partition entre la phase aqueuse et lipidique est élevé 1.3×10^6 tel que déterminé par Huang et Haugland (Huang, Z. et al., 1991). Cette sonde se répartit à part égale tant dans les portions solides que les domaines fluides lipidiques (Shinitzki M. et al., 1978). La photoisomérisation du DPH dans l'état non fluorescent augmente avec la baisse de la viscosité, de sorte que la fluorescence diminue significativement en majeure partie dans les parties fluides de la cellule et seules les molécules des régions les plus visqueuses resteront intactes et alors, l'anisotropie observée augmentera. Contrairement au DPH, l'anisotropie de fluorescence du 1-(4-triméthylammoniumphényl)-6-phényl-1,3,5-hexatriène (TMA-DPH) n'augmente pas avec la durée d'illumination due à la photoisomérisation puisqu'il ne rentre pas dans les compartiments lipidiques de la cellule (Illinger, D. et al., 1990). Malgré la faible solubilité du DPH et du TMA-DPH en phase aqueuse, ils sont capables de se redistribuer dans les bicouches lipidiques. La portion fluorophore du TMA-DPH est orientée perpendiculairement au plan de la bicouche (Parente, R.A. et co., 1985).

6.5 Localisation des sondes fluorescentes

Même si la sonde est dissoute dans une membrane artificielle contenant un seul composant, des problèmes peuvent survenir, sa dispersion peut ne pas être homogène. En

présence de plusieurs composants, une ségrégation latérale et/ou une asymétrie dans la distribution de la sonde dans les feuillet interne et externe de la double couche lipidique peut survenir. Au niveau cellulaire, DPH se localise presque'exclusivement dans la zone hydrocarbonée des molécules de lipides et donne des information sur le contenu lipidique total des cellules plutôt que des informations sur la structure et la dynamique des membranes plasmatiques (Collard, J.G. et al., 1978). La distribution intracellulaire du TMA-DPH est beaucoup plus favorable que le DPH (Kurhy, J.G. et al., 1985; 1983). Le TMA-DPH s'incorpore très rapidement en une minute dans la membrane plasmatique et demeure restrictivement localisé en elle pour au moins 30 minutes (Kuhry, J.G. et al., 1983). Après 30 minutes, la sonde est progressivement internalisée dans la phase fluide (Illinger, D. et al., 1990a; 1990b). Ces informations suggèrent que le temps d'incubation du TMA-DPH ne doit pas dépasser 30 minutes. Puisque TMA-DPH montre habituellement des valeurs d'anisotropie plus élevées que DPH, on suppose que ces sondes se localisent dans des régions différentes des lipides (Donner, M., et al 1990). Le DPH se localise près du centre de la bicouche lipidique (Cranney, M., et al., 1983), alors que TMA-DPH se situe près de la surface comme on l'espère par sa nature polaire. Puisque Les phospholipides chargés négativement sont localisés presque'exclusivement dans le feuillet interne, TMA-DPH devrait se lier potentiellement à la surface cytoplasmique et DPH devrait être repoussé par cette région.

7. UDCA DANS LE TRAITEMENT DES MALADIES CHOLESTATIQUES DU FOIE

L'altération du mécanisme de sécrétion biliaire est observée dans plusieurs maladies du foie. Plusieurs médicaments ont été utilisés dans le traitement des maladies cholestatiques du foie dont le S-adénosyl-L-méthionine (SAME) et l'acide ursodeoxycholique (UDC). Il a été démontré que ces deux médicaments ont amélioré les indices biochimiques et cliniques, et la cytolyse en rapport aux maladies cholestatiques du foie (Poupon, R.E., 1991; Chazouillères O. 1990). Notre intérêt portera surtout sur l'acide UDC dont nous étudierons les propriétés physico-chimiques et les mécanismes par lesquels il contrecarre les effets des acides biliaires toxiques dans les maladies cholestatiques du foie.

L'usage de l'UDCA dans la dissolution de calculs biliaires et dans le traitement de certaines maladies cholestatiques du foie remonte à plus de 20 ans (Hofmann, A.F. et al., 1987; Poupon, R.E. et al., 1991). Il a été prouvé que l'acide UDC améliore la fonction hépatique des patients atteints de cirrhose biliaire primaire (Poupon R et al 1991; Leuschner, U. et al., 1989). Plusieurs études expérimentales ont également montré son effet bénéfique dans les cholestases aiguës induites par les acides biliaires (Schölmerich, J. et co., 1990; KitaniK et co., 1982, 1990).

7.1 Synthèse et métabolisme de l'acide UDC

L'acide UDC (ou acide 3α - 7β -dihydroxy- 5β -cholanique) est un acide biliaire tertiaire

naturel formé par épimérisation bactérienne du groupe hydroxyle de l'acide CDC en position 7 dans le colon (Setoguchi, T. et al 1984; Hirano, S., 1981). Cet acide biliaire hydrophile se retrouve chez l'homme à de très faibles concentrations (Leuschner, U. et al., 1990; Heller, F.R., et al., 1990), soit 5 % de la quantité totale des acides biliaires (Hirano S. et al 1981). L'absorption de IUDC et de ses conjugués est lente, incomplète; elle se réalise sous forme protonée le long du jéjunum et de l'iléon (30 à 60% de la dose orale) (Stiehl, A. et al., 1988) et 20% dans le colon (Mekhjian, H.S. et co., 1979) par diffusion passive non ionique. Il circule dans la veine porte, lié à l'albumine à 99%. Il est efficacement conjugué durant son transport hépatique et sécrété dans la bile en majeure partie sous forme glycoconjuguée (Rudolph, G. et al., 1991). Après administration à long terme, l'UDCA s'accumule dans le pool des acides biliaires principalement sous forme de ses métabolites hépatiques glyco et tauroursodeoxycholiques qui sont vraisemblablement les composés pharmacologiquement actifs (Aldo Roda et al 1996).

Le métabolisme de la forme conjuguée dans la portion distale de l'intestin grêle se fait par déconjugaison puis par deshydroxylation en acide lithocholique par la flore microbienne (Hofmann AF. 1994). Les formes glyco et tauroconjuguées de l'acide UDC subissent une déconjugaison incomplète au niveau distal du petit intestin suivi de l'absorption passive de la forme non conjuguée qui est alors reconjuguée dans le foie. Une telle circulation induit chez l'humain un flux riche en HCO_3^- . Le produit non conjugué est éliminé dans les selles. L'UDC est spécifiquement éliminé dans les selles du fait d'une part de sa forte affinité pour l'albumine et d'autre part d'une réabsorption tubulaire rénale.

7.2 Propriétés de l'acide UDC

L'UDC exerce une tension plus faible au niveau des membranes que les acides biliaires hydrophobes; il tend à diffuser le moins dans les membranes et à dissoudre les lipides membranaires (Quist, R. et co 1989; Salvioli, G. et co., 1984), il est donc moins toxique pour les hépatocytes isolés (Galle, P.R. et co., 1989; Schmucker, D.L. et co., 1988). L'acide tauro UDC est considérablement plus polaire que la forme non conjuguée et par conséquent devrait être plus efficace comme agent thérapeutique. Des études in vitro et in vivo ont démontré que l'acide TUDC exerce un effet cytoprotecteur supérieur à son homologue dans les dommages causés par les acides biliaires toxiques (Kitani K et co 1985; Heuman DM. et co 1994).

7.3 Effets neutralisants de l'acide UDC

Étant un acide biliaire hydrophile non toxique (Hofmann, A.F., 1987), l'usage de l'acide UDC reposait sur l'hypothèse qu'il peut avantageusement remplacer les acides biliaires endogènes hépatotoxiques (Fisher DC. 1974; Scholmerich J. et al 1984). L'affinité des sels biliaires pour les membranes de phospholipides va de pair avec leur hydrophobicité. UDC a une faible affinité pour les membranes et n'est pas efficace pour déplacer les sels biliaires hydrophobiques dans la membrane; donc il peut former des micelles mixtes avec une hydrophobicité réduite dans l'environnement

membranaire (Güldütuna, S., 1993a; Igimi, H. et co., 1980). Ces micelles mixtes contenant de UDC étant moins hydrophobiques que les micelles dépourvues d'UDC. L'incubation d'érythrocytes ou de membranes hépatocytaires isolés dans des solutions mixtes de 0.5 ou 1 μ mol d'acide UDC et de 1 μ mol de CDC empêche les dommages membranaires (Güldütuna, S., 1993; Igimi H et co 1980). Chez les patients traités avec UDC et dont le pourcentage représente 50% des acides biliaires totaux, un des mécanismes de protection pourrait être la neutralisation des acides biliaires hydrophobiques (Güldütuna, et co., 1993).

7.3.1 Diminution de l'hydrophobicité des acides biliaires endogènes

L'UDC favorise un accroissement de l'index hydrophile du pool des acides biliaires et diminue ainsi la toxicité globale des acides biliaires; il provoquerait une dilution ou un remplacement direct partiel des acides biliaires endogènes diminuant ainsi leur concentration présumée toxique au niveau de l'hépatocyte (Poupon et coll., 1987; Hofmann et Popper, 1987). TUDC semble entrer en compétition avec les acides biliaires endogènes pour leur réabsorption iléale intestinale (Yoon, Y.B. et co., 1986; Stiehl, et coll., 1990; Keelan et Thompson, 1991). L'activité du transporteur intestinal des acides biliaires semble près de son taux de saturation en condition physiologique normale chez l'homme (Hofmann, 1990). Un accroissement de la disponibilité intestinale des acides biliaires devait favoriser une compétition entre ces derniers pour leur réabsorption active. TUDC est absorbé préférentiellement à l'acide cholique ce qui explique la diminution de ce dernier dans le traitement à l'UDC. Le supplément d'acides biliaire apporté à

l'organisme est conjugué normalement dans le foie, sécrété dans la bile puis réabsorbé dans le foie via la circulation entérohépatique. Le but visé dans ce traitement est d'abord la suppression du cholestérol 7- α -hydroxylase en vue de réduire la biosynthèse des intermédiaires toxiques des acides biliaires (Hofmann A.F. et Fromm H 1996) et ensuite de restaurer la circulation entérohépatique ce qui vise à supprimer le 7- α -hydroxylase, l'enzyme limitant la biosynthèse des acides biliaires, supprimant ainsi la biosynthèse des acides biliaires toxique (Setchell, K.D.R., 1991).

7.3.2 Action sur la sécrétion des acides biliaires

L'UDCA augmente la conversion du cholestérol en acide biliaire dans la cholestase chronique (Beuers, U. et al., 1992; Rudolph, G. et al., 1993; Mazella, G. et al., 1993), mais la concentration sérique des acides biliaires n'augmente pas lors d'un traitement par l'UDC (Crosignani, A. et al., 1991). Au contraire, le déficit d'excrétion des acides biliaires vers la bile est amélioré (Jazrawi, R.P. et al., 1994).

Les acides biliaires induisent une sécrétion biliaire par effet osmotique. Chez le rat, l'UDC non conjugué peut induire une cholérèse plus importante que celle attendue quand il est délivré à haut débit (Dumont, M. et al., 1980). Cette cholérèse, dont le mécanisme n'est pas encore établi, est associée à une hypersécrétion de HCO_3^- . Cet effet est aboli quand l'UDC est conjugué à la taurine ou à la glycine (Erlinger, S., 1990). On pense à un système d'échange Na^+/H^+ stimulé par l'UDC (Dumont, M. et al., 1980;

Renner, E.L. et al., 1989) ou à l'hypothèse du shunt choléhépatique; (Yoon, Y.B. et co., 1986), donc l'UDCA serait sécrété dans le canalicule sous forme non conjuguée puis transformé sous forme protonée dans la lumière biliaire. Cette forme protonée liposoluble serait réabsorbée par l'épithélium biliaire vers le plexus vésiculaire péribiliare et retournerait au foie afin d'être à nouveau excrété dans la bile. Le proton est fourni par dissociation de l'acide carbonique, ce qui génère un ion bicarbonate à chaque cycle. Cet ion bicarbonate induit une cholérèse par effet osmotique alors que l'urso réabsorbé n'apparaît pas dans la bile (Yoon, Y.B. et al., 1986). L'infusion de l'acide UDC sous forme libre favorise une hypercholérèse qui n'est pas trouvée lors du même traitement avec l'acide TUDC (Kitani et Kanai, 1982a). Ce processus pourrait permettre de diminuer la viscosité de la bile (Kitani 1990).

7.3.3 Accroissement de la sécrétion canaliculaire des composés cholestatiques

Le TUDC stimule la sécrétion canaliculaire des acides biliaires cholestatiques par un mécanisme imprécis; la captation hépatique de ces derniers n'est pas pourtant affectée (Kitani, et Kanai, 1982b). L'acide UDC semble favoriser une diminution de la disponibilité hépatique des agents cholestatiques. Cet accroissement de la sécrétion des composés cholestatiques n'apparaît pas nécessaire à l'effet protecteur d'UDC. En diminuant le ratio molaire d'infusion d'UDC (un TUDC/quatre TCDC), Kitani et coll., (1990) ont démontré une amélioration de la cholestase induite par TCDC sans modification importante de son taux de sécrétion canaliculaire.

7.3.4 Augmentation du métabolisme de l'agent toxique

Dans la cholestase induite le TLC, l'acide tauroursodeoxycholique favoriserait le métabolisme intracellulaire et l'excrétion du TLC (Scholmerich et coll., 1990). Une modification de la compartimentalisation cellulaire de l'acide TLC ou un changement de disponibilité de protéines pouvant agir pour métaboliser ce dernier pourraient être à l'origine de cette hypothèse. En général, la stimulation de la formation de métabolites moins toxiques pourrait favoriser la protection observée avec UDC.

7.4 Effet cytoprotecteur

Certaines études ont démontré que l'UDCA était capable de renverser ou de prévenir les dommages induites par les acides biliaires endogènes in vitro et chez des animaux modèles (Scholmerich, J., 1984; Kitani, K. et al., 1985). In vitro, l'UDCA prévient la rupture des membranes canaliculaires observée dans les pathologies cholestatiques causés par les acides biliaires hydrophobiques (Heuman, D. et al., 1991; Galle et co., 1990), il réduit l'hémolyse induite par les acides biliaires et prévient les lésions hépatocytaires induites par CDCA (Tanikawa, K. et al., 1986). Des études faites sur les hépatocytes de hamster ont montré que UDC stabilise la membrane cellulaire en se liant aux structures de la membrane (Malavolti, M. et co., 1987; Bouscarel, B. et co., 1991; Güldütuna, S. et co., 1993), Il réduit la solubilisation micellaire induite par les acides biliaires plus hydrophobes (Heuman, D., 1993). Cela a été démontré in vitro sur des modèles

vésiculaires riches en cholestérol (Heuman, D. et al., 1994), sur des cultures d'hépatocytes humains (Galle, P.R., et al., 1990) et in vivo chez l'animal (Vadakekalam, J. et al., 1992). Ohiwa, T. et al., (1993) ont démontré que l'acide TUDC induisait une baisse de la concentration intracellulaire d'acides biliaires toxiques. Le mécanisme de cette protection membranaire est mal connu mais pourrait résider dans la polarité de la membrane cellulaire (Güldütuna, S. et al., 1993). En agissant sur la membrane, UDCA faciliterait l'élimination des molécules hydrophobes responsables de la cholestase par accumulation intramembranaire (Kallinowski, B. et al., 1991; Reshef R et al 1994).

TUDCA s'incorpore à la membrane et peut modifier la composition ou l'orientation spatiale des lipides membranaires (Borus et Fromm, 1991). En s'incorporant dans la membrane, il compétitionnerait en bloquant l'accès des acides biliaires hydrophobes dans les couches lipidiques. Des travaux sur des membranes isolées démontrent qu'UDCA prévient effectivement la diminution de la fluidité induite par l'acide deoxycholique (Leuschner et Kurtz, 1990).

Il est difficile de déterminer les sites d'action intracellulaire d'UDC dans les pathologies cholestatiques dont la cause demeure inconnue. L'interaction de l'acide UDC avec diverses organelle intracellulaires demeure probable et des modifications dans la structure ou les fonctions de ces dernières sont aussi un mécanisme proposé pour expliquer l'action protectrice ou préventive de l'acide UDC (Borus et Fromm, 1991). L'absence de cytotoxicité de l'UDCA ou de ses conjugués vient du fait qu'il est moins active en surface et que même au-dessus du CMC, il induit une dissolution peu marquée de lipides

membranaires (Quist, R.G. et al., 1991).

7.4.1 Préservation de la fonction membranaire

L'acide UDC peut se lier aux membranes (Güldütuna, S. et co., 1993; Bajaj, R et co., 1993) malgré son faible affinité pour ces dernières (Schubert, R. et co., 1986). Il semble s'incorporer dans le domaine apolaire profond des membranes riches en phospholipides et peut avoir une fonction similiaire au cholestérol (Güldütuna, S. et co., 1994) réduisant ainsi la toxicité des AB en neutralisant les acides biliaires toxiques. Le noyau stéroïde de l'UDCA est probablement localisé à la même position que celui du cholestérol, ce qui suggère que UDCA pourrait stabiliser les membranes de la même façon que le cholestérol. L'UDCA semble s'incorporer dans les membranes au même site que l'acide CDC exerce ses dommages (Fig. 9).

L'UDCA protège contre la destruction des microfilaments situés dans l'environnement des canalicules biliaires (Thibault, N. et co., 1993). Ces microfilaments jouent un rôle important dans le fonctionnement des microvilli. L'acide UDC possède un faible pouvoir détergent sur les composants lipidiques des organelles, ce qui préserve le transport intracellulaire même dans des conditions de dysfonctionnement microtubulaire (Kitani, K. et co., 1982).

7.5 Effet sur le métabolisme cellulaire

La mobilisation transmembranaire du Ca^{++} extracellulaire est altérée lors de la cholestase (Beuers, U. et al., 1993). L'augmentation du Ca^{++} libre cytosolique, conséquence du déficit en ATP (Spivey, J.R. et al., 1993) précède l'apparition des anomalies morphologiques observées dans la cholestase (Anwer, S. et al., 1988) et la mort cellulaire (Nishikawa, Y. et al., 1994). L'acide UDC augmente le Ca^{++} intracellulaire de façon dose dépendante (Bouscarel, B. et al., 1993). L'acide UDC affecte le signal de transduction en mobilisant le Ca^{++} intracellulaire à des concentrations physiologiques (Bouscarel, B. et co., 1993; Beuers, U. et co., 1993).

7.6 Expérience clinique

Beaucoup d'études ont démontré que UDCA réduit la nécrose cellulaire et la cholestase hépatique et améliore les symptômes chez les patients atteints de maladie cholestatique du foie (Poupon, R.E et al., 1991; Calmus, Y. et Poupon, R. 1991) tels qu'évalué par le profil de marqueurs de cytotoxicité et de cholestase (Colombo, C. et co., 1992; Poupon, R.E. et co., 1994; Vuoristo, M. et co., 1995). Plusieurs études ont examiné le potentiel curatif de l'acide UDC dans diverses pathologies cholestatiques (Poupon et coll., 1987) démontrant que son usage prolongé pendant quelques mois améliore le profil des marqueurs de lyse cellulaire et de cholestase (transaminases sériques, phosphatase alcaline, gamma-glutamyl-tranférance) (Osuga, T. et co., 1989). De plus, certains symptômes

cliniques liés à la cholestase tel le prurit semble être amélioré (Matsuzaki, 1990).

Le manque actuel de traitement efficace pour les pathologies cholestatiques fait qu'on accorde une importance clinique particulière à l'usage de l'acide UDC (Guslandi, 1990). Perdigoto et Wiesner (1992) suggèrent que les effets bénéfiques (symptomatiques, biochimiques ou histologiques) ne sont plus apparents après un à deux ans de traitement. Le potentiel de l'acide UDC sur la cholestase intrahépatique chez l'homme demeure obscur.

7.7 Effet immunologique

Dans la cholestase, on observe une augmentation de l'expression antigénique de la classe I (HLA) des hépatocytes et de la classe II de l'épithélium biliaire. Les antigènes de classe II sont les cibles pour les dommages cellulaires des cellules T cytotoxiques (Pape, G.R. et co., 1990). L'expression antigénique de classe I joue aussi un rôle dans la cytotoxicité. Calmus Y. et co (1990) ont trouvé que l'expression aberrante d'antigène de classe I dans les hépatocytes est réduite après le traitement avec l'acide UDC, ce qui témoigne de son action bénéfique du point de vue immunologique (Lacaille, F. et co., 1993). On a aussi rapporté que l'UDCA diminue ou altère l'expression des antigènes HLA sur les membranes hépatiques chez les patients souffrant de cirrhose biliaire primitive et de cholangite sclérosante primaire (Terasaki, S. et co., 1991; Leuschner, U. et co., 1991; Calmus Y et co 1990).

7.8 Effets comparatifs des autres acides biliaires

D'autres acides biliaires tels ceux formant des micelles, lorsqu'ils sont administrés à dose non toxique, peuvent prévenir le développement de la cholestase induite expérimentalement (Kitani et Kanai, 1983). Ces acides biliaires semblent accroître la sécrétion biliaire des agents cholestatiques. Les travaux d'Utili et coll (1990) ont démontré que l'acide TC possède un potentiel supérieur à l'acide TUDC, en favorisant la correction du flux biliaire à une dose beaucoup plus faible. Cependant, à un taux d'infusion cholérétique, l'acide TC démontre des signes de toxicités alors que l'acide TUDC, à un taux d'infusion excédant le taux de sécrétion maximal, n'entraîne aucun signe de toxicité.

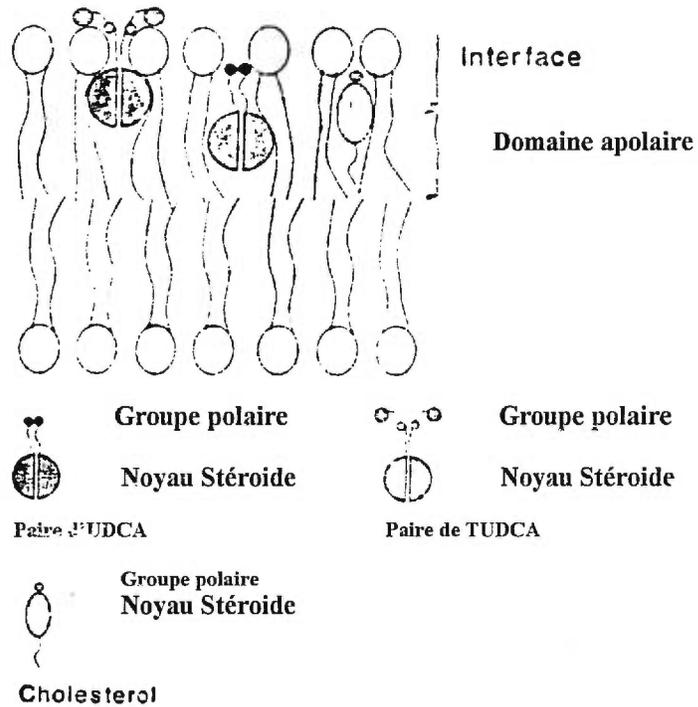


Figure 9. Localisation de UDCA et TUDCA dans une membrane phospholipidique. UDCA est situé au même domaine que le cholestérol, tandis que TUDCA garde ses chaînes latérales sur la surface de la membrane (Güldütuna S et al 1993)

8. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les effets thérapeutiques de l'UDCA et de ses conjugués ont été largement étudiés dans les pathologies cholestatiques. Les connaissances acquises sur ses mécanismes d'action sont très limitées. Il apparaît difficile de déterminer si le potentiel de l'UDCA se borne aux interactions avec les acides biliaires endogènes ou peut s'élargir aux perturbations membranaires observées dans les modèles expérimentaux. Il a été suggéré que l'effet de l'UDCA était en rapport avec la protection qu'il confère aux membranes cellulaires. L'objectif de cette étude est de tester cette hypothèse *in vitro* et *ex vivo* en comparant d'une part, l'effet détergent de l'acide taurooursodeoxycholique, un acide biliaire hydrophile, avec l'acide taurodeoxycholique (un acide biliaire hydrophobe) et l'acide taurocholique (un acide biliaire hydrophile comme l'UDCA); et d'autre part en examinant l'effet de ces acides biliaires sur la fluidité membranaire des cellules du foie de rat.

9. MATERIELS ET METHODES

9.1 Études in vitro

Le modèle consiste d'un système de microfiltres (Micron Separations Inc., Westboro, MA) . Ces microfiltres sont décrits comme étant biologiquement inertes, compatibles aux produits chimiques et idéals pour analyser des cellules, des bactéries, des protéines et l'amiante. Ils sont transparents et comportent une surface lisse munis de pores cylindriques contrôlés avec une grande précision. . Ces microfiltres mesurent 25mm de diamètre et possèdent des pores de $0,45\mu\text{m}$ de diamètre; la densité des pores est de 1×10^8 pores/cm². Ils ont une épaisseur de $10\mu\text{m} \pm 5\%$, une force extensible supérieur à 20685kPa et peuvent être utilisés dans l'autoclave à une température stable de 110°C. Ils sont trempés dans l'éthanol (éthyl alcool) pendant 15 minutes, séchés à la température de la pièce pendant 15 minutes puis pesés. Ils sont ensuite placés dans une solution de phospholipide radioactive composée de 1,0g de phosphatidylcholine (PC) dissous dans 8,3 ml d'éthanol à laquelle on ajoute 0,1ml ($5\mu\text{Ci}$) de PC marqué au C¹⁴ (activité spécifique: 158,0 mCi/mmol). Les membranes sont placées dans cette solution, tout en étant légèrement agitées pendant 30 minutes; elles sont ensuite enlevées puis immergées trois fois dans l'eau distillée afin d'enlever les particules de phospholipides non incorporés dans les pores des filtres. Elles sont à nouveau séchées à la température de la pièce puis pesées. La concentration de 120 mg/ml a été retenue parce que en utilisant des solutions PC à des concentrations graduelles, on a observé que les membranes sont saturées de PC à partir de cette concentration. Les sels de sodium de TUDCA, TCA et TDCA (Sigma, St

Louis, MO) ont été dissous dans une solution de chlorure de sodium physiologique NaCl 0,9%. Ces acides biliaires ont été utilisés parce qu'ils se différencient grandement au point de vue de leur hydrophobicité. Pour chacun de ces acides biliaires, trois concentrations furent préparées: 1 μ mole/2ml, 2 μ moles/2ml, 4 μ moles/2ml. Chaque membrane, imprégnée de PC, était placée dans un support pour filtre dans lequel on faisait passer chacune des préparations de sels biliaires contenues dans une seringue de 10ml. La seringue est reliée à une pompe qui exerce une pression sur le piston permettant de recueillir un infiltrat de 2ml/10minutes. Le liquide perfusé est collecté dans des vials chaque deux minutes tel qu'illustré (fig.10). Après 10 minutes d'infusion, les filtres sont enlevés du support, trempés trois fois pendant 5 minutes dans l'eau distillée afin d'enlever les particules d'acides biliaires qui sont restés accolés aux membranes durant l'infusion, puis séchées à la température de la pièce pendant 15 minutes. Elles sont ensuite pesées puis conservées dans des vials. Six expériences ont été réalisées pour chaque concentration d'acide biliaire. Du liquide à scintillation (Amersham Corporation, Arlington Heights, Illinois) (15 ml) est ajouté à chaque échantillon et la radioactivité de tous les filtrats et des filtres a été déterminée au compteur de scintillation radioactif. La radioactivité de certaines quantités connues (nmoles) de phosphatidylcholine a été exprimée en compte par minute (CPM1). La radioactivité de base du liquide à scintillation a été soustraite de chaque échantillon. Le rapport CPM/nmoles a été de 8.61 ± 0.68 SD (N=5). Pour chaque concentration d'acide biliaire, l'expérience a été conduite 6 fois. La quantité de PL dissous contenu dans chaque filtrat est obtenue en divisant le CPM1 de chaque filtrat par 8.61.

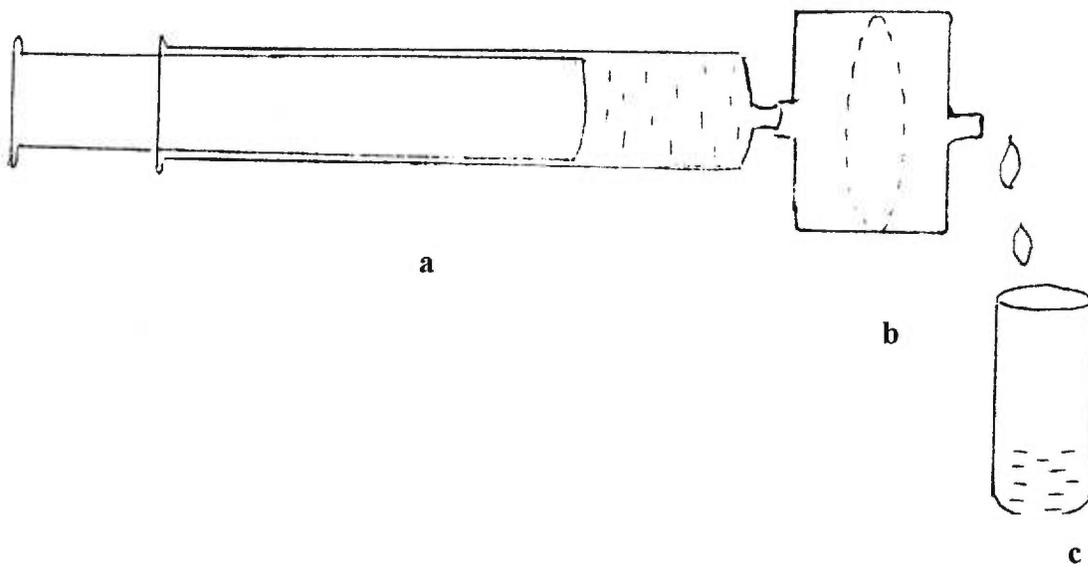


Figure 10. Système de la perfusion

a: Seringue de 10 ml, contenant la solution d'acide biliaire, actionnée par une pompe permettant d'obtenir un filtrat de 2 ml/10 minutes. b: support contenant la membrane imprégnée de PC. c: tube recueillant le filtrat

9.2 Etudes ex vivo

9.2.1 Isolement des membranes plasmatiques et canaliculaires

Des membranes plasmatiques et canaliculaires de foie étaient isolées afin de tester l'effet de TUDCA et d'autres acides biliaires (TDCA et TCA) sur la fluidité des membranes. Des rats mâles de souche Sprague-Dawley (Charles River, St Constant, Québec, Canada) pesant $238.25\text{g} \pm 17.825$ et dont le poids du foie varie entre 9,86 et 11,72g sont utilisés dans cette étude. Les membranes plasmatiques et les fractions enrichies en structures canaliculaires étaient préparées selon les méthodes décrites dans notre laboratoire (Yousef et al 1987; Vu D.D et al 1992). Cette méthode procède par gradient de sucrose discontinu. Le foie est brièvement perfusé à l'aide d'une solution saline (0.9%) et homogénéisé au Polytron (à froid) à vitesse maximale pendant 5 secondes après addition d'une solution tampon de NaHCO_3 1mM (pH 7.4) dans un volume correspondant à deux fois celui du foie. L'homogénat est ajusté à l'aide de la même solution tampon à un volume final de 100 ml qui est mélangé lentement puis partagé dans des tubes de 50 ml et centrifugé à 380 rpm pendant 5 minutes afin de séparer les débris cellulaires. Le surnageant est recueilli et dilué à l'aide de la solution tampon dans des tubes de 50 ml puis centrifugé à 2459 rpm pendant 10 minutes. Cette dernière étape est reprise à nouveau, et les culots sont recueillis puis dilués dans un volume final de 10 ml de tampon bicarbonate. Cette suspension membranaire est complétée à 47 ml avec une solution de sucrose de densité: 1.26. L'ultracentrifugation nécessite l'usage de tubes dit de Beckman; trois tubes par foie. Dans ces tubes, on met 5 ml de tampon bicarbonate 1mM puis, à l'aide d'une seringue #15 on dépose au fond du tube 10ml de sucrose $d=1.18(484,5\text{mg/ml})$ et toujours

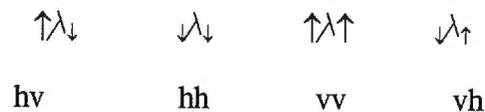
de la même façon, par le fond du tube, 15 ml de la suspension cellulaire-sucrose $d=1.26$ est ajoutée. Trois phases distinctes sont ainsi obtenues. Les tubes sont ultracentrifugés à 25000 rpm dans un rotor 50.2 ti pendant 60 min, les membranes hépatiques sont séparées en deux fractions: une fraction enrichie en canalicules biliaires (BCM) s'aperçoit aux premières interfaces 1:18 et 1.00; l'autre fraction enrichie de membranes sinusoidales plamatiques (PM) est à l'interface 1.26-1.18. Les PM et les BCM sont recueillies dans des tube de 50ml, le volume est complété avec une deuxième solution tampon bicarbonate-calcium 1mM-CaCl₂ 0,5 mM et centrifugé à 4000 rpm pendant 25 minutes. La même opération est répétée avec le culot et centrifugé pendant 20 minutes. Le surnageant est enlevé, les culots sont défaits et resuspendus dans 1.5 ml de tampon bicarbonate-calcium, puis séparés en aliquots de 0.5 ml et congelés à -80 °C jusqu'à utilisation.

Les études effectuées antérieurement dans notre laboratoire (Yousef IM et Tuchweber B 1984) démontrent que le rendement des fractions PM est de 0.2mg de protéine/g de foie et pour BCM 0.9mg de protéine/g de foie; un contenu de 0.7 μ mole de phospholipides par mg de protéine a été trouvé. En nous basant sur ces données, nous avons prélevé des quantités de PM et de BCM dont le contenu en phospholipides correspondait à la quantité renfermée dans nos membranes artificielles (Voir les résultats). Les échantillons de PC, de PM et BCM sont mélangés avec les acides biliaires taurocholique (TCA), taurodeoxycholique (TDCA) et tauroursodeoxycholique (TUDCA) aux concentrations de 1, 2 et 4 μ moles contenus dans 2 ml de NaCl physiologique 0.9 % respectivement. Deux tubes de verre de 12 x 100mm sont prévus par échantillon selon le protocole du Dr Tuchweber 1994. Dans le tube 1, on ajoute à l'échantillon 1.5 ml du

tampon tris-HCl 50mM-pH 7.5, puis 1.494ml de la solution tampon phosphate (PBS) 0.15M pH 7.2 et enfin 6 μ l de TMA-DPH, le tout est mélangé vigoureusement. Les tubes réservés aux blancs contiennent 2 ml de NaCl 0.9%, 1.5 ml du tampon tris-HCl, 1.495ml de PBS+6 μ l de TMA-DPH. Toute l'expérience se réalise à l'abri de la lumière avec les tubes dans de la glace, les tubes sont préchauffés pendant 5-10 minutes, puis incubés pendant 5 minutes à 37°C avant d'être lus. Les lectures sont obtenues à l'aide du Spectrofluoromètre Shimadzu (RF-540) avec polarisateur avec une longueur d'onde d'excitation était de 350 nm, et de la longueur d'onde d'émission de 426 nm. Six lectures ont été obtenus pour chacun des échantillons dans le spectrofluoromètre.

9.3 Techniques de mesures

La dépolarisation de la lumière émise peut être déterminée comme le ratio des intensités de fluorescence passant à travers l'analyseur en position verticale I_{vv} et horizontale I_{vh} tenant compte du polariseur d'excitation. A côté du polariseur et de l'excitateur, d'autres éléments optiques essentiels au spectrofluoromètre tels lentilles, filtres pourraient avoir quelque effet dépolarisant méritant d'être retenu comme le facteur de correction g qui est déterminé en mesurant les intensités d'émission verticale et horizontale durant l'excitation avec la lumière polarisée horizontalement c'est-à-dire I_{hv} et I_{hh} .



Le facteur de correction g est donné par: hv/hh et l'intensité I est calculé de la façon suivante $vv/(vh \times g)$. L'anisotropie qui est une mesure de la fluorescence s'obtient à partir de ce rapport: $(I-1)/(I+2)$.

10. RÉSULTATS

10.1 Incorporation de PC au niveau des filtres en fonction de la concentration de la solution

La quantité de phosphatidylcholine (PC) qui s'incorpore dans les filtres est proportionnelle à la concentration du PC en solution. Déterminé par le poids, on a observé une augmentation croissante de PC par filtre pour les concentrations de PC allant de 5mg/ml à 120mg/ml. Les filtres deviennent saturés pour les concentrations de PC entre 120 et 160mg/ml et la quantité de PC incorporée se trouvait autour de 700 nmoles (tableau I; Figure 11). Déterminée par radioactivité, la quantité moyenne de phosphatidylcholine (PC) incorporée par filtre est en moyenne $356,13 \pm 43,02$ nmoles.

10.2 Évaluation du pouvoir détergent des acides biliaires sur PC au niveau des filtres

Le tableau II (a,b,c) représente la quantité de PC dissous (en nmoles) dans chacune des membranes artificielles. Le tableau III (a,b,c) représente les pourcentage de PC dissous par rapport au PC total contenu dans les membranes.

Tableau I

Quantité de PC incorporé dans les membranes artificielles

PC en solution mg/ml	PC dans les membranes mg	nmoles
5	0.04 \pm 0.014	53
10	0.05 \pm 0.015	70
20	0.10 \pm 0.018	130
40	0.24 \pm 0.021	313
60	0.26 \pm 0.04	346
80	0.28 \pm 0.023	366
100	0.39 \pm 0.07	520
120	0.54 \pm 0.063	720
140	0.52 \pm 0.021	693
160	0.54 \pm 0.023	720

Notes: moyenne \pm écart-type de 3 échantillons

PC est dilué dans éthyl alcool(éthanol)

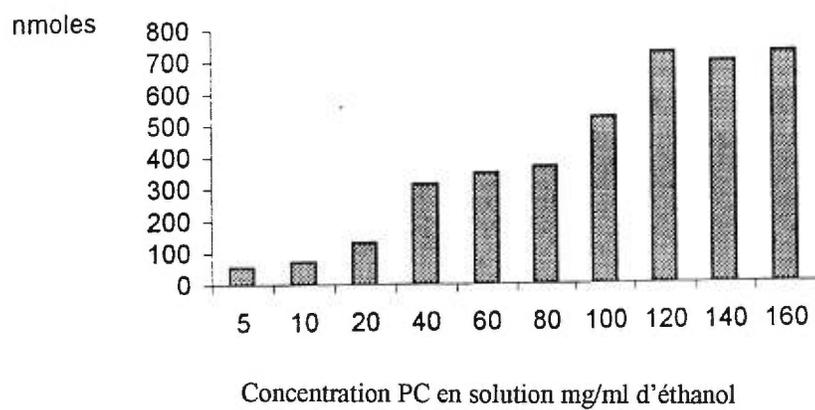


Figure 11. Quantité de PC incorporé dans les membranes artificielles en fonction de la concentration du PC.

10.2.1 Effet des acides biliaires à 1 μ mole

À la concentration de 1 μ mole, l'acide tauroursodeoxycholique (TUDCA) solubilise un pourcentage de $4.48 \pm 2.05\%$ de PC à 2 minutes de la perfusion. Ce pourcentage diminue progressivement jusqu'à 10 minutes à $1.44\% \pm 0.69$. L'acide taurocholique (TCA) à 2 minutes solubilisent $5.03\% \pm 1.32$; cette valeur décroît au fur et à mesure à $1.77\% \pm 0.80$ à la fin de la perfusion. A cette concentration, il n'y a pas de différence entre les effets de TUDCA et TCA. L'acide taurodeoxycholique (TDCA) solubilise encore plus de PC à 2 minutes $8.26\% \pm 3.16\%$ que TCA et TUDCA; la dissolution diminue à $4.35\% \pm 0.84$ à 10 minutes. Il a été trouvé que ces différences sont statistiquement différents ($p < 0.05$) (figure 12 a).

10.2.2 Action des acides biliaires à 2 μ moles

À cette concentration, les acides biliaires suivent le même profil de dissolution que précédemment. TUDCA à 2 minutes solubilise $6.90 \pm 2.86\%$ de PC (moins que TCA: $8.15 \pm 2.17\%$) et à 10 minutes $1.76 \pm 0.67\%$ (TCA: $2.81 \pm 1.02\%$). TDCA solubilise encore plus de PC à 2 minutes $12.08 \pm 3.16\%$ et à 10 minutes $7.06 \pm 1.93\%$ que TUDCA et TCA durant ces mêmes périodes; ces différences sont statistiquement différents ($p < 0.05$) (figure 12b).

10.2.3 Action des acides biliaires à 4 μ moles

Avec les acides Taurocholique (TCA) et Tauroursodeoxycholique (TUDCA), la

plus grande quantité de PC libérée a été observée quand la perfusion a été pratiquée à 4 μ moles et à 2 minutes: (12,75 \pm 2.81% pour TCA, 9,69 \pm 2.18% pour TUDCA) et la plus petite valeur à 2 minutes a été perçue pour 1 μ mole/2ml: 5,02 \pm 1.34% pour TCA et 4.48 \pm 2.05% pour TUDCA. Pour chacune de ces trois infusions, la quantité dissoute à 2 minutes pour TCA était significativement différente ($p < 0.05$) de celle des autres périodes qui n'acusent différence entre elles ; de son côté, le TUDCA suit le même profil montrant une différence significative pour la valeur obtenue à 2 minutes, celles obtenues à 4, 6, 8 et 10 minutes étaient similaires. Le pourcentage de PC dissous le plus élevé a été obtenu avec TDCA à 4 μ moles et aux deux premières minutes de la perfusion 16.33 \pm 3.31%; le pourcentage dissous reste inchangé de 6 à 10 minutes (figure 13a).

En général, il a été observé que le pourcentage de PC dissous dans les membranes artificielles est en relation à la concentration des acides biliaires. La quantité de PC dissoute est élevée durant les deux premières minutes et décroît progressivement jusqu'à la fin de la perfusion pour TCA et TUDCA; tandis qu'avec TDCA, à partir de 4 minutes, le pourcentage de PC dissous semble être maintenu et diminue peu (figure 13b) (figure 15a, b et c). Considérant les trois concentrations de TDCA, on a observé que la quantité de PC dissoute après 2 minutes était significativement différent ($p < 0.05$) de celles obtenues durant les minutes qui suivent.; tandis qu'à 4 μ moles, on a obtenu une dissolution linéaire durant toute la perfusion . A 2 μ moles, le pourcentage de PC dissous à 2 et 4 minutes ne varie pas.

Tableau II

Quantité de PC dissous dans les membranes artificielles en fonction de la durée de la perfusion (valeurs en nmoles)

a

	2 minutes	4 minutes	6 minutes	8 minutes	10minutes	total
TCA 1 μ mole	18.37 \pm 4.58	11.50 \pm 3.72	8.25 \pm 1.77	6.34 \pm 2.15	5.75 \pm 2.80	50.21
TCA 2 μ moles	25.42 \pm 9.11	14.35 \pm 4.76	10.38 \pm 3.98	8.15 \pm 3.28	7.14 \pm 3.3	65.44
TCA 4 μ moles	47.84 \pm 9.92	31.87 \pm 7.7	25.23 \pm 5.7	19.47 \pm 3.7	16.68 \pm 2.23	141.09

b

	2 minutes	4 minutes	6 minutes	8 minutes	10minutes	total
TUDCA 1 μ mole	14.06 \pm 6.07	9.61 \pm 3.95	6.55 \pm 3.09	5.22 \pm 2.03	4.22 \pm 1.98	39.66
TUDCA 2 μ moles	22.66 \pm 9.5	11.29 \pm 2.74	9.24 \pm 2.31	6.61 \pm 2.48	4.81 \pm 1.75	54.61
TUDCA 4 μ moles	39.13 \pm 11.17	29.93 \pm 1.32	18.21 \pm 3.68	15.27 \pm 3.37	10.43 \pm 3.07	111.74

c

	2 minutes	4 minutes	6 minutes	8 minutes	10minutes	total
TDCA 1 μ mole	34.22 \pm 16.57	21.54 \pm 8.93	19.89 \pm 6.65	16.03 \pm 5.48	14.01 \pm 3.68	105.69
TDCA 2 μ moles	50.04 \pm 9.55	39.34 \pm 8.78	28.20 \pm 10.35	21.56 \pm 6.28	19.03 \pm 4.32	158.17
TDCA 4 μ moles	72.69 \pm 16.36	50.48 \pm 12.24	46.80 \pm 19.6	41.39 \pm 13.26	33.10 \pm 8.25	244.46

Note: moyenne \pm écart-type de 6 échantillons

Tableau III

Pourcentage de PC dissous par rapport au PC total contenu dans les membranes artificielles

a

	2 minutes	4 minutes	6 minutes	8 minutes	10minutes	total
TCA 1 μ mole	5,03 \pm 1.32	3.34 \pm 1.24	2.48 \pm 0.66	1.94 \pm 0.69	1.77 \pm 0.80	14.56
TUDCA 1 μ mole	4.48 \pm 2.05	3.08 \pm 1.30	2.17 \pm 1.08	1.76 \pm 0.72	1.44 \pm 0.69	12.93
TDCA 1 μ mole	8.26 \pm 3.16	5.61 \pm 1.78	5.49 \pm 1.15	4.69 \pm 1.15	4.35 \pm 0.84	28.40

b

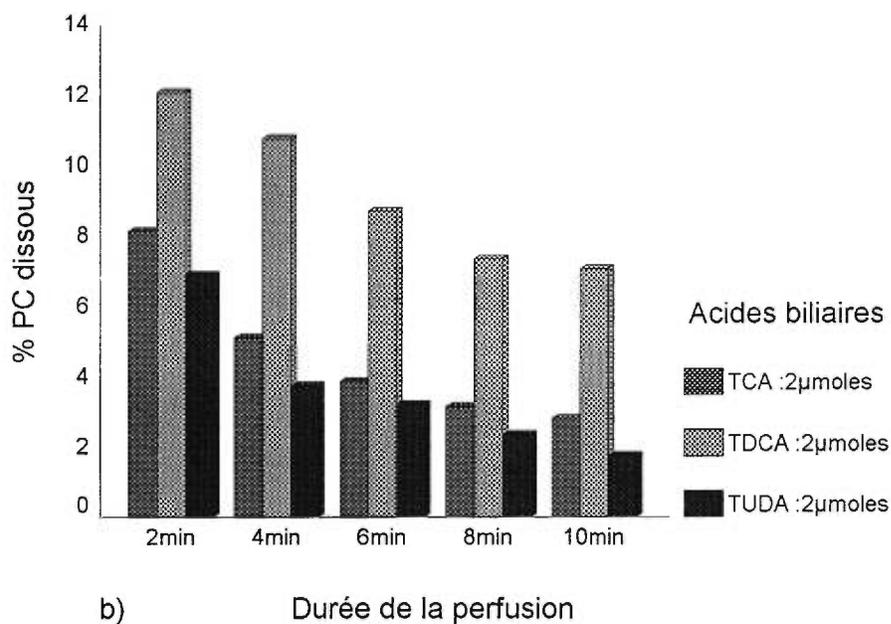
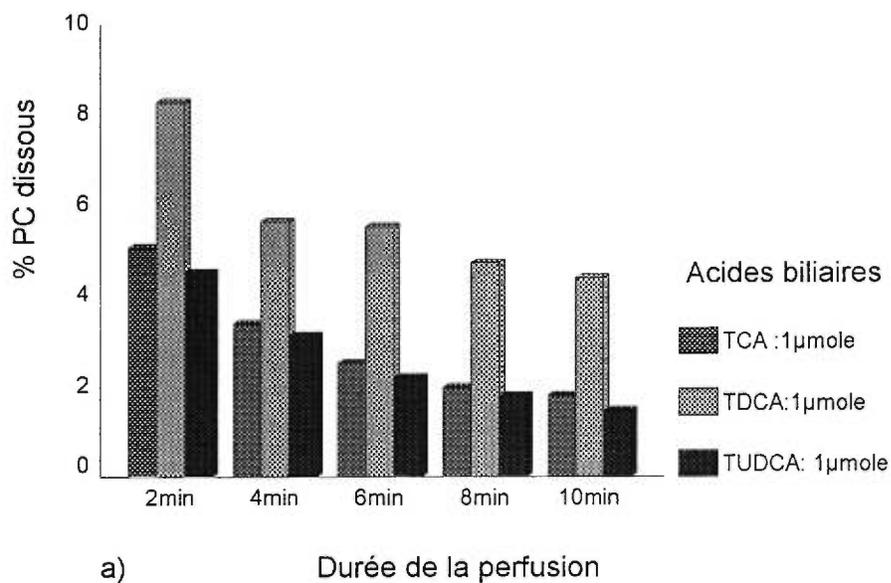
	2 minutes	4 minutes	6 minutes	8 minutes	10minutes	total
TCA 2 μ moles	8.15 \pm 2.17	5.11 \pm 1.45	3.86 \pm 1.13	3.15 \pm 1.08	2.81 \pm 1.02	23.08
TUDCA 2 μ moles	6.90 \pm 2.86	3.75 \pm 1.01	3.20 \pm 0.92	2.36 \pm 0.9	1.76 \pm 0.67	17.97
TDCA 2 μ moles	12.08 \pm 1.59	10.77 \pm 1.82	8.71 \pm 3.08	7.35 \pm 2.39	7.06 \pm 1.93	45.97

c

	2 minutes	4 minutes	6 minutes	8 minutes	10minutes	total
TCA 4 μ moles	12.75 \pm 2.82	9.71 \pm 2.4	8.41 \pm 1.39	7.26 \pm 1.99	6.81 \pm 2.14	44.94
TUDCA 4 μ moles	9.69 \pm 2.18	8.26 \pm 1.97	5.91 \pm 1.22	5.41 \pm 1.15	4.47 \pm 1.88	33.74
TDCA 4 μ moles	16.33 \pm 3.31	14.01 \pm 2.96	15.01 \pm 5.87	15.88 \pm 5.43	15.16 \pm 4.09	76.39

Note: moyennes \pm écart-type de 6 échantillons.

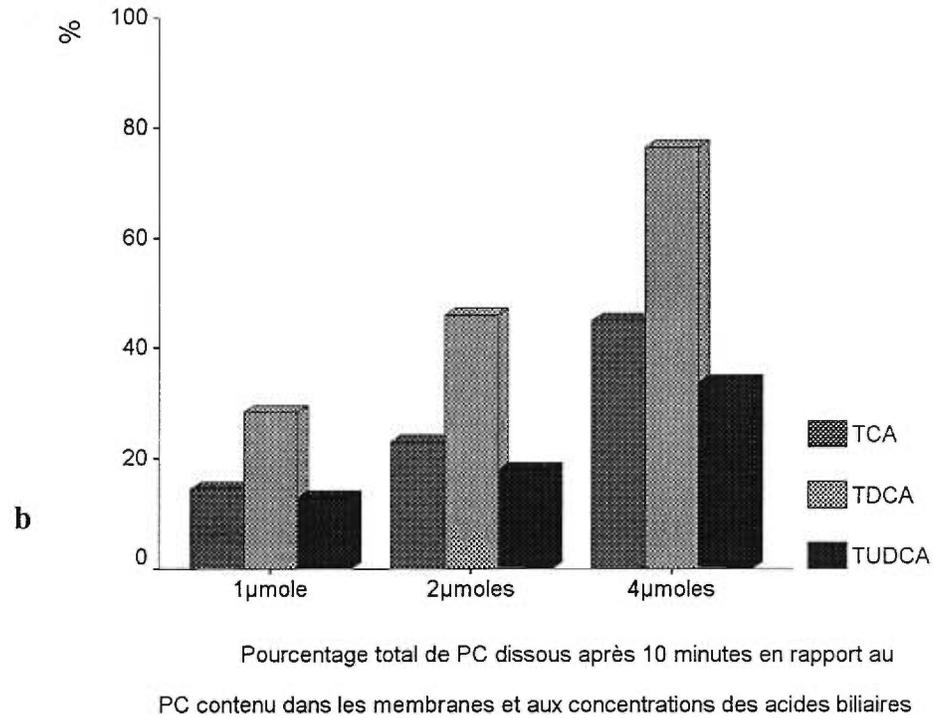
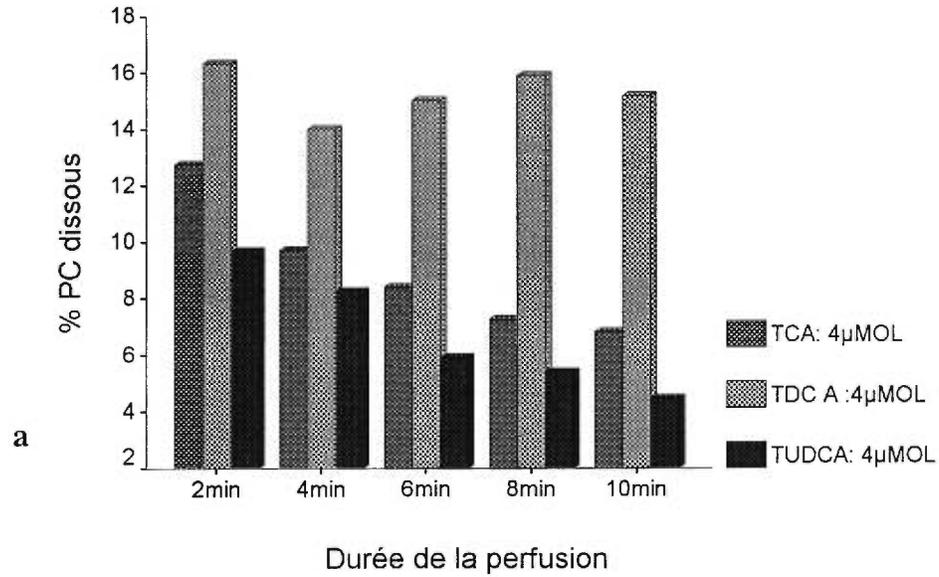
Figure 12. Effets des acides biliaires sur PC contenu dans les membranes artificielles



TCA: Taurocholic acid, TUDCA : Tauroursodeoxycholic acid

TDCA: Taurodeoxycholi acid

Fig. 13 Effets des acides biliaires sur PC contenu dans les membranes artificielles



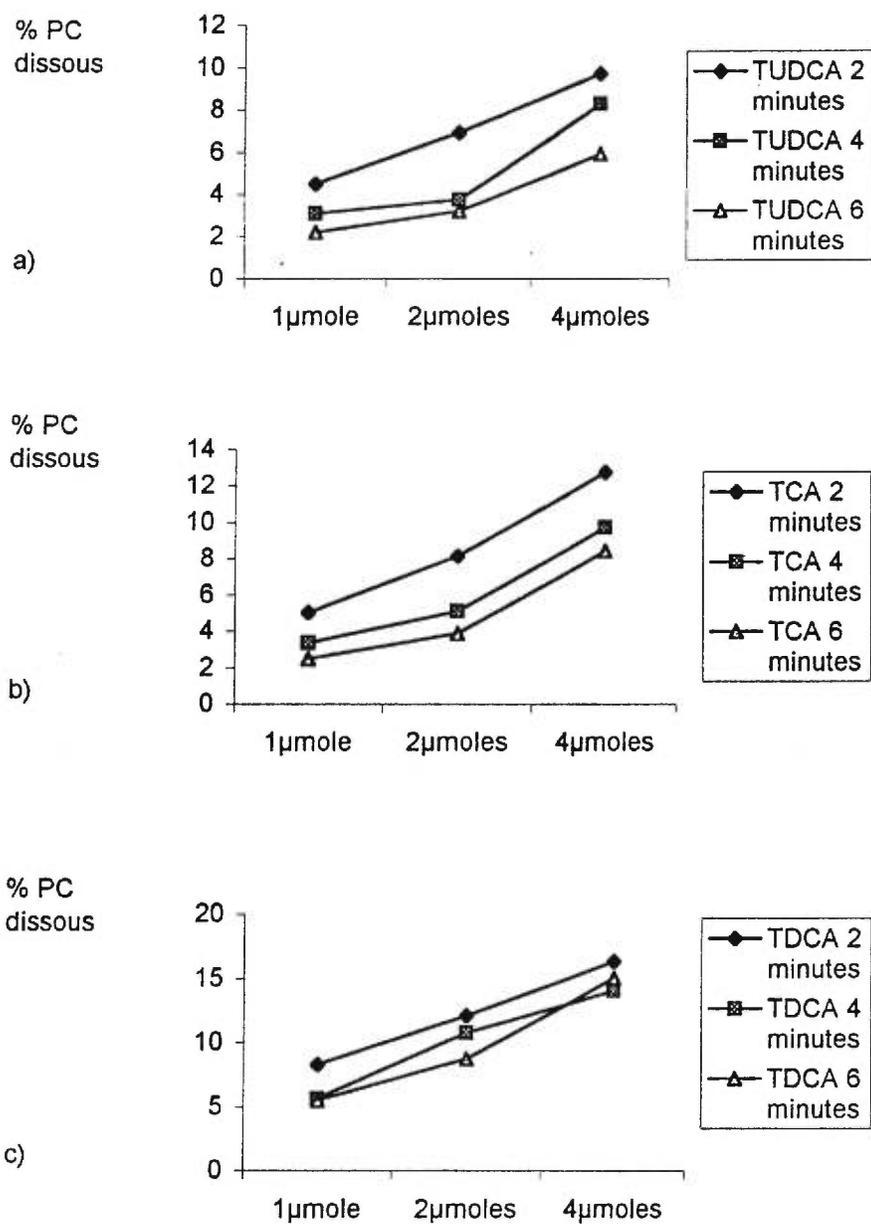


Figure 14. Profil de PC dissous sous l'action des acides biliaires TUDCA, TCA et TDCA en fonction de la concentration et du temps de la perfusion.

10.3 Études de la fluidité lipidique des membranes plasmiques et canaliculaires du foie

Les résultats seront présentés en tenant compte du raisonnement suivant discuté antérieurement dans le chapitre consacré à la fluidité: une augmentation de l'anisotropie par rapport au contrôle traduit une baisse de la fluidité lipidique tandis qu'une diminution de l'anisotropie traduit une augmentation de la fluidité lipidique. L'étude de la fluidité du phosphatidylcholine (PC), en combinaison avec les différentes concentrations d'acides biliaires (tableau IV et Figure 15a), démontre que TCA à 1 et 2 μ moles ne modifient pas la fluidité du PC; tandis qu'à 4 μ moles, la fluidité du PC se trouve diminuée par rapport au contrôle. Le TUDCA aux concentrations de 1, 2 et 4 μ moles n'entraînent aucune variation de la fluidité du PC (0.1532, 0.1522 et 0.1511 respectivement). Des résultats plus évidents ont été observés avec le TDCA qui démontre une augmentation de la fluidité du PC à 1 μ mole(0.1480) et une diminution marquée de la fluidité à 2 et 4 μ moles(0.1622 et 0.1654 respectivement).

10.3.1 Anisotropie de fluorescence des membranes plasmiques (PM) et canaliculaires (BCM)

Avec les membranes plasmiques (PM) et canaliculaires (BCM), les effets des acides biliaires sur la fluidité lipidique des membranes ont été étudiés en utilisant les concentrations de 2 et 4 μ moles pour chacun des sels. Considérant les membranes plasmiques, il a été observé que TCA à 2 et 4 μ moles entraîne une légère augmentation de la fluidité (0.1633; 0.1638) par rapport au contrôle (0.1642). La variation entraînée par 2 μ moles de TUDCA sur la fluidité lipidique des PM est minime: une légère diminution

alors qu'à 4 μ moles TUDCA montre une augmentation de la fluidité (0.1599). Quant au TDCA, il a été observé que la fluidité augmente proportionnellement avec la concentration (0.1634 et 0.1588 respectivement). Les différences observées ne sont pas significatives. (tableau V et Figure 15b).

Considérant les membranes canaliculaires, nous avons observé que TUDCA augmente la fluidité lipidique de ces membranes. L'augmentation constatée à 2 μ moles (0.1733) par rapport au contrôle (0.1772) était plus grande comparé à l'effet des 4 μ moles (0.1751). TCA et TDCA montrent le même profil: à 2 μ moles, ils augmentent la fluidité lipidique (0.1749 et 0.1744 respectivement) et à 4 μ moles, ils diminuent la fluidité (0.1820 et 0.1819 respectivement) (Tableau VI et figure 15c).

Tableau IV

Anisotropie de fluorescence du phosphatidylcholine (PC) évalué à l'aide du TMA-DPH

	TUDCA	TCA	TDCA
1 μ mole	0.1532 \pm 0.0007	0.1508 \pm 0.0004	0.1480 \pm 0.0004
2 μ moles	0.1522 \pm 0.0007	0.1506 \pm 0.0001	0.1622 \pm 0.0002
4 μ moles	0.1511 \pm 0.0005	0.1577 \pm 0.0002	0.1654 \pm 0.0006

Notes: ces valeurs représentent des moyennes \pm écart-type de 4 échantillons
sonde : TMA-DPH
contrôle: 0.1531 \pm 0.0001

Tableau V

Effets des acides biliaires sur l'anisotropie de fluorescence des fractions membranaires plasmatiques(PM)

	TUDCA	TCA	TDCA
2 μ moles	0.1648 \pm 0.0092	0.1633 \pm 0.0043	0.1634 \pm 0.0086
4 μ moles	0.1599 \pm 0.0081	0.1638 \pm 0.0077	0.1588 \pm 0.0071

Note: ces valeurs sont des moyennes \pm écart type de 10 préparations membranaires
 contrôle: 0.1642 \pm 0.0082
 Sonde :TMA-DPH

Tableau VI

Effets des acides biliaires sur l'anisotropie de fluorescence des fractions membranaires canaliculaires(BCM)

	TUDCA	TCA	TDCA
2 μ moles	0.1733 \pm 0.0017	0.1749 \pm 0.0052	0.1744 \pm 0.0045
4 μ moles	0.1751 \pm 0.0003	0.1820 \pm 0.0138	0.1819 \pm 0.001

Notes: ces valeurs représentent des moyennes \pm écart-type de 4 préparations membranaires
 contrôle: 0.1772 \pm 0.0049
 Sonde: TMA-DPH

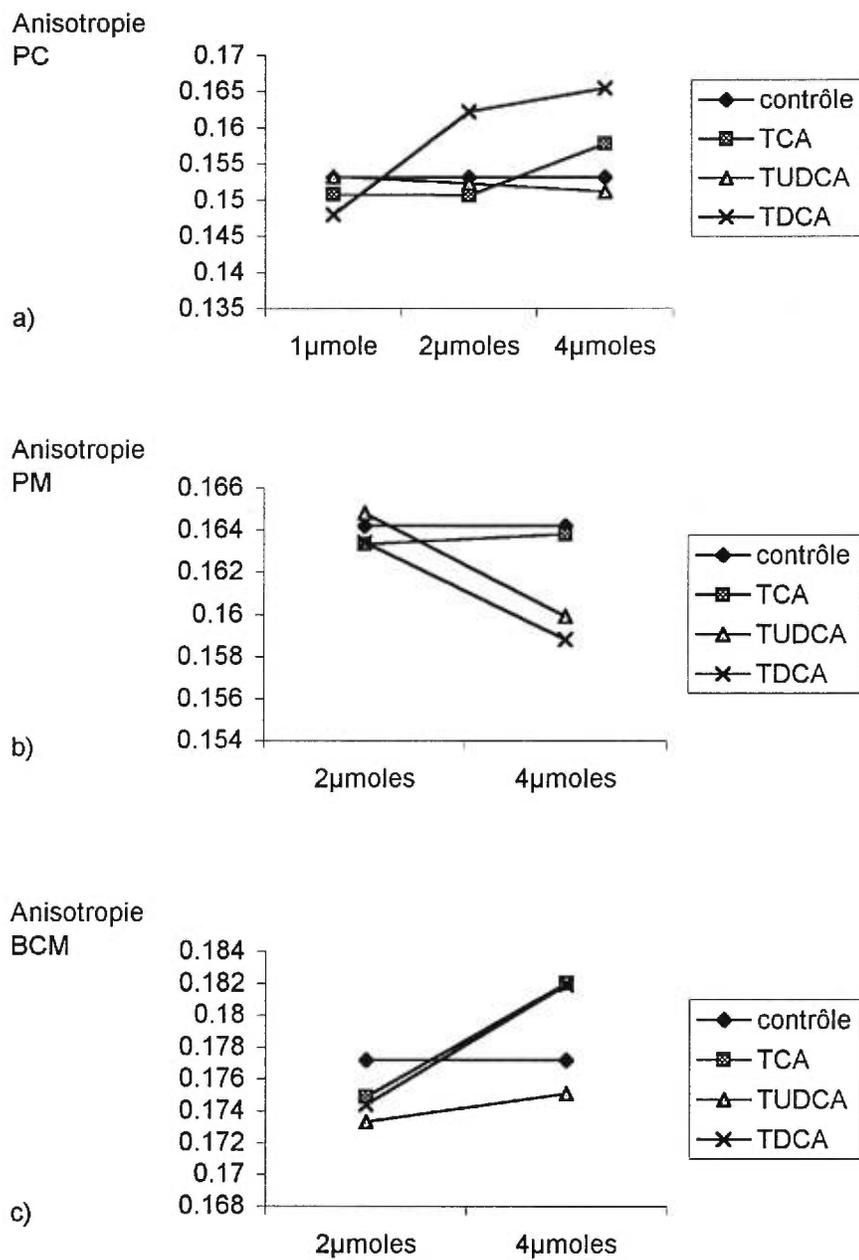


Figure 15. Effets des acides biliaires TUDCA, TCA et TDCA sur l'anisotropie de fluorescence du phosphatidylcholine(PC), des membranes plasmiques(PM) et canaliculaires(BCM) évalués à l'aide du TMA-DPH.

11. DISCUSSION

Il survient généralement dans les pathologies cholestatiques une augmentation des acides biliaires toxiques entraînant des changements au niveau des lipides membranaires. L'analyse des effets des acides biliaires: TUDCA, TCA et TDCA sur les membranes nécessite l'établissement de critères caractérisant l'atteinte de ces dernières. Les résultats que nous avons obtenus seront discutés en considérant spécialement l'effet détergent des sels biliaires, la fonction de la concentration micellaire critique (CMC), la fluidité membranaire et la prévention de la cholestase par l'UDCA.

11.1 Effets détergents de TCA, TUDCA et TDCA

Les sels biliaires sont des détergents stéroliques anioniques qui solubilisent effectivement le phospholipide et le cholestérol, qui sont les principaux lipides structurels des membranes cellulaires (Heuman, D.M. et co., 1991). Cette action des sels biliaires sur les phospholipides membranaires est peu étudiée dans la cholestase. Les présents travaux démontrent que TDCA était capable de dissoudre plus de PC que TCA et TUDCA aux concentrations de 1, 2 et 4 μ moles alors que TUDCA était le seul à dissoudre le moins de PC pendant toute la durée de la perfusion.

La toxicité et le pouvoir détergent des sels biliaires augmentent avec l'accroissement de l'hydrophobicité tel que démontré par Salvioli G et co 1984; Atili, A.F. et co., 1986 (non

conjugué>glycoconjugué>tauroconjugué; monohydroxy> dihydroxy> trihydroxy) (Benedetti A et al 1997). Il a été démontré in vivo et in vitro que UDCA ($3\alpha7\beta\text{OH}$) est moins cytotoxique que DCA ($3\alpha12\beta\text{OH}$) et se comporte comme les acides biliaires trihydroxy tels CA ($3\alpha7\alpha12\alpha\text{OH}$) (Quist, R.G. et co., 1991; Scholmerich, J. et co., 1992; Güldütuna, S. et co., 1993). Les effets détergents des acides biliaires tauroconjugués sont significativement moins importants que leurs relatifs non conjugués (Scholmerich, J. et co., 1984; Miyazaki, K., et co., 1984). Les acides biliaires conjugués, étant des acides forts, sont totalement ionisés au pH physiologique et demeurent dans le feuillet externe de la double couche bilipidique à moins qu'un système de transport soit présent (Cabral, D.J. et co., 1987). La position des groupes hydroxyles est aussi très importante puisque le 7α dihydroxy (ursodeoxycholate) ne montre pas d'effet cytotoxique mais plutôt un effet protecteur. Les études in vivo ont aussi démontré que la capacité d'induire des dommages hépatocellulaires est en corrélation avec l'hydrophobicité des sels biliaires. (Kitani, K. et co., 1985; Heuman, D.M. et co., 1991).

Il a été démontré que les acides biliaires hydrophobiques exercent probablement leur effet cytotoxique en s'introduisant dans la double couche lipidique des membranes (Schubert, R. et co., 1986) tandis que UDCA au contraire qui est non toxique peut contrecarrer les effets de ces acides biliaires toxiques. Étant donné que sa liaison aux membranes est faible, à n'importe quelle concentration, (Schubert, R. et co., 1983, Heuman, D.M., 1993) et que ses micelles ont peu tendance à solubiliser les membranes (Carey, M.E., 1984), ceci peut expliquer pourquoi nous obtenons une dissolution moindre avec TUDCA (figure 12 et 13). Jusqu'à présent, on ignore pourquoi la micelle de UDCA

a peu d'affinité pour les lipides membranaires. La seule explication possible est la rigidité interne de la micelle d'UDCA (Kawamura, H. et co., 1989).

Les sels biliaires sont des régulateurs physiologiques importants dans la formation de la bile, ils peuvent entraîner une augmentation du volume des hépatocytes quand ils sont infusés à des doses cholérétiques (Haussinger, D. et co., 1992;1993). Les travaux de ce dernier ont montré qu'à des doses cholérétiques et cholestatiques, TCA entraînent des modifications significatives en rapport à l'hydratation cellulaire (augmentation ou baisse du volume intracellulaire). Il apparaît que la sensibilité des membranes aux sels biliaires toxiques augmente avec la diminution du contenu en cholestérol. Ceci peut être dû au fait que le cholestérol a un effet stabilisateur de la membrane (Schubert, R. et al., 1988; Yeagle, P.L., 1985).

11.2 Effet détergent des sels biliaires en fonction du CMC

La capacité micellaire des sels biliaires est inversement proportionnelle à leur pouvoir détergent; celle-ci est propre à chaque sel biliaire (Salvioli, G. et co, 1984). L'UDCA ($3\alpha,7\beta\text{OH}$) a une concentration micellaire critique de $7\mu\text{M}$, il est moins tensio actif et possède un pouvoir moindre à solubiliser les lécithines et le cholestérol (J.C. Montet 1991), contrairement au DCA dont la CMC est de $3\mu\text{M}$ (Roda A et al 1989), Il ne s'autoagrège pas aussi facilement que le chenodeoxycholate ($3\alpha,7\alpha\text{OH}$); la position équatoriale de son hydroxyle est responsable de sa haute solubilité monomère (J.C. Montet, 1991). Avec un traitement à UDC, la concentration intrahépatique suffisante pour obtenir des dommages hépatiques pourrait être de 2mM, ce qui est pratiquement

impossible (Zhao, X.M. et al., 1993), Il n'a jamais été rapporté que UDC pouvait induire des dommages cellulaires hépatiques à des doses thérapeutiques (Queneau, P.E. et al., 1994), il peut cependant entraîner un léger effet sur les membranes biologiques tel qu'il est confirmé par les études in vitro sur les hépatocytes (Miyazaki, K. et al., 1984). Ces trouvailles concordent avec nos résultats montrant un pouvoir détergent du TUDCA plus faible que TCA et TDCA. Il a été démontré aussi que TCA qui est moins hydrophilique que TUDCA, tel que déterminé par HPLC, est cytotoxique à des concentrations élevées (Heuman, D.M. et al., 1991; Kitani, K., et al., 1985). Les études de Heuman DM et co 1991 ont montré que TDCA infusé au taux de 16 $\mu\text{mole}/100\text{g}$ par heure, causait une progressive diminution du flux biliaire et sur une durée de huit heures aucune résolution n'a été observée alors qu'une infusion simultanée de TUDC ou de TCA abolissait la cholestase dès la première heure de l'infusion. Il a aussi démontré que TCA à 48 $\mu\text{mole}/100\text{g}$ causait une élévation modérée des enzymes hépatiques tandis que TUDCA à cette concentration apparaissait non toxique. TCA à 32 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ était moins protecteur que TUDCA.

Les acides biliaires, à des concentrations millimolaires, solubilisent les lipides amphiphiles tels phosphatidylcholine et cholestérol et peuvent rupturer les membranes plasmiques causant la mort de la cellule (Coleman, R. et co., 1980; Vyvoda, O.S. et co., 1977; Billington, D. et co., 1980). La probabilité pour une membrane d'être rupturée sous l'effet des sels biliaires dépend de son contenu en cholestérol, ce dernier diminue la susceptibilité des membranes à l'effet endommageant. Quoique les membranes canaliculaires soient présumées résistantes aux altérations par les flux normaux des sels biliaires, elles peuvent être rupturées sous l'action de fortes concentrations de sels biliaires

in vitro (Graham JM et al 1987).

Dans des fragments de canalicules biliaires, l'évidence de toxicité dans ces structures débute à $10\mu\text{mole/L}$. Dans beaucoup de types de cellules telles les hépatocytes, la cytotoxicité des acides biliaires survient à des concentrations élevées telle que $100\mu\text{mol/L}$ (Scholmerich, J., 1984; Ota, S., et co., 1991). Dans la cholestase sévère comme dans l'obstruction biliaire extrahépatique, les concentrations d'acides biliaires sériques peuvent aller jusqu'à $500\mu\text{M}$ et les dommages hépatocellulaires sont attribués à l'action des acides biliaires (Greim, H. et al., 1972).

Les travaux expérimentaux de Douglas et al., (1991) ont montré que TUDCA n'entraîne pas de libération élevée de LDH même aux concentrations de 50 mmol/L . Les études de Douglas ont aussi démontré l'effet protecteur du TUDCA contre la toxicité hémolytique du TDCA. Cet effet a été perçu comme retardant l'hémolyse plutôt que de l'empêcher. Les études de Schröder et co. (1996) ont montré que TCA ne modifiait pas significativement l'anisotropie DPH même à la concentration de 3Mm (une valeur proche du CMC) et que de faibles concentrations d'acides biliaires même au-dessous du CMC ont une action délétère directe sur les membranes coloniques apicales et augmente la fluidité membranaire à des concentrations de $0.1\text{-}3\text{mM}$.

11.3 Effet des acides biliaires sur la fluidité membranaire

Les acides biliaires conjugués étant des acides forts, sont complètement ionisés au pH

physiologique et restent au niveau du feuillet externe de la double couche lipidique à moins qu'un système de transport soit présent; en contraste les acides biliaires non conjugués traverseront facilement la double couche et entreront dans la cellule. La vitesse de passage dépendra du nombre de groupe hydroxyl: les acides biliaires dihydroxy traversent rapidement tandis que les trihydroxy le font plus lentement (Hofmann, A.F. 1994). Selon les études de Leuschner et co. 1995; le TUDCA se localise dans la membrane à la même place que le cholestérol (Figure 9).

Dans notre étude sur la fluidité du PC simple combiné avec les acides biliaires, il a été démontré que TUDCA n'altère pas la fluidité du PC (figure 15a) alors que TCA la diminue à 4 μ moles, et la baisse de la fluidité est encore plus marquée avec TDCA à 2 et 4 μ moles proportionnellement à la concentration.

Les acides biliaires sont capables de s'incorporer dans les membranes étant donné leur caractère lipophile. Les acides biliaires hydrophobes exercent probablement leur effet cytotoxique en s'introduisant dans la double couche des membranes (Schubert, R. et co. 1986). L'élévation des concentrations de sels biliaires entraînent l'autoagrégation des molécules de sels biliaires et des altérations dans l'orientation des lipides membranaires (Schubert, R. et co. 1988). L'UDCA et ses conjugués ont de très faible toxicité in vitro. Les travaux de Bouchard G. effectués antérieurement dans notre laboratoire ont démontré que UDCA et TUDCA ne modifient pas la fluidité membranaire ou le ratio du cholestérol et des phospholipides totaux composant ces dernières indiquant une faible toxicité.

Les techniques d'isolement des membranes pourraient affecter la fluidité membranaire

et être responsables des variations retrouvées. On croit évidemment que des variations de cette fluidité membranaire puissent fortement influencer les propriétés de la membrane en particulier modifier la nature et l'efficacité des récepteurs et d'une manière plus générale, modifier la transmission de l'information.

Des expériences avec les entérocytes montrent que l'activité lytique des acides biliaires corrélait avec la composition membranaire. Billington D. et co. 1978 ont montré que plus la fluidité membranaire est basse, plus les membranes érythrocytaires résistaient à la lyse induite par les acides biliaires (Lowe PJ. et co 1981). Malgré la composition des lipides des microsomes n'a pas été mesurée dans l'étude de Toshiaki N et al 1993, la baisse de la fluidité observée dans le foie des rats avec ligature du canal cholédoque, on pense que ceci est dû aux changements du ratio cholestérol/Phospholipides et la composition des Phospholipides.

Les altérations au niveau de la membrane basolatérale hépatocytaire peuvent être induites par de faibles concentrations d'acides biliaires tandis que des changements au niveau des membranes canaliculaires semblent exiger ou nécessiter des concentrations plus élevées puisque les acides biliaires se retrouvent physiologiquement à de fortes concentrations au niveau du pôle canaliculaire, les membranes canaliculaires ont besoin d'être plus résistants que les membranes basolatérales et ceci est reflété dans leur haute contenu en cholestérol (Güldütuna, S. et co., 1993). Storch et coll. 1983 ont observé que les membranes canaliculaires biliaires chez le rat sont moins fluides que les autres membranes hépatiques.

Nous avons démontré que TDCA, proportionnellement à la concentration, augmentait la fluidité lipidique des membranes plasmiques (figure 15b). Ces résultats s'accordent avec les travaux de Keith A.D. et co. 1973; Griffith O.H. et co. 1976 qui soutiennent que les acides biliaires toxiques solubilisent les lipides et augmentent la fluidité membranaire permettant à l'eau de s'introduire dans les membranes. Ce processus permet la formation de vacuoles d'inclusion au niveau des membranes cellulaires sinusoidales telles que démontrées dans les études en microscopie électronique (Fisher, M.M. et co. 1971; 1972; Priestly, B.G., Côté G., Plaa G.L. 1971). Au niveau des membranes canaliculaires, la fluidité lipidique est aussi augmentée sous l'action de 2 μ moles de TDCA mais se trouve diminuée par une concentration de 4 μ moles (Figure 15c). Tenant compte de ces mêmes considérations, il paraît difficile d'expliquer pourquoi à concentration plus élevée (4 μ moles), TDCA diminue plutôt la fluidité. Cette assertion n'explique pas non plus pourquoi nous avons observé aussi une élévation de la fluidité des membranes canaliculaires inversement proportionnelle aux concentrations de TUDCA. Somme toute, leur variation par rapport au contrôle n'est pas grande.

D'autres études, au contraire, suggèrent que les changements entraînés par l'augmentation des acides biliaires toxiques dans la cholestase diminuent la fluidité lipidique des membranes comme il l'a été démontré dans la cholestase induite par l'éthinyl estradiol (Rosario, J. et co. 1988; Reyes H. et co. 1993). Les études de Vu et al 1992 sur la cholestase induite par le lithocholate démontrent une baisse de la fluidité des membranes canaliculaires comme pouvant être un composant pathogénique majeure. Ces affirmations

s'accordent à une partie de nos travaux sur les membranes canaliculaires démontrant une baisse de la fluidité du TDCA à 4 μ moles et une élévation de la fluidité produite par TUDCA aux mêmes concentrations (Fig. 15c).

Ces différences pourraient être expliquées par le fait que les membranes canaliculaires possèdent un contenu élevé en cholestérol et sphingomyéline témoignant normalement d'une fluidité lipidique faible (Jürg, R. et co. 1994). Les différences dans la composition des lipides existant au niveau des membranes canaliculaires et sinusoidales sont en grande partie responsables des différences observées au niveau de ces fractions en ce qui concerne la fluidité (Tanaka, K. et co. 1986).

L'effet des sels biliaires sur la fluidité membranaire demeure controversé. Certaines maladies peuvent s'accompagner d'une altération de la fluidité membranaire comme dans la cholestase mais on se demande si les changements observés sont dûs à la maladie elle-même ou aux concentrations d'acides biliaires toxiques sachant qu'il n'est pas toujours facile de comparer une membrane normale à une membrane pathologique. Quand il survient une altération, on doit se demander si elle est primaire ou secondaire à la pathologie. Notons toutefois que les sondes peuvent avoir des localisations différentes selon qu'il s'agit d'une membrane normale ou pathologique (Giorgio Lenaz). Jusqu'à maintenant on ne dispose pas d'information sur la façon dont les acides biliaires influencent la fluidité et il paraît difficile d'établir un lien entre le pouvoir détergent des sels biliaires utilisés dans cette étude et leur capacité d'influencer la fluidité des membranes hépatiques.

11.4 Prévention de la cholestase par l'acide ursodeoxycholique

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, il y a altération des composants lipidiques des membranes plasmiques durant la cholestase avec certains agents incluant la cholestase induite par les acides biliaires. Il a été suggéré que l'UDCA pouvait prévenir la cholestase par une action directe sur les membranes cellulaires. La protection apportée par l'administration de TUDCA dans certaines pathologies cholestatiques ou les effets délétères des acides biliaires toxiques sur les membranes n'apparaissent pas médiés à une différence de la fluidité membranaire. Il a été démontré que UDCA protège ou renverse les dommages hépatiques induites par les acides biliaires endogènes in vitro et chez des modèles animaux (Kitani, K. et co. 1985; Ward, A. et co. 1984). Il se trouve que le cholestérol membranaire joue un rôle déterminant dans les effets d'UDCA à deux points de vue: l'inclusion de cholestérol dans la membrane augmente la résistance de celle-ci à la rupture par les acides biliaires; la grandeur de ce phénomène stabilise l'effet avec les différents sels biliaires .

La capacité d'un sel biliaire de protéger contre la toxicité d'un second sel biliaire n'est pas purement une fonction d'hydrophobicité relative. Quoique la protection observée dans ces études (Douglas M et co 1994) était seulement en rapport aux acides biliaires hydrophiles (index hydrophobique < 0). Ce ne sont pas tous les acides biliaires hydrophiles qui sont protecteurs car TCA quoique plus hydrophile que TUDCA est moins protecteur spécialement à de faibles concentrations (Douglas, M. et co. 1994). L'hypothèse que l'effet protecteur du TUDCA et d'autres acides biliaires hydrophiliques

peuvent refléter deux caractéristiques: une tendance modérément forte à former des micelles simples (faible CMC) combiné avec une tendance à former des micelles mixtes contenant du cholestérol (faible hydrophobicité). Il n'est pas clair si l'action protectrice physicochimique de TUDCA contre les effets membranolytiques des sels biliaires est responsable de l'effet bénéfique thérapeutique noté avec TUDCA dans les maladies hépatiques.

Douglas M. (1994) pense que les conjugués d'UDCA peuvent s'incorporer dans les membranes avec une affinité relativement élevée mais n'ont pas le pouvoir d'induire la formation de vacuoles dans les membranes à cause de son groupe 7β hydroxyl qui cache l'interaction hydrophobique avec les chaînes acyls des phospholipides membranaires. Si TUDCA peut néanmoins compétitionner avec des sels biliaires plus hydrophobiques pour les membranes, il peut effectivement exclure ces sels toxiques des membranes. Donc TUDCA, lui-même une faible toxine, peut protéger les membranes en bloquant l'accès des sels biliaires plus toxiques aux membranes.

Schubert et al. (1983;1986;1988) ont démontré que les acides biliaires ainsi que l'UDCA peuvent se mélanger aux vésicules de phospholipides unilamellaires avec une grande affinité et que UDCA est moins altérant. Ils émettent l'hypothèse que UDCA peut s'associer aux membranes en vertu de sa charge ou d'autres effets et peut former une barrière empêchant la liaison des acides biliaires plus toxiques. Les travaux de Cecilia M P et co 1995 ont montré que TUDCA est plus hydrophile que UDCA; ce dernier, utilisé lors des traitements, est converti en TUDCA avant de produire son effet.

CONCLUSION

Comme nous l'avions mentionné dans l'introduction, il se produit des altérations au niveau des membranes plasmiques et canaliculaires dans la cholestase causée par certains agents incluant celle induite par les acides biliaires. Il a été suggéré que UDCA prévient la cholestase par une action directe sur les membranes cellulaires. Notre étude a démontré que TUDCA solubilisait moins de PC que TCA et TDCA, il est par conséquent moins toxique vis à vis des membranes hépatocytaires. La fluidité de la membrane cellulaire hépatique n'était pas modifiée par l'acide Tauroursodeoxycholique alors qu'elle était réduite par le TCA et le TDCA, ce dernier étant plus effectif à cet égard, ce qui permet de conclure que TUDCA peut protéger la membrane contre l'effet détergent des acides biliaires en stabilisant la fluidité de la membrane cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

Agorastos, J., Fox, C., Harry, D.S. et al., *Clin Sci Mol Med* 1978;54:369-379.

Albert, L. J., *Anatomy of the normal liver*. From *Hepatology*, a textbook of liver Disease Zakim Boyer Third ed. vol 1. 1996; p 3-58.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Roberts, K. and Watson, J.D., *Molecular Biology of the cell*, Garland, London, 1983,255.

Aldo Roda, Carolina Cerrè, Anna C. Manetta, Gianfranco Cainelli, Achille Umani-Ronchi, and Mauro Panunzio. *Synthesis and physicochemical, Biological and pharmacological properties of new bile acids amidated with cyclic amino acids*. *J. Med Chem.*1996;39:2270-2276.

Alvaro, D., Angelico, M., Gandin, C., Gigliozzi, A., Cantafora, A., Masella, R., Santini, M.T. and CaPcaccia, L., *Membrane fluidity and liver pathophysiology*. From: *Liver Pathophysiology*. Dianzani, M.U. and Gentilini, P., editors. 1994; chap 5.

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

Anwer, M. S., Engelking, L.R., Nolan, K., Sullivan, D., Zimniak, P., Lester, R., *Hepatotoxic bile acids increase cytosolic Ca activity of isolated rat hepatocytes*. *Hepatology* 8 (1988)887-891.

Arias, I.M., Gatmaitan, Z., Mikkelson, R., Zahniser, D., Rice, J., Tung, A., Raphael, N. and Copeland, D., 1987 *On the structural and functional polarity in the liver*. In: *Modulation of liver cell expression* (Reutter, W., Popper, H., Arias, I.A., Heinrich, P.C. Keppler, Landmann, L., eds) pp 83-93, MTP Press, Lancaster.

Armstrong, M.J., Carey, M.C., *The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities*. *J. Lipid Res.* 1982; 23:70-80.

Atili, A.F., Angelico, M., Cantafora, A., Alvaro, D., Capocaccia, L., *Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic balance of bile acids*, *Med Hypoth*, 19(1986) 57-69.

Bajaj, R., Heuman, D. M., *Adsorption of bile salts to model membranes: effects of cholesterol and ursodeoxycolate*. In: Paumgartner G., Stiehl A. Gerok W. eds: *Bile acids and the hepatobiliary system*. Kluwer Dordrecht 1993. 197-202.

Balisteri, W. F., Heubi, J. E., Suchy, F. J., *Immaturity of the enterohepatic circulation in early life: Factors predisposing to physiologic maldigestion and cholestasis*. *J. Pediatr.*

Gastroent. Nutr. 1983;2:346-354.

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

Barnwell, S.G., Lowe, P.J., Coleman, R., *Effect of taurochenodeoxycholate or tauroursodeoxycholate upon biliary output of phospholipids and plasma membrane enzymes and the extent of cell damage, in isolated perfused rat livers.* Biochem J. 1983; 216:107-111.

Barnwell, S. G., Lowe, P. J., Coleman, R., *The effects of colchicine on the secretion into bile of bile salts, phospholipids, cholesterol and plasma membrane enzymes: Bile salts are secreted unaccompanied by phospholipids and cholesterol.* Biochem J 1984;723-731.

Bartles, J.R, Feracci, H.M., Stieger, B., Hubbard, A.L., J Cell. Biol 1987, 105:1241-1251.

Belli, D.C., Fournirer, L.A., Lepage, G., Termblay, P., Yousef, I.M., Roy, C.C., *The influence of taurine on the bile acid maximum secretory rate in the guinea pig.* Pediatr Res 1988; 24:34-37.

Benedetti, A., Alvaro, D., Bassoti, C., Gigliozzi, A., Ferretti, G., La Rosa T., Di Sario A., Baiocchi L., Jezequel, A.M., *Cytotoxicity of bile salts against biliary epithelium: A study in isolated bile ductule fragments and isolated perfused rat liver.* Hepatology 1997; 26;1:8-21.

Berthelot, P., Erlinger, S., Dhumeaux, D., Preaux, A.M. 1970 *Mechanism of phenobarbital-induced hyperchloresis in rat.* Am. J. physiol., 219, p. 809-813.

Beuers, U., Nathanson, M.H., Boyer, J.L., *Effects of TUDCA on cytosolic Ca signals in isolated rat hepatocytes.* Gastroenterology, 1993; 104: 604-612.

Beuers, U., Nathanson, M.H., Isales, C.M., Boyer, J.L., *Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca⁺⁺ mechanism defective in cholestasis.* J Clin Invest 1993; 92:2984-2993.

Beuers, U., Spengler, U., Zwiebel, F.M., Pauletski, J., Fisher, S., Paumgartner, G., *Effect of ursodeoxycholic acid on the kinetics of the major hydrophobic bile acids in health and chronic cholestatic liver disease.* Hepatology 1992; 15: 603-608.

Bianchi, L., *Liver biopsy interpretation in hepatitis Part I Presentation of critical morphology features used in dg glossary* Pathol Res Prct 1983; 178:2-19.

Billington, D., Coleman, R., *Effect of bile salts on human enterocytes, plasma membrane vesiculation, phospholipid solubilization and their relationship to bile secretion.* Biochim Biophys Acta 1978; 509:33-47.

- Billington, D., Evans, C.E., Godfrey, P.P., Coleman, R.,** *Effect of bile salts on the plasma membrane of isolated rat hepatocyte.* Biochem J 1980; 188:321-327.
- Björkhem, I.,** *Mechanisms of BA biosynthesis in mammalian liver.* In Danielson, H; Sjövell, J (eds) sterol and bile acids PP. 303-329 Elsevier Amsterdam 1985.
- Björkhem, I.,** *Mechanism of degradation of the steroid side chain in the ofrmation of bile acids.* J. Lipids Res 1992; 33:445-471.
- Blitzer, B.L., Boyer, J.L.,** 1982. *Cellular mechanisms of formation.* Gastroenterology, 82, p. 346 -357.
- Boelsterli, U.A., Rakhit, G., Balazs, T.,** *Modulation by S-adenosyl-methionine of hepatic Na^+K^+ ATPase, membrane fluidity and bile flow in rats with ethinyl estradiol-induced cholestasis,* Hepatology 1983; 3:12-17.
- Borgström, B., Lundh, G., Hofmann, A.F.** *The site of absorption of conjugated bile salts in man.* Gastroenterology 1963;45:229-238.
- Borus, M., Fromm, H.,** *Cystic fibrosis: another use for urso?* Gastroenterology 1991; 100: 841-842.
- Bouchard, G., Tuchweber, B., Yousef, I.M.,** *Modulation of bile salt independent bile flow by bile salts: role of glutathione dependent flow modulation in bile salt-induced choleresis and cholestasis in the rat* Département of Pharmacology and Nutrition. Université de Montréal. and Centre de Recherche Pédiatrique, Hôpital Ste Justine. 1997.
- Bouchard, G., Yousef, I.M., Tuchweber, B.,** *Influence of oral treatment with ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acids on estrogen-induced cholestasis in rats: effects on bile formation and liver plasma membrane.* Liver 1993; 13:193-202.
- Bouscarel, B., Frohmm, H., Ceryak, S., Cassidy, M.M.,** *Ursodeoxycholic acid incresases low-density lipoprotein binding, uptake and degradation in isolated hamster hepatocytes.* Biochm J 1991; 280: 589-598.
- Bouscarel, B., Fromm, H., Nussbaum, R.,** *Ursodeoxycholate mobilizes intracellular Ca^{++} and activates phosphorylase A in isolated hepatocytes.* Am J Physiol 1993; 264:G243-251.
- Boyer, J.L.,** *Mechanisms of bile secretion and hepatic transport.* In Andreoli TE, Hofman, A.G., Fanestil, D.D., Schultz, S.H., eds. Physiology of membrane disorders. New York, Plenum Publishing corp 1986: 609-636.
- Boyer, J.L.,** *New concepts of mechanisms of hepatocyte bile formation* physiol Rev 1980; 60,2: 303-326.

Boyer, J.L., *Perspective on progress and future developments of the cellular and molecular biology of bile acid transport mechanisms*. In: **Meyer zum Buschenfelde KH, Paumgartner G, Scholmerich J**, eds. *Perspectives in gastroenterology: current facts and future trends*. Baltimore: Urban et Schwarzenberg, 1995,123-127.

Brasitus, T.A., Schachter, D., *Biochemistry* 1980;19:2763.

Cabral, D.J., Small, D.M., Lilly, H.S., Hamilton, J.A., *Transbilayer movement of bile acids in model membranes*. *Biochemistry* 1987, 26:1801-04.

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

Calmus, Y., Poupon, R., *Ursodeoxycholic acid in the treatment of chronic cholestatic diseases*. *Biochimie*.1991; 73:1335-1338.

Carey, M.C., Small, D.M., *The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile*. *Amer J. Med* 1970; 49:590-608.

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

Carey, M.C., *Physical-chemical properties of bile acids and their salts*. In: **Danielsson H, Sjovall J**, eds. *Sterols and bile acids*. New York :Elsevier Science Publishers, 1985:345-403.

Carey, M.C. and Duane, W.C., *Enterohepatic circulation*. From: *The Liver: Biology and Pathobiology*, Third Edition. edited by I.M Arias, J.L.Boyer, N. Fausto, W.B. Jakoby, D.A.Schachterand, D.A. Shafritz, Raven Press, Ltd., New York. 1994: 719-767.

Carey, M.C., *Bile salt structure and phase equilibria in aqueous bile salt and bile salt-lithichin systems*. *Hepatology* 1984; 4(Suppl):138S-142S.

Carlier, M.F., *Actin :protein structure and filament dynamics*. *J Biol Chem* 1991; 266:1-4.

Cecilia, M.P. R., Besty, T. K., Clifford, J. S. and Kenneth, D.R.S., *Tauroursodeoxycholate increases rat liver ursodeoxycholate levels and limits lithocholate formation better than ursodeoxycholate*. *Gastroenterology* 1995;109:564-572.

Cereijido, M., Pnce, A., Gonzalez, Mariscal, L., 1989. *Tight junctions and apical basolateral polarity*. *J. Membrane Biol* 110:1-9

Chanussot, F.M., Lafont, H., Hauton, J., Tuchweber, B., Yousef, I.M., *Studies on the origin of biliary phospholipid: Effect of dehydrocholic acid and cholic acid infusions on*

hepatic and biliary phospholipids. Biochem J 19990; 270:691-691.

Charles Lindamood, *Xenobiotic Biotransformation In: Hepatotoxicology*. Robert G. M.; Steadman D.H.; Richard J.B. 1991p.139-180.

Chazouillières, O., Poupon, R, Capron, J.P. et al. J Hepatol 1990; 11:120-123.

Clerici, C., Gurantz, D., Hagey, L.R., Schteingart, C., Hofmann, A.F., *Nor-lithocholate's choleric effect depends on species specific hepatic biotransformation(Abstract)*. Hepatology6:1143.

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

Coleman, R., Holdsworth, G., Vyvoda, O.S., *Hepatocyte surface enzymes and their appearance in bile*. In: **Popper, H., Bianchi, L., Reutter, W.**, eds. Falk Symposium 22. *Membrane alterations as basis of liver injury*. Lancaster, England: MTP, 1977;143-156.

Coleman, R., Lowe, P.J., Billington, D., *Membranes lipid composition and susceptibility to bile salt damage*. Biochim Biophys Acta 1980;599:294-300.

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

Collard, J.G. and de Wildt, A., *Localization of the lipid probe 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH) in intact cell by fluorescence microscopy*, Exp cell Res 1978;116,447.

Colombo, C., Crosignani, A., Assaisso, M. Battezzati, P.M., Podda, M., Ginta, A. et al., *Ursodeoxycholic acid therapy in cystic fibrosis-associate liver disease: a dose-response study*. Hepatology. 1992; 16:924-930.

Combettes, L., Dumont, M., Berthon, B., Erlinger, S., Claret, M.: *Release of calcium from the endoplasmic reticulum by bile acids in rat liver cells*. J. Biol. Cehm, 263 (1988) 2299-2303.

Cooper, J.A., *The role of actin polymerization in cell motility*. Annu Rev Physiol 1991; 53: 585-605.

Cranney, M., Cundall, R.B., Jones, G.R., Richards, J.T. and Thomas, E.W., *Fluorescence lifetime and quenching studies on some interesting diphenylhexatriene membrane probes* Biocim Biophys Acta, 1983,735,418.

Crombie, D.L., Hagey, L.R., Lillienau, J., Miyai, K., Hofmann, A.F., *Toxicity of orally administered cholytaurine in the gyinea pig: discovery of a rodent that cannot detoxify deoxycholic acid(Abstract)*. Gastroenterology 1992;102:A922.

Crosinani, A., Podda, M., Battezzati, P.M., Bertolini, E., Zuin, M., Watson, D. et al.,

Changes in bile acids composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic acid administration. Hepatology 1991; 14: 1000-1007.

Dahlstrom-King, L., Plaa, G.L., *Effect of inhibition of protein synthesis on cholestasis induced by tauroolithocholate, lithocholate and a manganese-bilirubin combination in the rat.* Biochem Pharmacol 1989; 38:2543-2549.

Danielson, H., Nair, P.P., Dritchewski, D. eds. *The bile acids.* New York: Plenum Press 1973:1-32.

David, M.J., *Membranes.* De Précis de Biochimie. Harper. 1985;chp 32:488-505.

Desmet, V.J., *The bile secretory apparatus,* In: Gentilini, P., Arias, I.M., McIntyre, N., Rodes, J., eds Cholestasis. New York: Elsevier Science, 1994,19-30.

De Vos R., De Wolf-Peeters, C., Desmet, V., Bianchi, L., Rohr, F.P., *Significance of liver canalicular changes after experimental bile duct ligation .*Exp Mol Pathol 1975; 23:12-34.

De Zanger and Wisse, In Hepatotoxicology. Robert G. M, Steadman D.H, Richard J.B 1991 p.43.

Deuticke, B., Rev Physiol Biochem Pharmacol 1977; 78:1.

Dietschy, J.M., *Mechanisms for the intestinal absorption of bile acids.* J Lipid Res 1968: 9:297-309.

Dipple, I., Houslay, M.D., Biochem J 1978; 174:179.

Donald, A. Vessey, *Metabolism of Xenobiotics by the human liver.* In: *Hepatology: A textbook of Liver disease.* Zakim, Boyer; 1996, p.257-305.

Donovan, J.M., A.A. Jackson and M.C. Carey, *Molecular species composition of inter-mixed micellar/vesicular bile salt concentrations in model bile: dependence upon hydrophilic-hydrophobic balance.* J. Lipid Res. 1993;34:1131-1140.

Donovan, J.M., IM Yousef and M.C. Carey. *Pansulfation of bile salts markedly increases hydrophilicity and essentially abolishes self-and hetero-association with lecithin.* Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 1993;1182:37-45.

Donner, M., Muller, S. and Stoltz JF. *Fluorescence depolarization method in the study of dynamic properties of blood cells* Biorherology, 1990,27,367.

Douglas, M.H., W.M. Pandk, P.B. Hylemon, Z.R. Vlahcevic, *Conjugates of Ursodeoxycholate protect against cytotoxicity of more hydrophobic bile salts: In vitro studies in rat hepatocytes and human erythrocytes.* Hepatology 1991; 14;5:920-26.

Douglas, M., Heuman and Rohini Bajaj, *Ursodexoycholate conjugates protect against*

disruption on cholestérol-rich membrane by bile salts. Gastroenterology 1994;106:1333-1341.

Dumont, M., Jaquemin, E., D'Hont C. et al., *Expression of the liver Na⁺-independent organic anion transporting polypeptide (oatp-1) in rats with bile duct ligation.* Hepatology 1997; 27:1051-1056.

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

Elferink, R.P.J.O., Jansen P.L.M., *The role of the canalicular multispecific organic anion transporter in the disposal of endo- and xenobiotics.* Pharmacol Ther 1994; 64:77-97.

Elliott, W.H., *Metabolism of bile acids in liver and extrahepatic tissues.* In: *Sterol and Bile acids.* Danielson, H.Sjövall, J.(eds). Elsevier, Amsterdam, 1985 p.303-329.

Erlinger, S., *Secretion of bile.* In: Schiff L, Schiff ER eds. Lippincott, Philadelphia. *Disease of the liver* 1982; 93-118.

Erlinger, S., *Bile flow* In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA eds. *The liver: biology and pathobiology.* 2nd edition. New York: Raven Press 1988:643-658.

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

Erlinger, S., *Role of intracellular organelles in the hepatic transport of bile acids.* Biomed Pharmacother. 1990;44:409-416.

Erlinger, S., *Biliary physiology and disease.* In: Arias IM, Frenkel M., Wilson J.H.P., Eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. *The Liver Annual* 1986;343-367.

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

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

Fahimi, D.H., *Sinusoidal endothelial cells and perisinusoidal fat-storing cells: Structure and function,* in Arias IM, Popper H, Schachter D. and Shafritz DA(eds): *The Liver: Biology and Pathology,* New York, Raven Press, 1982, pp495-506.

Farber, J.L., *The role of calcium in lethal cell injury.* Chem Res Toxicol 1990; 3:503-508.

Farrell, M.K., Balistreri, W.F., Suchy, F.J., *Serum-sulfated lithocholate as an indicator of cholestasis during parenteral nutrition in infants and children.* JPEN 1982; 6:30-33.

Fedorowski, T.L., Sale, G., Calallilo, A., Tint, G.S., Mosbach, E.H., Hall, J.C., *Metabolism of ursodeoxycholic acid in man Gastroenterology* 1977;73:1131-1170.

Feuer, G., Di Fonzo, C.J., *Intrahepatic cholestasis: a review of biochemical-pathological mechanisms. Drug Metab Drug Interact.* 1992;10:1-161.

Fiassé, R., *Les sels biliaires. Physiologie de la circulation entérohépatique, ses dérangements et les tests d'exploration fonctionnelle. Acta Gastro-Enterol. Belg.* LI:491-500.

Fisher, D.C., Cooper, N.S., Rothschild, M.A., Mosbach, E.H., *Am. C. Dis.* 1974; 19:877.

Fisher, M.M., Magnusson, R., Phillips, M.J., Miyai, K., *Bile acid metabolism in mammals. IV. Sex differences in chenodeoxycholic acid metabolism in the rat. Lab. Invest.* 1972; 27:254-262.

Fisher, M.M., Magnusson, R., Phillips, M.J., Miyai, K., *Bile acid metabolism in mammals. Ultrastructural studies on the intrahepatic cholestasis induced by lithocholic and chenodeoxycholic acids in the rat. Lab. Invest* 1971:24:292-302.

Fisher, A., 1991. *Quatre famille de molécules responsable de l'adhérence intercellulaire. Médecine/Sciences* 7: 540-542.

Florine-Casteel, K., Lemasters, J.J., Herman, B., *Lipid order in hepatocyte plasma membrane blebs during AYP depletion measured by digitized video fluorescence polarization microscopy. FASEB J*1991; 5:2078-2084.

French, S.W., Davis, P.L., *Ultrastructural localization of actin-like filaments in rat hepatocytes. Gastroenterology* 1975;68:765-774.

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

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

Fromm, H., Carlson, G.L., Hofman, A.F., Farivar, S., Amin, P., *Metabolism in man of 7 ketolithocholic acid : a precursor of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids. Am J Physiol* 1980;239:G161-G166.

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

Galla, H.J. and Sackmann, E., *Lateral diffusion in in the hydrophobic region of*

membranes: use of pyrene excimer as optical probes, *Biochim Biophys Acta* 339, 103, 1974.

Galeazi, R., Javitt, N.B., *Bile acid excretion: the alternate pathway in the hamster*. *J Clin Invest* 1977;60:1693-1701.

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

Gatmaitan, C. Z., Webster, L.R.C. and Arias I.M., in *The Biology of the Bile Canalculus*. From: *The Liver: Biology and Pathobiology*, Third Edition by I.M. Arias, J.L. Boyer, N. Fausto, W.B. Jacoby, D.A. Schachter and D.A. Shafritz. Raven Press Ltd New York. 1994:665-675.

Gentilini, P., Teodori, U., Gorini, S., *Intrahepatic cholestasis*. Raven Press, New York 1975.

Gerber, M.A., Orr, W., Denk, H., Schaffner, F., Popper, H., *Hepatocellular hyalin in cholestasis and cirrhosis: its diagnostic significance*, *Gastroenterology* 1973;64:89-98.

Godfrey, P.P., Warner, M.J., Coleman, R. *Enzymes and proteins in bile. Variations in output in rat cannula bile during and after depletion of bile salt pool*. *Biochem J*. 196(1981)11-16.

Graham, J.M., Northfield, T.C., *Solubilization of lipids from hamster bile-canalicular and contiguous membranes and from human erythrocyte membranes by conjugated bile salts*. *Biochem J* 1987;242:825-834.

Greim, H., Trülzsch, D., Czygan, P., Rudick, J., Hutterer, F., Schaffner, F. et al. *Mechanisms of cholestasis 6 bile acids in human livers with and without biliary obstruction*. *Gastroenterology* 1972; 63:837-845.

Griffith, O.H., Jost, P.C., *Lipid spin labels in biological membranes*. In : Berliner L.J (ed): *Spin labelling, Theory and Applications*. Academic, New York 1976, 453-523.

Grischam, C.M., Barnett, R., *Biochim Biophys Acta* 1972; 266:613.

Groothuis, G.M.M., Hardonk, M.J., Keulemans, K.P.T., Nieuwenhuis, P., Meijer, D.K., *Autoradiographic and kinetic demonstration of acinar heterogeneity of taurocholate transport*. *Am J Physiology* 1982; 243:G455-462.

Güldütuna, S., Zimmer, G., Imhof, M., Bhatti, S., Tou, T., Leuschner, U., *Molecular aspects of membrane stabilization by ursodeoxycholate*. *Gastroenterology* 1993;104:1736-1744.

Güldütuna, S., Leuschner, M., Wunderlich, N., Nickel, A., Bhatti, S., Hübner, K., Leuschner, U., *Cholic acid and ursodeoxycholic acid therapy in primary biliary cirrhosis*.

anges in bile acid patterns and their correlation with liver function. Eur. J Pharmacol. 1993; 45:221-225.

Güldütuna, S., Weib, A., Desinger, B., You, T., Bhatti, S., Freisleben, F., Leuschner, U., *The effect of chedeoxycholate (CDC) on large unilamellar vesicles (LUV) with variable cholesterol concentration.* Gastroenterology 1994 (abstr).

Guslandi, M. *Treatment of chronic liver disease with ursodeoxycholic acid.* J Intern Med Res 1990;18:497-505.

Hagey, L.R., *Bile acid biodiversity in vertebrates: chemistry and evolutionary implications.* Ph. D Thesis, University of California, San Diego, 1992.

Hardison, W.G.M., Hatoff, D.E., Miyai, K., Weiner, R.G., *Nature of bile acid maximum secretory rate in the rat.* Am J Physiol 1981; 241:G337-343.

Hardisson, W.G.M., Lab. Clin Med. 1981;77:811-820.

Hardison, W.G.M., Proffit JH. *Influence of hepatic taurine concentration on bile acid conjugation with taurine.* Am J Physil 1977; 232:E75-E79.

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

Harper, H.A., Rodwell, V. W., Mayes, P.A., *Précis de Biochimie*, Eds 5 Les Presses de l'Université de Laval, Québec: 1982; 293-296.

Haslewood, G.A.D., *The biological utility of bile salts.* North Holland, Amsterdam.

Haussinger, D., Saha, N., Hallbrucker, C., Lamg, F., Gerok, W., *Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver.* Biochem J 1993; 291:335-360.

Haussinger, D., Saha, N., Hallbrucker, C., Lamg, F., Gerok, W., *Cell volume and bile acid excretion.* Biochem J 1992;288:681-689.

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

Heuman, D.M., *Quantitative estimation of the hydrophilic hydrophobic balance of mixed bile salt solutions* J. Lipid Res 1989; 30:719-30.

Heuman, D.M., *Hepatoprotective poperties of ursodeoxycholic acid* (Editorial) Gastroenterology 1993; 104:1865-1870).

Heuman, D.M., Mills, A.S., McCall, J., Hylelmon, P.B., Pandak, W.M., Vlahcevic, Z.R., *Conjugates of ursodeoxycholate protecct against cholestasis and hepatocellular*

necrosis caused by more hydrophobic bile salts: in vivo studies in the rat. Gastroenterology 1991; 100:203-211.

Heuman, D.M., Vlachcevic, R., Bailey, M.L., Hylemon, P.B., *Regulation of bile acid synthesis. III Effect of bile acid feeding on enzymes regulating hepatic cholesterol and bile acid synthesis in the rat.* Hepatology 1988;8:892-897.

Heuman, D.M., Fernandez, C.R., Hylemon, P.B., Kubaska, W.M., Hartman, C., Vlachcevic, Z.R., *Regulation of bile acid synthesis. I. Effects of conjugated ursodeoxycholate and cholate on bile acid synthesis in chronic bile fistula rat.* Hepatology 1988a;8:358-365.

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

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

Hirata, F., Axelrod J. *Nature* 1978; 275:219

Hirata, F., Axelrod, J., *Science* 1980; 209:1082

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

Hsia, S.L., *Hyocholic acid and mricholic acids.* In: *The bile acids: Chemistry, Physiology and Metabolism.* Nair, P.P., Kritchevsky, D. (eds). Plenum Press, New York and London, 1971; vol. 1, p.95-120.

Hofmann, A.F., *Currents concepts of biliary secretion.* Dig Dis Sci 1998;34:16S-20S.

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

Hofmann, A.F., *In: Physiology of the intestinal tract,* Johnson, L.R., Alpers, D.H., Christensen, J., Jakobson, E.D., Walsh, J.H. (eds) Raven Press, New York, 1994a p.1845-1865.

Hofmann, A.F., *Bile acids.* In: *The liver: biology and Pathology.* Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachter, D., Shafritz, D. A. (eds). Raven Press, New York, 1994 p.677-710.

Hofmann, A.F., *The preparation of chenodeoxycholic acid and its glycine and taurine conjugates.* Acta Chem Scand 1963;17:173-186.

- Hofmann, A.F.**, *The enterohepatic circulation of bile acids in man*. Clin Gastroenterol 1977; 6:324.
- Hofmann AF**. *Pharmacology of ursodeoxycholic acid, an enterohepatic drug*. Scand J Gastroenterol 1994;29(suppl. 204):1-15.
- Hofmann, A.F., Popper, H.**, *Ursodeoxycholic acid for Primary biliary cirrhosis*. (Letter) Lancet 1987; 2:398-399.
- Hofmann, A.F.**, *The physical chemistry of bile in health and disease*. (Kroc Workshop Proceedings). Hepatology. 1984;4(Suppl):1S-252S.
- Hofmann, A.F.**, *Enterohepatic circulation of bile acids*. In: Schultz SG, ed. Handbook of physiology. Section on the gastrointestinal system. Bethesda; American Physiological Society, 1989;567-596.
- Hofman, A.F., Cummings, S.A.**, *Measurement of Bile acids and cholestérol kinetics in man by isotop dilution principles and applications*. In: Barbara, L., Dowling, R.H., Hofmann, A.F., Roda, E., eds. Bile acids in gastroenterology Lancaster: MTP, 1982: 75-117.
- Hofmann, A.F., Mysels, K.J.**, *Bile salts as biological surfactants*. Colloids and Surfaces 1988;30:145-173.
- Hofmann, A.F., Fromm, H.**, *Bile acids as therapeutics agents. From: Perspective in Gastroenterology Current Facts and Future Trends*. Edited by Büschenfelde K.H.M.Z, Paumgartner and Schölmerich, J. 1996:165-171.
- Hofmann, A.F.**, *Bile acid hepatotoxicity and the rationale of UDCA therapy in chronic cholestatic liver disease: some hypotheses*. In: Strategies for the prevention of hepatobiliary diseases. Paumgartner G, Stiehl, A., Barbara, L., Roda, E., (eds) Landcaster, Kluwer Academic Publishers 1990:13-34.
- Horowitz, J.H.** et al., *Gastroenterology* 1981;81:668.
- Huang, Z. and Haugland, R.P.**, *Partition coefficeients of fluorescent probes with phospholipid membranes*, Biochem Biophys Res Commun 1991;181,166.
- Hubbard, A.L., Barr, V.A and Scott, L.J.**, *Hepatocyte surface polarity*. In: *The Liver: Biology and pathobiology* (Arias, I.M., Jacoby, W.B., Popper, H., Schachter, D. and Shafritz DA eds) p189-213.
- Hylemon, P.B., Gurley, E.C., Stravitz, R.T., Litz, J.S., Pandak, W.M., Chiang, J.Y.L., Vlachcevic, Z.R.**, *Hormonal regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA levels and transcriptional activity in primary rat hepatocyte cultures*. J Biol chem 1992;267:16866-16871.

Igimi, H., Carey, M.C: *pH-solubility relations of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids: physical-chemical basis for dissimilar solutin and membrane phenomena.* J. Lipid Res. 1980;21:72-90

Illinger D, Poindron P, Fonteneau P, Modollel M and Kuhry JG, *Internalization of the lipophilic fluorescent probe trimethylamino-diphenylhextriene follows the endocytosis and recycling of the plasma membrane in cells,* Biochem Biophys Acta, 1990,1030,73.

Illinger D, Poindron P, Glasser, Modollel M and Kuhry JG. *The plasma-membrane internalization dan recycling is enhanced in macrophages upon activation with gamma interferon and lipopolysaccharide; a study using the fluorescent probe trimethylamino-diphyllhextriene* Bioochem Biophys Acta 1990b, 1030,82

Israelichivili, J.N., Marcelja, S., and Horn, R.G., *Physical principles of membrane organization,* Q.Rev. Biophys., 13,121,1980

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

Jazrawi RP, De Caestecker JS, Goggin PM, Britten AJ, Joseph AE, Maxwell JD, et al. *Kinetics of hepatic bile acid handling in cholestatic liver disease: effect of urosdeoxycholic acid.* Gastroenterology 1994; 14:134-142.

Jones A, L., schmucker, D.L., Mooney, J.S., Ockner, R.K., Adler, R.D. 1979. *Alterations in hepatic pericanalicular cytoplasm during enhanced bile secretory activity.* Lab. Invest., 40, p. 512-517.

Johnson SB et al .Proc Natl Acad Sci USA 1985;8:1815

Jones AL, Schmucker DL, Mooney JS, Adler RD, Ockner RK. *Morphometric analysis of rat hepatocytes after total biliary obstruction.* Gastroenterology 1976;71:1050-1060

Jones A., Hradek GT, SchmuckerDL, Underdown BJ. *The fate of polymeric and secretory immunoglobulin A after retrograde infusion into the common bile duct in rats.* Hepatology 1984,4:1173-1183

Jürg Reichen and Francis R. Simon: *Cholestasis in : The Liver: Biology and Pathobiology.* Third ed. IM Arias, J L Boyer, N Fausto, W BJacoby, DA Schachter , DA Shafritz. Raven Press New York 1994:1291-1326

Kakis G, Yousef IM. *Pathogenesis of lithocholate and tauroolithocholate induces intrahepatic cholestasis in rats.* Gastroenterology 1978; 75:595-607.

Kakis G, Yousef IM *Mechanisms of cholic acid protection in lithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats* Gastroenterology 1989;78:1402-1411

Kallinowski B, Theilmann L, Zimmerman R, Gams E, Kommerell B, Steihl A. *Effective treatment of cyclosporine-induced cholestasis in heart transplanted patients treated with ursodeoxycholic acid*. Transplantation 1991;51:1128-1129.

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

Kawamura H, Murata Y, Yamaguchi T, Igimi H, Tanaka M, Sugihara G, Kratochvil JP. *Spin-label studies of bile salt micelles*. J Phys Chem 1989;93:3321-26

Keelan M, Thompson BR, *Feeding diets containing 2% cheno or ursodeoxycholic acid or cholestyramine to rats for two weeks alters intestinal morphology and bile acid absorption*. Can J Physiol Pharmacol 1991;69:592-598.

Keith AD, Sharnhoff M, Cohn GE. *A summary and evaluation of spin labeling used as probes for biological membrane structures*. Biochim. Biophys. Acta 1973; 300:379-419.

Kitani K, Ohta M, Kanai S. *Tauroursodeoxycholate prevents biliary protein excretion induced by other bile salt in the rat*. A. J. Physiol 1985;248:G407-G417

Kitani K, Kanai S. *Tauroursodeoxycholate prevents taurocholate induced cholestasis*. Life Sci 1982;30:515-523.

Kitani K, Kanai S, Sato Y, Ohta M. *Taurowalpha-muricholate is as effective as tauro beta-muricholate and tauroursodeoxycholate in preventing taurochenodeoxycholate-induced liver damage in rat*. Hepatology 1994;19:1007-1012

Kitani K, Kanai S. *Interactions between different bile salts in the biliary excretion of the rat*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1983;39:139-152.

Kitani K, Ohta M, Kanai S. *Tauroursodeoxycholate prevents biliary protein excretion induced by other bile salts in the rat*. Am J Physiol 1985;248:G407-417.

Kitani K. *Hepatoprotective effect of ursodeoxycholate in experimental animals*. In :Strategies for the prevention of hepatobiliary diseases. Paumgartner G, Stiehl A, Barbara L, Roda E(eds) Landcaster, Kluwer Academic Publishers 1990:43-56.

Klassen C D, Waarkins III JB. *Mechanism of bile formation, hepatic uptake, and biliary secretion*. Pharm, Rev 1984; 36:1-67

Kramer, W., Bickel, U., Buscher, H., Gerok, W., Kurtz, G. 1982: *Bile salts binding polypeptides in plasma membranes of hepatocytes revealed by photoaffinity labelling*. Eur. J Biochem., 129, p.13-24.

Kullack-Ublick GA, Haagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. *Functional characterization of basolateral rat liver organic anion transporting polypeptide*. Hepatology

1994;20:411-416

Killenbergh, P.G. *Measurement and subcellular distribution of cholesteryl-coA synthetase and bile acid-co-A: Amino acid N-acyltransferase activities in rat liver.* J. Lipid Res., 1978; 19, p.24-31

Kimelberg HK, Papahadjopoulos D. J Biol Chem 1974;249:1071

Kirkpatrick, R.B., Falany, C.N., Tephly, T.R. *Glucuronidation of bile acids by rat liver 3-OH androgen UDP-glucuronyltransferase.* J. Biol. Chem., 1984; 259, p.6176-6180.

Kremmer T, Wisner MH et Evans WH. *The lipid composition of plasma subfractions originating from three major functional domains of rat hepatocyte cell surface.* Biochim Biophys Acta. 1976; 455:655-664.

Kuhry JG, Duportail G, Bronner C and Laustriat G, *Plasma membrane fluidity measurements on whole living cells by fluorescence anisotropy of trimethylammonium-diphenylhexatriene,* Biochem Biophys Acta 1985, 845, 60

Kuhry JG, Fonteneau P, Duportail G, Maeching C and Laustriat G. *TMA-DPH: a suitable fluorescence polarization probe for specific plasma membrane fluidity studies in intact living cells,* Cell Biophys 1983, 5, 129.

Kuipers F, Havinga R, Vonk RJ. *Cholestasis induced by sulfated glycolithocholic acid in the rat: protection by endogenous bile acids.* Clin Sci 1985; 68:127-134

Kuipers F, Hardonk MJ, Vonk RJ, van der Meer R. *Bile secretion of sulfated glycolithocholic acid is required for its cholestatic action in the rats.* Am J Physiol 1992; 262:G267-273.

Lacaille F, Paradis K. *The immunosuppressive effect of ursodeoxycholic acid: a comparative in vitro study on human peripheral blood mononuclear cells.* Hepatology 1993; 18:165-172.

Lamri Y, Roda A, Dumont M, Feldmann G, Erlinger S. *Immunoperoxidase localization of bile salts in rat liver cells. Evidence for a role of the Golgi apparatus in bile salt transport.* J Clin Invest 1998; 82:1173-1182

Leuschner U, Kurtz W. *Pharmacological aspects and therapeutic effects of UDCA.* Dig Dis 1990; 8:12-22

Leuschner U, Güldütuna S, Dienes H.P, Hellstern A, Zimmer G, Birkenfeld G. *Leuschner, M: Bile acids during treatment of primary biliary cirrhosis. Ursodeoxycholic acid improves membrane stability and influences histological immune reactions in liver tissue.* In: Paumgartner, G, Stiehl A., Gerok W. eds: Bile acids as therapeutic agents. Kluwer, Dordrecht-Boston-London. 1991; 297-299.

Leuschner U, Fisher H, Kurtz W, Hubner K. *Ursodeoxycholic acid in primary biliary*

cirrhosis: results of a controlled double blind trial. Gastroenterology 1989;97:1268-1274.

Leuschner U, Güldütuna S, Bhatti S, You T, Sipos P, Zimmer G. *Cytotoxicity and membrane protection by bile acids.* In *Perspective in Gastroenterology.* Current facts and trend;1995; 153-164.

Leuschner U, Guldutuna , Bhatti S, You T, Sipos P, Zimmer G. *Cytotoxicity and membrane protection by bile acids.* In: **Meyer zum Buschenfelde KH, Paumgartner G, Scholmerich J,** eds. *Perspectives in gastroenterology: current facts and future trends* Baltimore:Urban & Schwarzenber. 1995,153-164

Laffi G., Foschi M., Carloni V. and Melani L. In : *Plasma membrane abnormalities in chronic liver disease.* From: Cholestasis. edited by P.Gentilini , Arias I.M, McIntyre N. and Rodés J 1994,205-212

Lemasters J, Stemkowski CJ, Sungchul J, Thurman RG. *Cell surface changes and enzyme release during hypoxia and reoxygenation in the isolated, perfused rat liver* J Cell biol 1983, 97:778-786.

Lester R. *Bile acids metabolism and cholestasis.* AASLD Postgraduate Course: New frontiers in liver disease. Chicago 1989,III:215-223

Lewis, M.C., root, C. *In vivo transport kineticcs and distribution of taurocholate by rat ileum and jejunum.* Am. J. Physiol.1990; 252:G233-G238

Lichtenberg D., Robson R.J. , Dennis E.A., *Solubilization of phospholipids by dertegent.* Biochim Biophys Acta 1983;737:285-294

Lim, W.C, Jordan, T.W. *Subcellular distribution of bile acid conjugation enzymes.*1981; Biochem. J., 197, p.611-612

Loof, L., Wengle, B.(1979). *Enzymatic sulfation of bile salts in man.* Scand. J. Gastroenterol., 14,p.513-519

Loria P., Bertolotti M., Tripodi A., Dileugite M.A., Carulli N.1991. *Advances in the comprehension of the pathophysiology of bile secretion.* Dig. Dis., 1991; 9; 142-

Lowe PJ., Coleman R. *Membrane fluidity and bile salts damage .* Biochim Biophys Acta 1981:640:55-65.

MacSween RNM. *Mallory's (alcoholic)hyaline in primary biliary cirrhosis.* Clin Pathol 1973;26:340-342

Malavolti M, Fromm H, Ceryak S. Roberts IM. *Modulation of low density lipoprotein receptor activity by bile acids: differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acid in the hamster* J Lipid Res 1987; 28:1281-1295.

- Martin Duce A et al.** *Hepatology* 1988; 8:65.
- Martin K O, Budai K, Javitt NB.** *Cholesterol and 27-hydroxycholesterol 7 α -hydroxylation: evidence for the two different enzymes.* *J Lipids Res* 1993; 34:581-588.
- Matern, S., Gerok, W.** *Pathophysiology of enterohepatic circulation of bile acids . Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*,1979; 85,p.125-204.
- Matern S, Gerok W.** *Pathophysiology of the enterohepatic circulation.* *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1979;85:126-204
- Matern S., Marschall H.-U.:** *Metabolism and conjugation of bile acids in man. from: Perspective in Gastroenterology. Current Facts and Future Trends.* By Meyer K.H, Paumgartner and Schölmerich. 1996,128-135
- Matkò,J., Szollosi, J., Tron, L.,and Damjanovich, S.,** *Luminescence spectroscopic approaches in studying cell surface dynamics,* *Q.Rev. Biophys.* 21.479,1988.
- Matsura S, Eto Sm Katk, Tashiro Y** 1984 *Ferritin immuno-electron microscopic localization of 5'-nucleotidase on rat liver surface* *J cell Biol* 99: 166-173
- MatsuzakiY, Tanaka N, Osuga T et al.** *Improvement of biliary enzyme level and itching as a result of long term administration of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis.* *Am J Gastroenterol.* 1990; 85:15-23.
- Maurice M, Durand-Schreider AM, Garbaz M, Feldmann G.** *Characterzation of rat hepatocyte plasma membrane domains by monoclonal antibodies.* *Eur J Cell Biol* 1985;39:122-129
- Mayer R., Kartenbeck J., Buchler M., Jedlitschky G., Leier I., amd Keppler D.** *Expression of the MRP gene encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes.* *J.Cell Biol* 1995;131:137-150
- Mazella G, Parini P, Bazzoli F, Villanova N, Festi D, Aldni R, et al.** *Ursodeoxycholic acid administration on bile acid metabolism in patients with early stages of primary biliary cirrhosis.* *Dig Dis Sci* 1993;38:896-902.
- Meier PJ, Sztul ES, Reuben A, Boyer JL.** *Structural and functional polarity lf canalicular and basolateral plasma membrane vesicles.* *J Cell Biol* 1984;98:991-1000.
- Meier-Abt PJ.** *Cellular mechanism of intrahepatic cholestasis.* *Drugs* 1990;40(suppl.3):84-97.
- Meier PJ.** *The bile salt secretory polarity of hepatocytes.* *J Hepatol* 1989;9:124-129

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

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

Meier PJ. *Transport Polarity of hepatocytes.* Sem Liv Dis 1988;8.No4293-307

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

Meth SJ , Struthers JE, Kaye Md , Naylor JL. *Gastroenterology* 1974; 67:674-679

MiyaiK, Richardson AL, Mayr W, Javitt NB. *Subcellular pathology of rat liver in cholestasis and choleresis induced by bile salts. 1. Effects of lithocholic, 3 β -hydroxy-5-cholenoic, cholic and dehydrocholic acids.* Lab Invest 1977;36:249-258

Miyai K. University of California, San Diego, School of Medicine. Department of Pathology La Jolla, California. In: *Structural Organization of the Liver.* From : Hepatotoxicology. Robert G. M, Steadman D. H, Richard J. B, 1991;chp 1:1-66

Miyazaki K., Nakayama F., Koga A., *Effect of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on isolated adult human hepatocytes* Dig Dis Sci 1984;29:1123-1130

Mok HYI, von Bergmann K, Grundy SM. *Kinetics of enterohepatic circulation during fasting: biliary lipid secretion and gallbladder storage.* Gastroenterology 1980;78:1023.

Montet J.C. *L'acide ursodésoxycholique: propriétés physiques et activité hépatoprotectrice.* Pathologie Biologie 1991;39;6:621-624

Mullock, B.M., Dobrota, M., Hinton, R.H: *Sources of the proteins of rat bile.* Biochim. Biohphys. Acta 543(1978)497-517

Müller M, Jansen PLM. *Molecular aspects of hepatobiliary transport.* Am J Physiol 1997;35:G1285-G1303

Nakayama F., Miyazaki K., Koga A., *Effect of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on isolated human hepatocytes.* Gastroenterology(abst)1980;78:1228.

Nathanson M.H and Boyer J.L. *Mechanisms and regulation of bile secretion.* Hepatology. 1991; 14: 551-556.

Nishikawa Y, Ulida M, Matsuo R, Omori N, Tsuji T. *Ca⁺⁺ influx initiates death of hepatocytes injured by activation of complement.* Liver 1994;14:200-205.

Oda M, Price VM, Fisher MM, Phillip MJ. *Ultrastructure of bile with special*

reference to the surface coat and the pericanalicular web. Lab Invest 1974; 31: 314-323.

Oguey D, Marti U, Reichen J. *Epidermal growth factor receptor; its possible implication in the maintenance of hepatocellular mass in biliary cirrhosis in the rat.* Eur J Cell Biol 1992;59:187-195.

Ohiwa T, Katagiri K, Hishino M, Hayakawa T, Hakai T. *Tauroursodeoxycholate and taurochenodeoxycholate content.* Hepatology 1993;17:470-476.

O'Maille ERL. *The influence of micelle formation on bile salt secretion.* J Physiol (London) 1980;41:1152-1162.

Ostrow JD. *Metabolism of bile salts in cholestasis in humans.* In: Tavaloni N, Berk PD , eds. *Hepatic transport and bile secretion: physiology and pathophysiology.* New York: Raven Pressm 1993, 673-712.

Okuda, H., Sorrentino, D., Alpini, G., Tavaloni, N, Jones, M.JT., Kiiang C.L. Beck, P.L., 1988, *Bile acid secretion and pool size during phenobarbital induced hypercholesteresis.* Proc. Soc.Exp. Med., 187, p.202-208.

Ortiz P et al. *Cell Biol Rev* 1987; S1:59-66.

Ostrow JD. *Metaboism of bile salts in cholestasis in humans .In: Tavaloni N, Berk PD,eds. Hepatic tranport and bile secretion: physiology and pathobphysiology.* New York: Raven Press, 1993, 673-712

Osuga T, Tanaka N, Matsuzaki Y, Aikawa T. *Effect of ursodeoxycholic acid in chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis* Dig Dis Sci 1989; 34:(suppl):49-51

Ota, S., Tsukahara T. *Protective effect of taurodeoxycholate against chenodeoxycholate-induced damage to cultured rabbit gastric cells* Dig Dis Sc 1991; 30:409-416

Oude Elferink RP, Ottenhoff R, Radomska A, Hofmann AF, Kuipers F, Jansen Pl. *Inhibiiton of glutathione-conjugate secretion from isolated hepatocytes by dipolar bile acids and other organic anions.* Biochem J 1991; 271:281-286

Owen JS, Bruckdorfer KR, Day RC, McIntyre N.J *Lipids Res* 1982; 23:124-132.

Owen JS, Hutton RA, Day RCm Bruckdorfer R, McIntyre N,J *Lipid Res* 1981;22:423-430

Owen JS, Rafique S, Osman E, Burroughs AK. *Drug Invest* 1992;4:22-40

Pandak W.M., Heuman D.M., Hylemon P.B., Vlahcevic Z.R.: *Regulation of bile acid synthesis. IV. Interrelationship between cholesterol and bile acid biosynthesis pathways.* J.Lipid Res. 1990;31:867-872.

Pape GR, Spengler U, Jung MC et al. *Natural history and pathogenesis of primary biliary cirrhosis.* In: **Paumgartner G, Stiehl A, Barbara L., Roda E,** eds. *Strategies for the treatment of hepatobiliary diseases.* Dordrecht: Kluwer academic 1990:69-77

Parente R A and Lentaz BR. *Advantages and limitations 1-palmitoyl-2-(4-6(-phenyl-trans-1,3,5-hexatrienyl)phenyl)ethyl)carboyl)-3-sn-phosphatidy-choline as a fluorescent membrane probe,* Biochemistry 1985;24, 6178.

Parquet, M., Pessah, M., Sacquet, E. et al. *Glucuronidation of bile acids in human liver, intestine and kidney.* FEBS Lett., 189,p.183-187.

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

Petzinger E, Frimmer M. *Driving forces in hepatocellular uptake of phalloidin and cholate.* Biochim Biophys Acta 1984; 778:539

Phillips, M. J, Oda M., Mak E., Fisher M.M., Jeejeebhoy. K.N. *Microfilament dysfunction as a possible cause of intrahepatic cholestasis.* Gastroenterology 1975;69:48-58

Phillips MJ, Satir P. *The cytoskeleton of the hepatocyte: organization, relationships, and pathology* In: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver: biology and pathobiology*, 2nd ed. New York: Raven Press, 1988,11-28.

Phillip Yeagle. *The dynamics of membrane lipids. From The Structure of biological membrane.* 1992; chp3:157-174

Popper H, Schaffner F. *Human Pathol* 1970; 1:1-24

Popper H. *Hepatology* 1981;1:187-191.

Popper H. *Cholestasis: The future of a past and present riddle.* Hepatology 1981;1:187-191

Poupon RE, Poupon R, Balkau B. *Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis.* N Engl J Med 1994;330:1343-1347

Poupon R.E; Balkau B; Eschwege E; Poupon R. *Ursodeoxycholic acid Primary Biliary cirrhosis Study. A multicenter, controlled trial of Ursodiol for the treatment of Primary Biliary cirrhosis .* N Engl J Med 1991;324:1548-54

Poupon RE, Balkau B, Eschwège E, Poupon R and the UDCA-PBC Group. *A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis.* N Engl J Med 1991;324:1548-1554.

Poupon R, Poupon RE, Calmus Y, Chretien Y, Ballet F, Damis F, *Es ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis?* Lancet 1987;i:834-836

Priestly BG, Côté G, Plaa GL; *Biochemical and morphological parametrs of tauroolithochlate-induced cholestasis* . Can J Physiol. Pharmacol. 1971;49:1078-1091.

Princen HMG., Post SM, Twisk J. *Regulation of bile acid biosynthesis*. Curr Pharm Design 1997;3:59-84.

Queneau P.E, Montet JC. *Hepatoprotection by hydrophilic bile salts*. Journal of Hepatology. 1994;21:260-268.

Quist RG. Ton-Nu H-T, Lillienau J. Hofmann AF. Barrett KE. *Activation of mast cells by bile acids* . Gastroenterology 1991;101;446-456

Quist, R., Hofmann, A.F., Baret, K.E., *Activation of mast cells by bile acids* Gastroenterology 1989;96:A691.

Radoominstka, A., Treat, S., Little, J., *Bile acid metabolism and the pathophysiology of cholestasis*. Seminar in liver disease. 1993;13;3:219-234.

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

Rahman, K., Hammond, T.G., Lowe, P.J., Barnwell, S.G., Clark, B., Coleman, R., *Control of biliary phospholipid secretion*. Biochem J 1986: 234:421-427.

Rappaport, A.M., *The microcirculatory hepatic unit*. Microvasc Res 1973;612-628.

Rappaport, A.M., *Anatomic considerations*. In: Schiff L.ed. Diseases lf the liver. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1969:1.

Reichen, J., *Mechanisms of cholestasis*. In: Tavaloni N, Berk PD, eds. Hepatic transport and bile secretion: physiology and paathophysiology. New York: Raven Press, 1993:665-672.

Reichen, J., Simon, F.R., *Cholestasis*. In : The liver: Biology and pathobiology. Arias, I.M., Jakoby, WB., Popper, H., Schachter, D., Shafritz, D.A., eds. Raven Press, New York, 1994:1291-1314.

Reichen, J., Krahenbuhl, S., Zimmermann, H., *Impact of cholestasis on hepatic function: retention of cholephiles and their potential targets*. In: Gentilini, P., Arias, I.M., McIntyre, N., Rodes, J., eds. Cholestasis. New York: Elsevier Science, 1994,167-176.

Renner, E.L., Lake, J.R., Cragoe, E.J., Van, Dyke, R.W., Scharschmidt, B.J., *Ursodeoxycholic acid choleresis: relationship to biliary HC03⁻ and effect of Na⁺/H⁺-exchange inhibitors*. Am J Physiol 1989; 254:G232-241.

Reshef, R., Cohen, L., Shiller, M., Szvalb, S., Loberant, N., *Does ursodeoxycholic acid*

have a place in the treatment of amiodarone-induced cholestasis? J Clin Gastroenterol 1994;18:177-178.

Reyes, H., Simon, F.R., *Intrahepatic cholestasis of pregnancy: an estrogen-related disease.* Semin Liver Dis 1993;13:289-301.

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

Roda, A., Hofmann, A.F., Mysels, K.J., *The influence of bile salt structure on self-association in aqueous solutions.* J Biol Chem 1983;258:6362-70.

Roda, A., Cappelleri, A.G., Aldini, R., Roda, E., Barbara, L., *Quantitative aspect of the interaction of bile acids with human serum albumin.* J Lip Res 1982; 23:490-495.

Rodriguez-Boulan, E. & Nelson, W.J., 1989. *Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype.* Science 245:718-25.

Roger Marthan, *Dans: Physiologie de la membrane cellulaire.* Physiologie humaine 2e édition. Hervé Guénard 1996;

Rosario, J., Sutherland, E.M., Sunib, F.R., Zaccaro, L., *Ethinylestradiol administration selectively alters liver sinusoidal membrane lipid fluidity and protein.* Biochemistry 1988;27: 3939-3946.

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

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

Rudolph, G., Walker, S., Stiehl, A., *Biliary secretion of ursodeoxycholic acid (UDCA), its taurine and glycine conjugates, sulfates and glucuronides in patients with external biliary drainage.* Hepatology 1991; 14:260A(abstract).

Sacquet, E.C., Raibard, P.M., Mejean, C., Riottot, M.J., Leprince, C. et Leglise, P.C. *Bacterial formation of omega-muricholic acid in rats.* Appl. Environ Microbiol. 1979;37:1127-1131

Salvioli G, Lugli R, Pradelli JM. *Effects of bile salts on membranes.* In: Calandra S Carulli N, Salvioli G, eds. Liver and lipid metabolism. New York: Elsevier Science Publishers, 1984:163-179

Sawyer WH. *Fluorescence spectroscopy in the study of membrane fluidity model membrane systems in Methods for studying membrane fluidity*, Aloin RCA ed Alan R Liss New York 1988,161

Schachter D 1994 *The hepatocyte plasma membrane organization and differentiation*. In :*The Liver:: Biology and pathobiology* (Arias IM, Jacoby WB , Popper H, Schachter D and Shafritz DA eds) p145-154

Schaffner F, Popper H, *Electron microscopic study of human cholestasis*. Proc Soc Exp Biol Med 1959; 101:777-779.

Scheibner J., Tauber G., Stange E.F. *Bile acid and cholesterol metabolism*. From: Perspective in Gastroenterology. Current Facts and Future Trends. By Büschenfelde KHMZ, Paumgartner G. and Schölmerich J. 1996:136-142

Schlenker T., Romac JMJ., Sharara Al et al. *Regulation of biliary secretion through apical purinergic receptors in exchange in cholangiocytes*. Am J Physiol 1997;273: G1108-G1117

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

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

Schoemerich J , Straub R, *Mechanisms of bile salt toxicity*. In Lentze M, Reichen J, eds. Paediatric cholestasis. Boston: Kluwer, 1992; 83-1103

Scholmerich J, Baumgartner U, Miyai K, Gerok W. *Tauroursodeoxycholate prevents tauroolithocholate-induced cholestasis and toxicity in the rat liver*. J Hepatol 1990;10:280-283

Scholmerich J., Becher M.S., Schmidt K., Schubert R., Kremer B., Feldhaus S., Gerok W., *Influence of hydroxylation and conjugation of Bile salts on their membrane damaging properties. Studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles*. Hepatology 1984;4:661-667

Schlenker T., Romac JMJ., Sharara Al et al. *Regulation of biliary secretion through apical purinergic receptors in exchange in cholangiocytes*. Am J Physiol 1997;273: G1108-G1117

Schröder O., Rathner W., Caspaary W.F., and Stein J. *Bile acid induced increase of rat colonic apical membrane fluidity and proton permeability*. Gastroenterol 1996;34:365-370

Schubert R, Schmidt K-H. *Structural changes in vesicle membranes and mixed micelles of various lipid compositions after binding of different bile salts.* Biochemistry 1988; 27: 8787-94.

Schubert R, Beyer K, Wolburg H, Schmidt K.H., *Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate.* Biochemistry 1986; 25: 5263-69.

Schubert R, Jaroni H, Schoelmerich J, Schmidt KH. *Studies on the mechanism of bile salt-induced liposomal membrane damage.* Digestion 1983; 28:181-190

Sellinger M, Boyer JL. *Physiology of bile secretion and cholestasis.* Progress in liver disease 1990;9:237-259.

Setchell KDR, Street JM, Sjoval J. *Fecal bile acids In: Setchell KDR, Kritchevsky D Nair PP eds The bile acids volume 4* New York: Plenum, 1988 441-570

Setchell K.D.R.: *Disorders of bile acid synthesis.* In Walker, W.A., Durie, P.R., Hamilton, J.R., Walker-Smith J.A., Watkins J.B.(eds):Pediatric Gastrointestinal Disease. Pahtophysiology, Diagnosis, Mnagement, pp.992-1013. DeKker, Philadelphia 1991.

Setoguchi T, Higashi S, Tateno S, Yahiro K, Katsuki T. *Epimerization of the four 3-7-dihydroxy bile acid epimers by human fecal microorganisms in anaerobic mixed cultures and in feces .* J Lipid Res 1984;25:1246-1256.

Shattuck, K.G., Radomska-Pyrek, A., Zimniak, P. *Metabolism of 24 nor-lithocholic acid in rat: formation of hydroxyl and carboxyl-linked glucuronides and effect in bile flow.* Hepatology, 1986;6, p.869-873.

Sheila Sherlock, James Dooley *Diseases of the liver and biliary syst* 1993

Sherlock S, Dooley JC, *Cholestasis in Diseases of the liver an biliary system* 9 th ed. Oxford: Black well Scientifi Publications 124-235

Sherlock, S., Dooley, J. (1983). *Diseases of the liver and biliary ssystem.* Ninth ed., chap.2 p.17-32. Blackwell Scientific Publications.

Shinitzky, M. and Henkart, P., *Fluidity in model membranes: current concepts and trends,* Int. Rev. Cytol., 60, 121,1979

Shinitzky, M., *Membrane fluidity and cellular functionsm in Physiology of Membrane Fluidity* Shinitzky, M., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1984, chap 1.

Shinitzky M and Barenholz Y. *Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarizaation,* Biochim Biophys Acta 1978; 515,367

Shinitzky M and Barenholz Y., *Dynamics of the hydrocarbon layer in liposomes of lecithin and sphingomyelin containing dicetylphosphate,* J.Biol. Chem., 1974; 249:2653.

Shinitzky M, Dianoux AC, Gitler C and Weber G, *Microviscosity and order in the hydrocarbon regions of micelles and membranes determined with fluorescence probes*. In: Synthetic micelles. Biochemistry 1971,10,2106

Sjoval J. Clin chem Acta 1960; 5:33-41

Simon FR et al. Hepatology 1990; 12:1001

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

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

Smith, R.L. and Oldfield, E., *Dynamic structure of membranes by deuterium NMR*, Science, 225,280, 1984.

Smith DJ, Gordon ER. *Membrane fluidity and cholestasis*. J Hepatology 1987;5:362-365.

Smith and Wood. *Cells: an introduction* . From: Cell Biology.2nd ed.1996;1-52

Smit J.J., Schinkel A.H., Oude Elferink R.P., Groen A.K., Wagenaar M.A., Valk M.A.V.D., Offerhaus J.A., Berns A.J.M., and Borst P. *Homozygous disruption of the murine mdr2P glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease*. Cell .1993;75:451-462.

Sol M. Gruner. *Nonlamellar lipid phases*. From The Structure of biological membrane.1992; chp5: 211-250.

Somjen G J, Gilat J T. *Contribution of vesicular and micellar carriers to cholesterol transport in human bile*. J Lipid Res 1985;26:699-704.

Spaeth, D. g., Schneider, D.L. *Taurine synthesis, concentration and bile salt conjugation in rat, guinea pig and rabbit*. Proc. Sci. Exp. biol Med.,1974; 147, p.855-858.

Spector AA, Yorek MA. *Membrane lipid composition and cellular function* . J Lipid Res 1985;26:1015-1035

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

Spivey JR, Bronk SF, Gores GJ. *Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes*. Role for ATP depletion and cytosolic free calcium. J Clin Invest 1993; 92:17-24.

Stiehl, A., Czygan, P., Frhling , W., Liersh, M., Kommerell, B.(1976).*Sulfatation of biles acids* , in L. Bianchi, W. Gerok, K. Sickinger(ed): Liver and bile. p.129-138. University Park

Press, Baltimore

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

Stiehl A, Raedsch R, Rudolph G. *Acute effects of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on the small intestinal absorption of bile acids.* Gastroenterology 1990; 98:424-428.

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

Stiehl A. *Pattern of bile acids in cholestasis .* In:Gentilini P, Arias IM, McIntyre N, Rodes J, eds. Cholestasis. New York: Elsevier Sciencem 1994,231-238

Stolzenbach, F: *Lactate dehydrogenase.* Methods Enzymol 9(1966)278-288.

Stolz A, Rahimi-Kiani M, Ameis D, Chan E, Ronk M, Shively JE. *Molecular structure of rat hepatic 3 α -hydroxysteoid dehydrogenase. A member of the oxidoreductase gene family.* J Biol Chem 1991;266:15253-15257.

Stolz A, Sugiyama Y, Kuhlenkamp J, Kaplowitz,N. 1984 *Identification and purification of a 36 kDa bile acid binder in human hepatocytic cytosol.* Febs Lett.,177, p.31-35

Stolz, A., Takikawa, J., Ookhtens, M., Kaplowitz, N, 1989. *The role of cytoplasmic proteins in hepatic bile acid transport.* Ann. Rev.Physiol., 51, p.161-176.

Strange RC. *Hepatic bile flow.* Physiol Rev 1984;64:1055-1103.

Stravitz RT, Hylemon PB, Heuman DM, Hagey LR, Schteingart CD, Ton-Nu H-T, Hofmann AF, Vlachcevic ZR. *Transcriptional regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA by conjugated bile acids in primary cultures of rat hepatocytes.*J Biol Chem 1993;268:13987-13993.

Suchy J.F., Sippel J. and Ananthananrayanan M. *Bile acid transport across the hepatocyte canalicular membrane.* FASEB J. 1997;11:199-205.

Suchy, F.J., Courchene, S.M., Balistrery,W.F(1985). *Ontogeny of hepatic bile and conjugation in the rat.* Pediat. Res., 19, p.97-101,

Suchy FJ. *Hepatocellular transport of bile acids.* Semin Liver Dis 1993;13:235-247.

Suchy F J, Courchene S M, Balistreri W F. *Ontogeny of hepatic bile and conjugation in the rat.* Pediatar Res 1985;19:97-101

Sugiyama, Y., Yamada, T., Kaplowitz, N 1983 *Newly identified bile acid binders in rat liver cytosol. Purification and comparison with glutathione-S-transferase.* J.Biol. Chem., 258,p.3602-3607

Tanaka K, Omori K, Tashiro Y. *Quantitative immunoferritin localization of leucine aminopeptidase on canine hepatocyte cell surface.* J Histochem Cytochem 1986; 34:775-784

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

Terasaki S, Nakanuma Y, Ogino H, et al . *Hepatocellular and biliary expression of HLA antigens in primary biliary cirrhosis: effect of ursodeoxycholic acid.* Hepatology 1990;11:12.

Thibault, N., Maurice, M., Maratrat, M., Cordier, A., Feldmann, G., Ballet, F.:*Effect of tauroursodeoxycholate on actin filament alteration induced by cholestatic agents. A study i isolated rat hepatocyte couplets.* J. Hepatol .1993;19:367-376.

Thibault N, Ballet F, *Effects of bile acids on intracelohular calcium in isolated rat hepatocyte couplets.* Biochem Pharmacol 1993; 45:289-293.

Thomas M Delvin In Précis de Biochimie , Eds 5 . Harper HA, Rodwell VW, Mayes P.A. Les Presses de l'Université de Laval. Québec: 1982.

Thomas M Delvin. *Biological memb structure and membrabe transport.* Textbook of chemistry 1992 chp 5

Toshiaki N, Toshihide S, Yoshikuni S, Toshikazu N, Yoshifumi S, Atsushi S, Masaki O and Kei k. *Effects of bile acids and taurine on the lipid fluidity of hepatic microsomes in normal and bile duct-ligated rats. A spin label study.* Journal of Hepatology.1993;18:74-79.

Tuchweber B, Weber A, Roy CC , Yousef IM. *Mechanisms of experimentally induced intrahepatic cholestasiss.* Prog Liver Dis 1986;8:161-178

Turley S D, Dietschy J M. *The metabolism and excretion of cholesterol by the liver.* In: Arias I M, Jakoby W B, Poper D, Schchter D, Shafritz, Eds. Raven Press Ltd., New York . The Liver: biology and pathobiology 1988; 631-636.

Utili R, Tripodi MF, Adolfini LE, Gaeta GB, Abernathy CO, Zimmerman HJ. *Estradiol-17 β D--glucuronide(E-17G) cholestasis in perfused rat liver:fate of /-17G and choleric responses to bile salt.* Hepatology 1990;11:735-742.

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

Vanderloi J and McLaughlin A . *Use of fluorescence probes in the study of membrnane*

structures and function in Biochemical fluorescence: Concepts, Vol 2, Chen RF and Edelhoeh H, Eds Marcel Dekker, New York 1976,737

Van Eyken P, Sciote R, Desmet V. *A cytokeratin immunohistochemical study of cholestatic liver disease: evidence that hepatocytes can express "bile duct-like" cytokeratins.* *Histopathology* 1989;15:125-135

Vial JD, Simon FR, Mackinnon M. *Effect of bile duct ligation on the ultrastructural morphology of hepatocytes.* *Gastroenterology* 1976; 70:85-92.

Vital A, Bioulac-Sage P, Iron A, Balabaud C. *Morphologic structure of bile canaliculi after bile duct ligation in the rat. A time course study.* *Arch Pathol Lab Med* 1982;106:464-467.

Vu DD, Tuchweber B, Raymond P, and Yousef IM. *Tight junction permeability and liver plasma membrane fluidity in lithocholate-induced cholestasis.* *Experimental and molecular pathology.* 1992;57:47-61.

Vyvoda OS., Coleman R., Holdsworth G. *Effects of different bile salts upon the composition and morphology of a liver plasma membrane preparation.* Deoxycholate is more membrane damaging than cholate and its conjugates. *B.B.A* 1977;465:68-77

Vlahcevic Z.R, Pandak WM, Heuman D.M., Hylemon P.B. *Function and regulation of hydroxylases involved in bile acid biosynthesis pathways.* *Sem Liv Dis* 1992;12:403-419.

Vlahcevic Z.R, Heuman D.M., Hylemon P.B. *Regulation of bile acid synthesis.* *Hepatology* 1991;13:590-600.

Vlahcevic ZR., Heuman DM, Hylemon PB. *Physiology and Pathophysiology of enterohepatic circulation of bile acids.* From *Hepatology. A textbook of Liver disease.* Zakim Boyer. third ed. 1996;1:376-417

Von RJ, Yousef IM, Corriveau JP, Tuchweber B. *Phalloidin-induced morphological and functional changes of rat liver* *Liver* 1982; 2:133-140

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

Vu DD, Tuchweber B, Raymond P, and Yousef IM. *Tight junction permeability and liver plasma membrane fluidity in lithocholate-induced cholestasis.* *Experimental and molecular pathology.* 1992;57:47-61.

Vyvoda OS., Coleman R., Holdsworth G. *Effects of different bile salts upon the composition and morphology of a liver plasma membrane preparation.* Deoxycholate is more membrane damaging than cholate and its conjugates. *B.B.A* 1977;465:68-77

Vuoristo M, Farkkila M, Karvonen A-L, Leino R, Lehtola J, Makinen J, et al . *A placebo-controlled trial of primary biliary cirrhosis treatment with colchicine and ursodeoxycholic acid.* Gastroenterology 1995;108:1470-1478

Wanatabe N, Tsukada N, Smith CR, Phillips MJ. *Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow.* J Cell Biol 1991; 113:1069-1080.

Wanatabe N, Tsukada N, Smith CR, Edwards V, Phillips MJ. *Permeabilized hepatocyte couplets: adenosine triphosphate-dependent bile canalicular contractions and a circumferential pericanalicular microfilament belt demonstrated.* Lab Invest 1991;65:314-323.

Wanatabe S, Smith CR, Phillips MJ. *Coordination of the contractile activity of bile canaliculus: evidence from calcium microinjection of triplet hepatocytes.* Lab Invest 1985;53:275-280.

Ward A, Brogden AN, Heel RC, Speight TM, Avery GS. *Drugs* 1984; 27:95-131

Weber AM , Tuchwber B, Uousef IM, et al *Sever familial cholestasis in North American Indian children: a clinical model of microfilament dysfunction?* Gasstroenterology 1981;81:653-662.

Weibel ER. *Stereological approach to the study of cell surface morphometry.* Sixth European Congress on Electron Microscopy 1976;6-9.

Wieland T, Nassal M, Kramer W, et al. *Identity of hepatic membrane transport systems for bile salts, phalloidin, and antamanide by photoaffinity labeling.* Proc Natl Acad Sci USA 1984;81:5232.

Wilton JC, Mathews GM, Burgoyne RD, Mils CO, Cipman JH, Coleman R, *Fluorescent choleric and cholestatic bile salts take different paths across the hepatocytes: transcytosis of glcolithocholate lesds to an extensive redistribution of annexin II.* J Cell Biology 1994; 127: 401-410.

Wright N, Alison M. *The Biology of Epithelial Cell Populations, Vol 2.* Oxford, Clarendon Press, 1984:880.

Yasuura S, Ueno T, Waatanabe S, Jirose M, Mamihisa T. *Immunocytochemical localization of myosin in normal and phalloidin-treated rat hepatocytes.* Gastroenterology 1989;97:982-989

Yeagle PL. *Cholesterol and the cell membrane.* Biochim Biophys Acta 1985;822:267-287

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

Yousef I.M., Barnwel S.G., Tuchweber B., Weber A. and Roy C.C. *Hepatology*. 1987; 7:535-542

Yousef I.M., Barnwel S.G., Gratton F., Tuchweber B., Weber A. and Roy C.C., Am J. Physiol. 1987; 252, G84-G91

Yousef I, Mignault D, Tuchweber B. *Effect of complete sulfation of bile acids on bile formation: role of conjugation and number of sulfate groups.* *Hepatology* 1992;15:438-445

Yousef I.M., Tuchweber B, Weber A et Roy CC. *Contribution of the fluid phase endocytosis to bile flow in cholestasis and choleresis in rats.* *Proc Soc Exp Biol Med.* 1988; 189:147-151.

Yousef IM, Tuchweber B, Vonk RK, Masse D, Audet M, Roy CC. *Lithocholate cholestasis: sulfated glycolithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats.* *Gastroenterology* 1981;80:233-241.

Yousef IM, Magnusson R, Price V, Fisher M. *Bile acid metabolism in mammals. B. Studies on the sex difference in response of the isolated perfused rat liver to chenodeoxycholic acid.* *Can J Physiol Pharmacol* 1973;6:418-423

Yousef I M, Bloxam D L, Phillips M J, Fisher M M. *Liver cell plasma membrane lipids and the origin of biliary phospholipids.* *Can J Biochem* 1975; 53:989-997

Yousef IM, Barnwell S, Gratton F, Tuchweber B, Weber A, Roy CC. *Liver cell membrane solubilization may control maximum secretory rate of cholic acid in the rat.* *Am J Physiol* 1987;252:G84-G91

Yousef IM, Barnwell S, Gratton F, Tuchweber B, Weber A, Roy CC. 1987 *Hepatology* 7,535-542

Yousef I M, Bradley WG, Yousef M K, *Bile acid composition of some lizards from South Western United States.* *Proc Soc Exp Biol Med.* 1977;154:22-26.

Zhao XM, Montet AM, Montet JC. *Muricholic acid: a new hepatoprotective agent.* *J Nutr Biochem* 1993;4:105-112

Zimniak P, Radomska A, Lester R. *The pathogenesis of cholestasis.* *Hosp Pract* 1990; 25:107-125.

Zoboulis-Vafiadis I, Dumont M, Erlinger S. *Conjugation is rate limiting in hepatic transport of ursodeoxycholate in the rat.* *Am J Physiol* 1982;243:G208-213.