

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Effets des phospholipides alimentaires sur le métabolisme des lipides
du plasma et du foie, ainsi que sur la sécrétion des lipides biliaires
chez le rat.**

par

Marie-Josée LeBlanc

Département de Nutrition
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études Supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
En nutrition

Décembre, 2000



©Marie-Josée LeBlanc, 2000

QU

145

U58

2002

v. 009



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Effets des phospholipides alimentaires sur le métabolisme des lipides du
plasma et du foie, ainsi que sur la sécrétion des lipides biliaires chez le
rat

Présentée par:

Marie-Josée LeBlanc

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury

Directrice de recherche

Membre du jury

Membre du jury

Examineur externe

Représentant du doyen

Thèse acceptée le:

SOMMAIRE

Les phospholipides biliaires, majoritairement sous forme de phosphatidylcholine, sont essentiels pour assurer la solubilisation du cholestérol et pour protéger la membrane canaliculaire contre l'effet cytotoxique des acides biliaires. Par ailleurs, des études préliminaires effectuées dans nos laboratoires démontrent que les phospholipides alimentaires provenant de la fève de soya stimulent la sécrétion du flux et des lipides biliaires, notamment celle du cholestérol. D'autres recherches ont rapporté qu'une diète enrichie en phospholipides pouvait diminuer le cholestérol plasmatique. D'une part, les phospholipides alimentaires semblent stimuler les fonctions sécrétoires de l'hépatocyte en association avec l'augmentation de la sécrétion de la phosphatidylcholine biliaire. D'autre part, la diminution du cholestérol plasmatique, de pair avec la stimulation de la sécrétion biliaire du cholestérol, semblent influencer l'homéostasie du cholestérol et favoriser l'excrétion du cholestérol vers la bile.

La présente recherche a été entreprise dans le but d'étudier les effets des phospholipides alimentaires et d'une de ses composantes, la choline, sur la sécrétion des lipides biliaires, ainsi que des lipides hépatiques et plasmatiques. Également, le potentiel hépatoprotecteur des phospholipides alimentaires dans la cholestase induite par l'acide tauroolithocholique, un acide biliaire cholestatique, a été examiné. Les travaux ont été menés chez des rats mâles et soumis à trois types de diètes, soient une diète enrichie en phospholipides, une diète enrichie en choline, ces deux diètes étant comparées à une diète contrôle. Ces traitements alimentaires ont été d'une durée de deux semaines.

En accord avec les résultats précédents, nous avons observé une stimulation du flux biliaire et des lipides biliaires, notamment celle du cholestérol, par la diète enrichie en phospholipides. La choline alimentaire a augmenté le flux biliaire en plus d'augmenter la sécrétion des acides biliaires et des phospholipides biliaires. Cependant, les modifications concernant la sécrétion des lipides biliaires n'étaient pas statistiquement significatifs. Dans un contexte de cholérèse-cholestase induite par l'infusion en doses croissantes de l'acide taurocholique, ces diètes ont augmenté le flux biliaire et la

capacité à transporter les acides biliaires, entraînant une augmentation simultanée du taux de sécrétion maximale des phospholipides et du cholestérol (dans le cas de la diète enrichie en phospholipides seulement). Ce premier volet nous révèle donc que l'effet bénéfique des phospholipides alimentaires, soit la réduction des effets cholestatiques suite à l'infusion de fortes doses d'acides biliaires, peut être attribué à la choline, une composante de la phosphatidylcholine. Également, ces deux diètes ont augmenté la sécrétion totale des phospholipides biliaires pendant le taux de sécrétion maximale, suggérant un accroissement du carrefour métabolique hépatique des phospholipides destinés à la bile. Au niveau plasmatique et hépatique, les phospholipides alimentaires ont induit un effet hypocholestérolémiant en diminuant le contenu en cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité, en plus de diminuer le contenu hépatique des lipides totaux, des triglycérides, et du cholestérol (particulièrement sa forme estérifiée). Notons que les observations morphologiques viennent corroborer les résultats de l'analyse chimique qui démontre une diminution du contenu en lipides hépatiques.

Les observations constatées au cours de la première étude nous révèlent donc que les phospholipides alimentaires stimulent la sécrétion des lipides biliaires et modifient le profil des lipides totaux au niveau hépatique (diminution du cholestérol libre et estérifié) et plasmatique. Ces résultats suggèrent que l'homéostasie du cholestérol hépatique a été modifiée par la diète enrichie en phospholipides. En effet, l'activité des enzymes clefs de la régulation du métabolisme du cholestérol dans le foie a été modifiée par ce traitement alimentaire, en particulier l'acyl coenzyme A : cholestérol acyltransférase. L'activité de cette enzyme a été diminuée à près de 75%, cette baisse marquée étant concomitante avec la diminution de la sécrétion des lipoprotéines de très faible densité. Il est d'ailleurs démontré qu'une diminution de l'activité de cette enzyme, de pair avec une diminution de la synthèse de l'ester de cholestérol, peut régulariser la sécrétion des lipoprotéines de très faible densité. Également, l'accroissement du carrefour métabolique des acides biliaires et leur nature plus hydrophobe ont certainement contribué à la baisse de l'activité de l'acyl coenzyme A : cholestérol acyltransférase et à la faible hausse de l'activité de la cholestérol 7 α -hydroxylase. Les triglycérides provenant de la diète n'ont été ni accumulés au niveau

du foie, contrairement à une augmentation chez le groupe contrôle, ni dirigés vers les lipoprotéines, comme en fait foi la diminution du contenu en triglycérides des lipoprotéines de très faible densité. Il semble plutôt que les acides gras de ces triglycérides permettent la réacylation de la phosphatidylcholine, contribuant ainsi à l'accroissement du carrefour métabolique hépatique de la phosphatidylcholine destinée à la sécrétion biliaire. Cet apport important de la phosphatidylcholine vers la membrane canaliculaire, observés lors de la période précédant l'infusion d'acide biliaire (période de base), ou suite à l'infusion des acides biliaires semble protéger cette membrane et favoriser la sécrétion du cholestérol biliaire. Le contenu protéique des P-glycoprotéines *mdr2* et *spgp*, transporteurs de la phosphatidylcholine et des acides biliaires au niveau de la membrane canaliculaire, n'a pas été modifié par la diète enrichie en phospholipides, suggérant que l'augmentation des lipides biliaires observée chez ce groupe se produit sans modulation de ces protéines de transport. L'augmentation modérée de l'activité de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A reductase, associée à une augmentation de la fluidité membranaire, a certainement contribué à cette augmentation. Toutefois, une contribution majeure de cholestérol de la bile proviendrait de source extrahépatique, c'est-à-dire le cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité dans le plasma. Nos résultats, combinés avec la baisse du cholestérol lié aux lipoprotéines de haute densité, suggèrent une stimulation de la capture hépatique de la phosphatidylcholine et du cholestérol liés aux lipoprotéines de haute densité, tel que proposé par Polichetti et collaborateurs.

Les phospholipides alimentaires s'avèrent non seulement bénéfiques contre la cholestase induite par l'acide taurocholique mais également contre l'acide tauroolithocholique, un acide biliaire cholestatique et plus toxique. En effet, ce traitement alimentaire a atténué remarquablement la cholestase induite par l'infusion de cet acide biliaire chez le groupe contrôle et a maintenu la sécrétion des lipides biliaires, notamment celle du cholestérol. L'action bénéfique de cette diète pourrait être attribuée à une plus grande excrétion de l'acide biliaire toxique sous sa forme initiale, contrairement à une accumulation dans l'hépatocyte chez le groupe contrôle. Ainsi, l'excrétion biliaire accrue de l'acide tauroolithocholique et du cholestérol diminue leur

insertion dans la membrane, cette insertion étant le principal mécanisme d'action proposé dans la cholestase induite par l'acide tauroolithocholique. Par ailleurs, le transport vésiculaire ainsi que le contenu protéique des transporteurs membranaires mdr2 et spgp ont été maintenus par la diète enrichie en phospholipides durant l'infusion de cet acide biliaire, contrairement à une diminution de ces deux paramètres chez le groupe contrôle. La capacité de la diète enrichie en phospholipides à excréter l'acide tauroolithocholique pourrait donc être associée à la stimulation de la sécrétion des lipides biliaires, en particulier celle du cholestérol via le transport vésiculaire.

En somme, les travaux présentés ici démontrent que les phospholipides alimentaires procurent des effets bénéfiques en stimulant le flux biliaire et la sécrétion des lipides biliaires, notamment celle du cholestérol. Cette mobilisation des lipides vers la bile, associée en grande partie aux lipoprotéines de haute densité, serait responsable des effets hypocholestérolémiantes et hépatoprotecteurs observés lors de la période de base, ou en période cholestatique. La diminution marquée de l'activité de l'acyl coenzyme A : cholestérol acyltransferase et des lipoprotéines de très faible densité induite par cette diète reproduit les effets des inhibiteurs de l'acyl coenzyme A : cholestérol acyltransferase et s'avère une intervention nutritionnelle intéressante dans la prévention des maladies vasculaires dont l'athérosclérose. Également, ce travail offre des avenues de recherche prometteuses en ce qui a trait à la protection potentielle contre des pathologies hépatiques telle que la cholestase intrahépatique familiale progressive de type 3.

À Martin

À Éloïse et Émile

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier Beatriz Tuchweber, ma directrice de thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et guidée tout au long de mes études doctorales. Son enthousiasme et son intérêt scientifique ont été grandement appréciés au cours de la réalisation de ce projet. Je voudrais également remercier Émile Lévy, mon co-directeur de thèse, pour son appui et ses conseils judicieux qui ont su éclairer ma démarche scientifique. À tous les deux, mes plus chaleureux remerciements et toute ma reconnaissance.

À Maurice Audet, pour son aide et assistance technique, et pour son amitié.

À mes collègues, Claude Barriault, Stéphanie Chevalier, France Guertin, Abdelhamid Kerkadi, Sylvain Brunet, Kyoko Matsuba, un grand merci pour leurs conseils et leur support amical.

Je tiens à remercier chaleureusement Réjeanne Vigneau pour son aide précieuse à la préparation de ce manuscrit et Edna Boudreau qui, par son amour et sa grande générosité envers mes enfants, a su m'apporter la paix d'esprit.

Je désire exprimer ma plus profonde gratitude à mes parents et toute ma famille, ainsi qu'à mes amis pour leur appui inconditionnel. Ceci s'adresse particulièrement à Martin qui, tout au long de ce projet, m'a soutenu et aidé avec beaucoup de ferveur et générosité.

	<u>page</u>	
1.4	Formation et sécrétion des phospholipides et cholestérol biliaires	15
1.4.1	Origine des phospholipides	15
1.4.1.1	Phospholipides de source hépatique	16
1.4.1.2	Phospholipides de source extrahépatique (transportés par les lipoprotéines)	17
1.4.2	Origine du Cholestérol	17
1.4.2.1	Cholestérol de source hépatique	18
1.4.2.2	Cholestérol de source extrahépatique (transporté par les lipoprotéines)	18
1.4.3	Le transport des phospholipides et du cholestérol	19
1.4.3.1	Transport intrahépatocytaire	19
1.4.3.1.1	Transport vésiculaire	20
1.4.3.1.2	Transporteurs protéiques du cytoplasme	21
1.4.3.2	Transport canaliculaire	22
1.5	Sécrétion canaliculaire des lipides biliaires	25
1.5.1	Vésicules canaliculaires	25
1.6	Modèles de vésiculation proposés	26
1.7	Modulation du transport et de la sécrétion canaliculaire par les acides biliaires	29

	<u>page</u>
2. Cholestase intrahépatique	31
2.1 Définition	31
2.2 Cholestase induite par les acides biliaires	31
2.2.1 Cholestase induite par des doses croissantes d'acides biliaires	32
2.2.2 Cholestase induite par les acides biliaires monohydroxylés	34
2.2.2.1 Perturbations observées	35
2.2.2.2 Mécanismes proposés	36
2.2.2.2.1 Augmentation de la nouvelle synthèse du cholestérol	36
2.2.2.2.2 Liaison entre ALT et les protéines cytoplasmiques	36
2.2.2.2.3 Modification de la composition lipidique de la membrane canaliculaire	37
2.2.2.2.4 Interaction ALC et calcium	38
2.2.2.3 Sulfatation et de glucuronidation des acides biliaires	40
2.2.3 Acides biliaires atypiques	40
3. Effets des phospholipides alimentaires sur l'homéostasie du cholestérol et la sécrétion des lipides biliaires	41
3.1 Métabolisme de la choline et des phospholipides	41
3.1.1 Métabolisme de la choline libre	41
3.1.2 Définition et structure des phospholipides	42

	<u>page</u>
3.1.3 Métabolisme hépatique de la phosphatidylcholine	42
3.1.3.1 Biosynthèse par la voie de la CDP-choline	44
3.1.3.2 Biosynthèse par la voie de la methylation de la PE	45
3.2 Métabolisme hépatique du cholestérol	48
3.2.1 Biosynthèse du cholestérol	48
3.2.2 Régulation de la biosynthèse	49
3.2.2.1 L'HMG-CoA reductase	49
3.2.2.2 La ACAT	50
3.2.2.3 La cholestérol 7alpha-hydroxylase	51
3.2.3 Transport du cholestérol par les lipoprotéines	52
3.3 Effets des phospholipides de la diète	55
3.3.1 Effets sur les fonctions hépatiques	55
3.3.3 Effets sur la sécrétion des lipides biliaires	58
4. But de la présente étude	59
CHAPITRE 2. ARTICLE I	62
Abstract	64
Introduction	65
Materials and methods	66
Results	69
Discussion	72
References	76

	<u>page</u>
CHAPITRE 3. ARTICLE II	90
Abstract	92
Introduction	93
Materials and methods	94
Results	98
Discussion	100
References	103
CHAPITRE 4. ARTICLE III	119
Abstract	121
Introduction	122
Materials and methods	123
Results	126
Discussion	129
References	133
CHAPITRE 5. DISCUSSION GENERALE	149
5.1 Modifications biliaires suite aux traitements alimentaires	151
5.2 Modifications plasmatiques suite aux traitements alimentaires	153
5.3 Modifications hépatiques suite aux traitements alimentaires	155
5.3.1 Contenu des lipides hépatiques	155
5.3.2 Modifications du contenu lipidique des membranes canaliculaires	156
5.3.3 Modifications morphologiques des hépatocytes	156

	<u>page</u>
5.4 Effets des traitements alimentaires durant l'infusion de l'acide taurocholique	157
5.4.1 Effet sur la sécrétion biliaire et le transport maximal des acides biliaires	157
5.4.2 Effet sur la composition lipidique des membranes hépatiques	158
5.4.3 Effet sur le profil en acides gras de la PC biliaire	159
5.5 Effets des phospholipides alimentaires sur l'homéostasie du cholestérol hépatique	159
5.5.1 Avenues mécanistes	160
5.5.1.1 Effets sur les enzymes régulatrices du cholestérol hépatique	160
5.5.1.2 Effets sur la composition lipidique des membranes microsomales	161
5.5.1.3 Effets sur le pool hépatique d'acides biliaires	162
5.5.1.4 Effets sur les protéines de translocation des lipides biliaires de la membrane canaliculaire	162
5.5.1.5 Effets sur le profil lipoprotéique	163
5.6 Effets des phospholipides alimentaires contre la cholestase induite par l'acide tauroolithocholique	164
5.6.1 Modifications du flux et des lipides biliaires	164
5.6.2 Avenues mécanistes	166
5.6.2.1 Modifications du système de transport vésiculaire	166
5.6.2.2 Modifications du fonctionnement de la membrane canaliculaire	167
5.6.2.3 Modifications de l'activité des transporteurs protéiques de la membrane canaliculaire	168

	<u>page</u>
CONCLUSION	170
BIBLIOGRAPHIE	175

LISTE DES FIGURES

	<u>page</u>
Chapitre 1. Revue de la littérature	
Figure 1: Transporteurs hépatiques des acides biliaires	9
Figure 2: Transporteurs hépatiques des phospholipides et du cholestérol	19
Figures 3 et 4: Modèles de vésiculation lipidique proposés dans la lumière canaliculaire	28
Figure 5: Mécanismes impliqués dans la cholestase induite par les AB	35
Figure 6: Mécanismes impliqués dans la cholestase induite par l'ATLC	39
Figure 7: Structures moléculaires des principaux phospholipides et la Sphingomyéline	43
Figure 8: Étapes de la biosynthèse de la PC et la PE	47
Figure 9: Structure moléculaire du cholestérol	49
Figure 10: Mécanismes de régulation de la HMG-CoA	53
Figure 11: Mécanismes de régulation de la cholestérol 7 α -hydroxylase	53

	<u>page</u>
Chapitre 2. Article I	
Figure 1: Plasma lipids	86
Figure 2: Light microscopy of liver	87
Figure 3: Bile flow and biliary lipid secretion during taurocholic acid infusion	88
Figure 4: Phospholipid and cholesterol secretion rate during taurocholic acid infusion	89
Chapitre 3. Article II	
Figure 1: Values of bile acid pool, and bile acid, phospholipid and cholesterol secretion rate of bile	113
Figure 2: Plasma lipids	114
Figure 3: Plasma lipoproteins	115
Figure 4: Activity of liver HMG-CoA reductase, cholesterol 7 alpha-hydroxylase and ACAT	116
Figure 5: P-gps and spgp protein levels in membranes fractions	117
Figure 6: Relative area of C219 and spgp protein expression	118

	<u>page</u>
Chapitre 4: Article III	
Figure 1: Bile flow and bile acid secretion rate during the infusion of TLCA	142
Figure 2: Phospholipid and cholesterol secretion rate during the infusion of TLCA	143
Figure 3: Distribution of injected radio labeled materials derived from TCA in blood,liver and bile	144
Figure 4: Time course of disappearance of TCA C- ¹⁴ from blood	145
Figure 5: Biliary secretion of alkaline phosphatase (ALP) and phosphodiesterase-1 (PDE-1)	146
Figure 6: Biliary output of HRP after an intraportal vein injection	147
Figure 7: P-gps and spgp protein levels in membranes fractions before and after TLCA infusion	148

LISTE DES TABLEAUX

page**Chapitre 1. Revue de littérature**

Tableau 1: Principaux composés de la bile 2

Chapitre 2. Article I

Table 1: Composition of diet 80

Table 2: Hepatic lipid concentration 81

Table 3: Bile flow and biliary lipid secretion rate 82

Table 4: Percent of bile acid composition of bile 83

Table 5: Biliary phospholipid classes and total fatty acid composition of PC during basal period and after taurocholic acid infusion 84

Table 6: Lipid composition and fluorescence polarization of membranes 85

Chapitre 3. Article II

Table 1: Chemical composition of plasma lipoproteins 110

Table 2: Hepatic lipid content 111

Table 3: Lipid composition and fluorescence polarization of microsomes 112

Chapitre 4. Article III

Table 1:	Biliary secretion of bile acids	139
Table 2:	Percentage of LCA excreted in bile	140
Table 3:	Relationship between biliary secretory rates of canalicular enzymes and LCA secretory	141

LISTE DES ABREVIATIONS

AB	acide biliaire
ABC	ATP binding cassette
ACAT	acyl cholesterol acyl transferase
ALC	acide lithocholique
ATC	acide taurocholique
ATLC	acide taurolithocholique
ATP	adénosine triphosphate
bsep	mouse bile salt export pump
BSEP	human bile salt export pump
Ca	calcium
CCT	cytidyltransferase
CIH	cholestase intrahépatique
cmoat	canalicular multiple organic anion transporter
CTP	cytidine triphosphate
DIAB	débit biliaire indépendant des acides biliaires
FABP	liver fatty acid binding proteins
HDL	high density lipoprotein
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
HRP	horseradish peroxidase
IBABP	ileal cytosolic binding protein
LCAT	lecithin cholesterol acyl transferase
LDL	low density lipoprotein
mdr	mouse multidrug resistant protein
MDR	human multidrug resistant protein
mEH	rat microsomal epoxide hydrolase
MRP	multidrug resistance proteins
ntcp	mouse sodium-TCA co-transporting protein
NTCP	human sodium-TCA co-transporting protein
oatp	mouse rat organic anion transporter

OATP	human rat organic anion transporter
PC	phosphatidylcholine
Pc-tp	mouse phosphatidylcholine transfer protein
PC-TP	human phosphatidylcholine transfer protein
PE	phosphatidylethanolamine
PEMT	PE N-methyltransferase
PFIC	progressive familial intrahepatic cholestasis
P-gp	P-glycoprotein
SCP	sterol carrier protein
spgp	mouse sister P-glycoprotein
SPGP	human sister P-glycoprotein
SR-B1	scavenger receptor class B-1
TSm	taux de sécrétion maximale
VLDL	very low density lipoprotein
Y'	3-alpha-hydroxy-steroid deshydrogenase

CHAPITRE 1: INTRODUCTION: REVUE DE LA LITTÉRATURE

1. Sécrétion de la bile et des lipides biliaires

La formation et la sécrétion de la bile par les hépatocytes constituent une fonction hépatique de grande importance dans l'élimination de composés exogènes (toxines, médicaments) et endogènes (cholestérol, bilirubine). La sécrétion biliaire favorise l'absorption des lipides alimentaires et contribue à l'immunité intestinale, en plus de délivrer au système digestif des antioxydants comme le glutathion réduit. Au cours de ce processus, les acides biliaires assurent l'absorption des lipides de la diète par la circulation entéro-hépatique (Sellinger et Boyer 1990).

1.1 Mécanisme de formation de la bile canaliculaire

La bile est une solution aqueuse isotonique dont la composition varie selon les espèces animales, les conditions nutritionnelles et physiologiques. Ce fluide jaune-verdâtre est composé d'eau et de matières solides parmi lesquelles on retrouve des composés organiques et inorganiques (Strange 1984). Les principaux composés organiques sont les acides biliaires, les phospholipides, le cholestérol et les pigments biliaires tandis que les principaux composés inorganiques sont les ions dérivés du plasma. Les principaux composés biliaires sont énumérés dans le **tableau 1**.

1.1.1 Composés osmotiques

La sécrétion de la bile repose sur la théorie de la génération du flux biliaire, qui propose la présence de gradients osmotiques entre les espaces plasmatiques et biliaires (Nathanson et Boyer 1991, Erlinger 1988).

Tableau 1 Principaux composés de la bile

Composés biliaires	Concentration
<i>Anions organiques</i>	
Acides biliaries	3-45 mM
Bilirubine	1-2 mM
<i>Electrolytes</i>	
Na ⁺	140-165 mEq/L
Cl ⁻	77-117 mEq/L
K ⁺	2.7-6.7 mEq/L
HCO ₃ ⁻	12-55 mEq/L
<i>Lipides</i>	
Cholestérol	97-320 mg/dl
Phosphatidylcholine	140-810 mg/dl
<i>Protéines</i>	
Albumine	20-3000mg/L
Immunoglobuline A	
<i>Peptides</i>	
Glutathion	3-5 mM
Conjugués de glutathion	0-5mM
<i>Acides aminés</i>	5-6 mM
<i>Enzymes</i>	

Adapté de Boyer 1986, Graf 1983, Erlinger 1994.

Le flux biliaire est donc le résultat du transport du plasma vers la bile de composés comme les acides biliaires et ions inorganiques, qui ensemble créent en gradient osmotique à l'intérieur de la lumière canaliculaire, stimulant la formation de la bile.

1.1.1.1 Acides biliaires, glutathion

Les acides biliaires (AB) composent une classe de stéroïdes polaires, les cholanoïdes, et sont synthétisés à partir du cholestérol. Ils sont présents à plus de 99% sous forme conjuguée, soit avec la glycine ou la taurine. Parce qu'ils ont un pKa plus faible que le pH biliaire, les AB sont présents sous la forme anionique, c'est-à-dire qu'ils forment des sels. Les AB sont des lipides polaires et amphiphiles qui possèdent une partie hydrophobe et une partie hydrophile, ce qui leur confèrent la propriété de s'assembler en micelles. Ils peuvent exercer une force osmotique primaire dans la génération du flux biliaire. Leur propriété cholérétique est démontrée lorsque les acides biliaires exogènes sont administrés à des doses dites cholérétiques. Inversement, l'arrêt de la circulation entérohépatique induit une diminution du flux biliaire. Le flux biliaire dépendant des AB est décrit comme la multiplication de la vitesse de sécrétion des AB et de leur activité cholérétique.

Lorsque la droite de régression du débit biliaire en fonction de l'excrétion des AB est extrapolée à une sécrétion d'acides biliaires nulle, il existe un débit biliaire résiduel que l'on nomme débit biliaire indépendant des acides biliaires (DIAB). On estime que le DIAB constitue la partie dominante du flux biliaire, soit d'environ 40% chez l'homme tandis qu'il est encore plus important chez le rat, c'est-à-dire autour de 50% (Balabaud *et al.* 1977, Boyer 1980, Ballatori *et al.* 1992, Bouchard *et al.* 2000). Les mécanismes impliqués dans cette fraction ne sont pas très bien établis. Certaines études suggèrent que le DIAB soit le résultat d'une filtration osmotique d'eau en réponse à la sécrétion active d'électrolytes inorganiques dans la lumière canaliculaire. Cependant, le DIAB serait plutôt associé à la sécrétion active d'ions organiques, principalement le glutathion et ses conjugués, dans l'espace canaliculaire (Ballatori et Truong 1989, Roy *et al.* 1989,

Sellinger et Boyer 1990). En fait, le glutathion semble générer près de 50% du DIAB (Ballatori et Truong 1992 et 1989). Des études effectuées dans le foie isolé perfusé démontrent que l'administration de glutathion et de ses dérivés estérifiés induit une modification du débit biliaire sans modifier la vitesse de sécrétion des AB (Ballatori et Truong 1992, Vendemiale *et al.* 1994).

1.1.1.2 Électrolytes

Les électrolytes, dont les principaux sont le sodium, le chlore, le potassium, le calcium et le bicarbonate, représentent les composés les plus concentrés dans la bile. Par conséquent, ils jouent un rôle considérable en ce qui a trait à la pression osmotique de la bile. Des travaux ont démontré que les électrolytes n'agiraient pas comme agents osmotiques primaires, comme les acides biliaires et le glutathion, mais joueraient plutôt un rôle passif dans la formation de la bile (Boyer *et al.* 1992, Anwer et Hegner 1982, Van Dyke *et al.* 1982). Par ailleurs, certains AB de type lipophile, comme l'acide ursodeoxycholique, induisent une hypercholérèse. Les mécanismes de ce curieux phénomène ne sont pas clairement établis mais l'hypothèse proposée par Yoon *et al.* (1986) apparaît la plus plausible. Selon cette hypothèse, un AB anionique tel que l'acide ursodeoxycholique sous forme non conjuguée s'approprie un proton de l'acide carbonique qui devient un anion HCO_3^- . Ainsi, l'AB protonaté est liposoluble et recyclé puisqu'il est rapidement absorbé par les cellules épithéliales biliaires pour être ensuite retourné à l'hépatocyte. Le pouvoir osmotique est par conséquent transféré au bicarbonate. Il y a donc davantage d'ions bicarbonates sécrétés dans la bile, et ce processus, nommé shunt choléhépatique, stimule le flux biliaire (Palmer *et al.* 1987, Gurantz et Hofmann 1984).

1.2 Mécanismes de formation de la bile ductulaire

Les cellules ductulaires, également nommées cholangiocytes, font partie des cellules de l'épithélium des voies biliaires hépatiques. Ces cellules forment des conduits biliaires qui sont en contact direct avec la bile, s'étendant des canaux de Hering jusqu'au

duodénum. Elles constituent environ de 3 à 5% de la population cellulaire du foie, comparativement à 60% pour les hépatocytes (Alpini *et al.* 1994). Les cellules ductulaires ont été longtemps considérées comme de simples conduits biliaires passifs dont l'unique rôle consistait surtout à transporter de la bile à partir du site de la formation, c'est-à-dire le foie, jusqu'au duodénum. Toutefois, des recherches ont démontré que l'épithélium biliaire est constitué de cellules dynamiques qui participent activement au métabolisme hépatique. Des observations morphologiques ont révélé que la cellule possède une membrane apicale et basolatérale, signifiant qu'elle est polaire et capable d'effectuer des fonctions de transport (Alpini *et al.* 1989). De plus, la cellule ductulaire possède de nombreuses microvillosités sur la membrane apicale (Yang 1993, Ishii *et al.* 1989). Également, la sécrétion des cellules ductulaires est modifiée par les hormones, les peptides et les constituants biliaires (Alpini *et al.* 1997). Plusieurs évidences confirment que les cholangiocytes jouent un rôle actif dans la sécrétion biliaire. D'abord, des recherches *in vivo* menées par Wheeler et Mancusi-Ungaro (1966) démontrent que suite à l'induction de l'hyperplasie du ductule, l'infusion de sécrétine administrée via l'artère hépatique (qui alimente l'épithélium biliaire) cause une cholérèse, ce qui diffère de ce qui est observé lors de l'administration par la veine périphérique. Ensuite, des études *in vitro* viennent corroborer les études antérieures et montrent qu'il y a transport d'eau et d'électrolytes à travers un segment isolé des ductules biliaires (Strasberg *et al.* 1976). L'équipe de Lévy et collaborateurs ont récemment établi une nouvelle lignée de cellules épithéliales immortalisées dérivant des ductules biliaires et provenant de souris transgéniques (Zoltowska *et al.* 1999). Ce modèle assure un degré de purification dans l'isolation de cellules immortalisées et permet des études rigoureuses, notamment le rôle de l'épithélium biliaire dans le métabolisme lipidique. À cet effet, ces travaux ont démontré que les cellules ductulaires sont capables d'incorporer les acides gras pour permettre l'estérification des lipides, tels que les triglycérides et les phospholipides. Également, les cellules du ductule biliaire peuvent synthétiser et sécréter les acides biliaires, ce qui suggère un rôle actif dans la modification du contenu de la bile par l'épithélium biliaire (Zoltowska *et al.* 1999).

La sécrétion biliaire ductulaire est le résultat de plusieurs interactions entre les hormones intestinales, telles que la sécrétine, les peptides et les nerfs. La neurorégulation par l'acétylcholine est sans doute parmi les plus intéressantes découvertes dans ce domaine. De ce fait, des travaux révèlent que l'acétylcholine stimule la sécrétion de la bile ductulaire en augmentant la sécrétion biliaire de base et celle stimulée par la sécrétine, en plus d'augmenter la sécrétion du bicarbonate (Alvaro *et al.* 1997, Baiocchi *et al.* 1999). En somme, on estime que les cholangiocytes participent à près de 10% du débit biliaire total chez le rat, et ce pourcentage s'élève à 40% chez l'homme (Alpini *et al.* 1994).

Les cellules ductulaires sont également impliquées dans l'absorption de plusieurs composés présents dans la lumière du ductule. L'eau, les glucides (glucose), et les AB peuvent être ainsi réabsorbés par les cholangiocytes. Les AB, de façon plus précise, seraient réabsorbés par le plexus périductulaire, ce phénomène expliquant l'hypercholérèse induite par l'acide ursodeoxycholique, et nommé shunt cholehépatique (discuté au point 1.1.1.2). D'ailleurs, des études révèlent que le transporteur protéique "rat apical sodium-dependent bile acid transporter" (ASBT) est présent dans la membrane apicale du cholangiocyte, ce qui suppose que les AB conjugués se lient au domaine apical du cholangiocyte par ce transporteur et par conséquent modulent la sécrétion de la bile ductulaire et influencent la physiologie du cholangiocyte (Lazaridis *et al.* 1997). Les mêmes auteurs ont également identifié un isoforme du ASBT, le t-ASBT situé dans le domaine basolatéral du cholangiocyte, et qui est impliqué dans la sécrétion des AB (Lazaridis *et al.* 1999). La présence de ce transporteur peut suggérer un mécanisme de protection du cholangiocyte afin de prévenir l'accumulation intracellulaire d'AB toxiques à l'intérieur de l'épithélium biliaire.

1.3 Transport des acides biliaries dans l'hépatocyte

Les hépatocytes sont des cellules hautement polarisées, possédant une membrane plasmique apicale et basolatérale. Le maintien de cette polarité cellulaire hautement organisée est essentiel pour assurer les fonctions vitales de l'hépatocyte (Nathanson et

Boyer 1991). Une de ces fonctions est le transport hépatocytaire des lipides biliaires. Le processus de transport inclu trois grandes étapes, soit la capture par la membrane basolatérale, le transport intracellulaire et la sécrétion par la membrane canaliculaire.

1.3.1 Capture basolatérale

La membrane basolatérale possède plusieurs systèmes de transport, des récepteurs et des canaux d'ions qui facilitent l'échange de nutriments et autres solutés entre l'hépatocyte et la circulation systémique. La captation basolatérale de composés organiques et inorganiques établit un gradient potentiel à l'intérieur de l'hépatocyte qui est nécessaire à la formation de la bile (Putnam 1995).

Le foie possède une très grande capacité à capter les AB provenant du plasma. Lorsqu'ils atteignent le foie, les AB sont liés aux protéines plasmatiques, principalement à l'albumine (Roda *et al.* 1982) ou aux lipoprotéines (Hedenborg *et al.* 1988). La capture hépatique des comporte deux grandes catégories, soit les différents transporteurs et la diffusion passive. Ces différents modes de transport sont illustrés à la **figure 1**.

Au cours des 10 dernières années, de nouveaux transporteurs membranaires impliquant les AB ont été identifiés. Jusqu'à maintenant, nous pouvons nous référer à deux classes de transporteurs basolatéraux. La première est constituée de transporteurs dépendants du sodium, lesquels sont majoritairement responsables de la translocation des AB. La deuxième classe comprend les transporteurs indépendants du sodium.

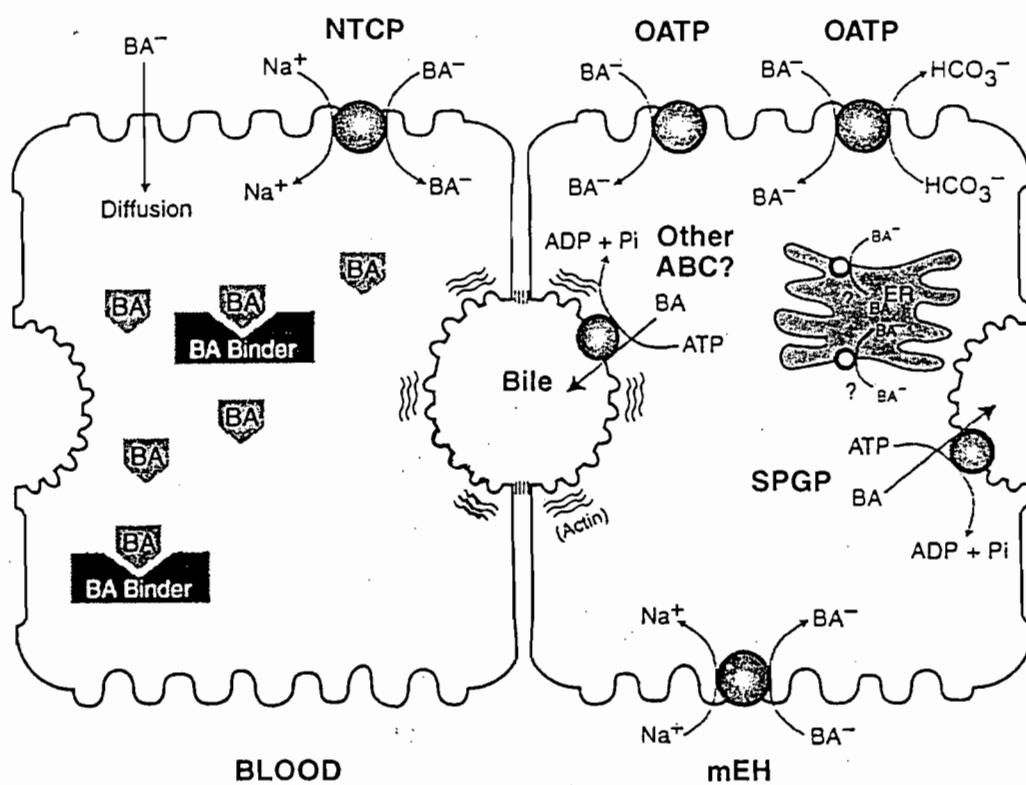
Un des transporteurs dépendants du sodium est le transporteur protéique multi-spécifique qui est une protéine de co-transport des AB et du Na^+ , identifiée "Na⁺-Taurocholate-co-transporting protein" (ntcp) (Hagenbuch *et al.* 1991, Bahar et Stolz 1999). C'est un système sodium-dépendant, saturable, fortement dépendant de l'ion sodique et qui permet le transport des AB, préférentiellement sous forme conjuguée, contre leur gradient électrochimique. Récemment, la "rat microsomal epoxide

hydrolase" (mEH), une deuxième protéine dépendante du sodium était clonée par Von Dippe *et al.* (1996). La mEH serait responsable de 25% de la capture de l'acide taurocholique par l'hépatocyte. Les AB trihydroxylés sont les principaux substrats pour ce type de transporteurs.

La deuxième classe de transporteurs indépendants du sodium est identifiée comme responsable du transport facilité. Ces transporteurs échangent la capture d'AB contre un composé intracellulaire, et possèdent donc une capacité bidirectionnelle de transport. Le transporteur "the rat organic anion transporter" (Oatp), ou "multispecific organic anion transporting polypeptide", assure le transport des AB, particulièrement les AB secondaires non conjugués, tout comme de nombreux anions organiques, stéroïdes neutres et certains cations organiques. Tout récemment, un nouveau membre de la famille des Oatp a été identifié dans le foie du rat et nommé "liver specific transporter 1" (Lst-1) (Kakyo *et al.* 1999). Selon des analyses fonctionnelles, il contribue à la capture de l'acide taurocholique, ainsi qu'à d'autres anions organiques (Abe *et al.* 1999). Grâce aux techniques de clonage qui deviennent de plus en plus accessibles, il est à prévoir que d'autres protéines de transport seront clonées au cours des prochaines années.

La diffusion passive constitue la deuxième grande voie concernant le transport membranaire des AB (Meier 1995). Cette dernière privilégie les AB hydrophobiques, préférentiellement non-conjugués comme l'acide lithocholique et deoxycholique.

Figure 1. Transporteurs hépatiques des acides biliaries



(tiré de *Muller et Jansen 1997*)

1.3.2 Transport intrahépatocytaire

1.3.2.1 Transport vésiculaire

Généralités

Le transport vésiculaire est essentiel au maintien des fonctions sécrétoires puisqu'il constitue le seul procédé permettant l'apport des protéines membranaires nouvellement synthétisées (Bartles *et al.* 1987, Alvaro *et al.* 1995, Crawford *et al.* 1996). Les protéines sont formées dans le réticulum endoplasmique et sont dirigées dans l'appareil de Golgi avant d'être livrées vers des sites intracellulaires ou exportées par exocytose. Contrairement aux autres cellules épithéliales, les protéines membranaires nouvellement synthétisées dans l'hépatocyte sont d'abord transportées au pôle basolatéral. De là, les protéines destinées à la membrane apicale sont ensuite transportées jusqu'au domaine canaliculaire (Hubbard *et al.* 1989, Crawford *et al.* 1996). Ce transport entre les membranes est appelé transcytose. L'activité transcytotique est décrite comme l'apport de vésicules au pôle apical afin de maintenir la capacité de sécrétion au niveau du canalicule (Barnwell *et al.* 1986, Crawford *et al.* 1996). Le trafic vésiculaire est dépendant des microtubules, principaux éléments du cytosquelette et à travers desquels les vésicules se déplacent. Des travaux datant des années 70 démontrent déjà que chez des animaux traités à la colchicine, un inhibiteur de la fonction microtubulaire, la sécrétion des protéines synthétisées dans le foie est inhibée (Redman *et al.* 1975). La sécrétion biliaire est également diminuée par la colchicine (Crawford *et al.* 1988, Coleman et Rahman 1992). Appuyées par de nombreuses études, des équipes de chercheurs ont décrit la sécrétion vésiculaire comme une série de voies vésiculaires transcytotiques (Nathanson et Boyer 1991, Lake *et al.* 1985, Erlinger 1996). L'une de celles-ci est l'exocytose et constitue la principale voie par laquelle le foie excrète des protéines dans la bile. Parmi les marqueurs transcytotiques de ces protéines, nous retrouvons le horseradish peroxidase (HRP) qui est observé à l'intérieur d'un compartiment tubulovésiculaire, adjacent à la membrane basolatérale (Renston *et al.*

1980, Hayakawa *et al.* 1990). De nombreuses études démontrent que suite à l'injection intraportale de HRP, l'excrétion biliaire de ce dernier est biphasique. La première fraction, qui apparaît à l'intérieur de 5 minutes, est dite phase précoce et représenterait la diffusion paracellulaire de HRP dans la bile (Hardison *et al.* 1989). Au cours de cette phase précoce, le HRP pourrait également emprunter la voie transcytotique indépendant des microtubules vésiculaires (Hayakawa *et al.* 1990). La deuxième fraction est identifiée comme la phase prolongée et représenterait 90% du HRP biliaire, cette phase atteignant son maximum de sécrétion entre 20 et 25 minutes suivant son injection (Hayakawa *et al.* 1990). Contrairement à la phase précoce, le HRP de la phase prolongée serait transporté à l'aide de la voie vésiculaire qui est dépendant des microtubules (Beuers *et al.* 1993).

1.3.2.1.1 Transport vésiculaire des acides biliaries

Des études morphologiques ainsi que des travaux utilisant des inhibiteurs microtubulaires tels que la colchicine indiquent que des vésicules intracellulaires sont impliquées dans le transport des AB (Crawford *et al.* 1988, Coleman et Rahman 1992). En effet, certains travaux ont démontré que les AB s'associent au réticulum endoplasmique, à l'appareil de Golgi ainsi qu'aux vésicules péricanaliculaires (Erlinger 1996). Lorsque le carrefour métabolique d'AB est déplété, la voie de transport vésiculaire représentée par le HRP est diminuée, suggérant que cette voie pourrait contribuer à la baisse du transport maximum des AB hépatiques (Arrese *et al.* 1997). Également, la colchicine inhibe la vitesse maximale de sécrétion des AB, lorsque ceux-ci sont administrés en doses supraphysiologiques. Le traitement à la colchicine permet de mettre en évidence l'existence d'un transport d'AB dépendant des microtubules mais seulement en présence d'une charge importante d'AB. Il semble donc que lorsque la charge d'AB est accrue, pendant un repas par exemple, le transport est assuré en partie par des vésicules intracellulaires. Cependant, une récente étude menée par Crawford et son équipe (El-Seaidy *et al.* 1997) montre que le traitement à la colchicine a peu d'effet sur l'accumulation et la distribution cytoplasmique des dérivés fluorescents d'AB dans des couples d'hépatocytes. Toutefois, l'utilisation de ces dérivés ne reflèterait pas de

façon fidèle le transport cytoplasmique des AB puisque ceux-ci seraient retenus préférentiellement par les cellules et, par conséquent, ne représenteraient pas le même profil physiologique que les AB endogènes (Holzinger *et al.* 1998, Mills *et al.* 1997). En résumé, il n'y a pas encore de consensus sur la véritable contribution des vésicules dans le transport cytoplasmique des AB et plusieurs chercheurs suggèrent l'implication de mécanismes de transport incluant les vésicules et les transporteurs médiatisés. La **figure 1** illustre les différents modes de transport vésiculaire.

1.3.2.2 Transporteurs protéiques du cytoplasme

Le transport intracellulaire des AB est un processus extrêmement rapide mais encore mal défini. Néanmoins, il est proposé que des transporteurs protéiques du cytoplasme seraient impliqués dans le déplacement des AB du pôle basolatéral jusqu'à la membrane canaliculaire. Des protéines cytoplasmiques liant les AB ont été identifiées dans le cytoplasme de foie de rat et de l'homme (Stolz *et al.* 1984, Stolz *et al.* 1987) (**figure 1**). Ce sont la "Glutathion S-transférase", la "liver fatty acid binding protein" (FABP) (Bahar et Stolz 1999) et la protéine "3-alpha-hydroxy-stéroïde deshydrogenase" (Y') (Stolz *et al.* 1989). Des études effectuées à l'aide de l'indométhacine, un inhibiteur de la liaison AB et Y', montrent que l'excrétion biliaire des AB est retardée tandis que ces derniers sont retrouvés davantage dans le perfusé (Takikawa *et al.* 1996). Ces observations suggèrent que les AB sont retenus dans le milieu cytoplasmique par ces protéines spécifiques qui préviennent leur sortie à l'extérieur du foie. Parallèlement, la liaison des AB avec ces protéines cytoplasmiques serait nécessaire pour permettre une diffusion rapide des AB par les transporteurs canaliculaires (Bahar et Stolz 1999). Néanmoins, la force motrice responsable des mouvements rapides et transcellulaires des AB est inconnue. Cependant, l'écart considérable entre la concentration d'AB à la membrane sinusoidale et celle à la membrane canaliculaire pourrait créer un gradient qui favoriserait le mouvement rapide des AB à travers le cytoplasme.

1.3.3 Transport canaliculaire

La membrane apicale, également nommée membrane canaliculaire, forme le pôle d'excrétion de l'hépatocyte. Le domaine apical compte pour moins de 15% de la surface cellulaire, mais il est cependant hautement impliqué dans la formation et la sécrétion de la bile. En ce qui a trait au transport des AB du plasma jusqu'au canalicule biliaire, la sécrétion canaliculaire est généralement considérée comme l'étape limitante, influençant par le fait même la circulation entérohépatique (Nathanson et Boyer 1991). Le potentiel membranaire et les transporteurs protéiques constituent les deux grands types de transport des AB à travers la membrane canaliculaire, illustrés à la **figure 1**.

1.3.3.1 Potentiel membranaire

Un des deux moyens de transport des AB à travers la membrane s'effectue de façon indépendante de l'ATP. En effet, le potentiel électrique de la membrane canaliculaire peut modifier la vitesse de sécrétion des AB, particulièrement dans des conditions de base (Suchy *et al.* 1997). En utilisant différents modèles dont le foie isolé perfusé et des couplets d'hépatocytes, des chercheurs ont observé qu'une hyperpolarisation de la membrane induisait une accélération de la sécrétion des AB alors qu'une dépolarisation ralentissait leur sécrétion (Kuhn et Gewirtz 1988, Weinman *et al.* 1989 et 1993).

1.3.3.2 Transporteurs protéiques

Le deuxième moyen de transport intracaniculaire des AB est possible grâce à l'action de l'ATP. À partir de l'hépatocyte jusqu'à la lumière du canalicule biliaire, l'excrétion des lipides biliaires se produit contre un gradient de concentration allant jusqu'à 1000 (Hoffman 1994). Ce gradient de concentration est trop grand pour s'appuyer seulement sur un modèle de potentiel électrique de la membrane. Par ailleurs, depuis la dernière décennie, plusieurs études ont permis d'identifier différents transporteurs protéiques agissant au niveau de la membrane canaliculaire. Ce système de transport appartient à une super-famille de transporteurs, le "ATP binding cassette" (ABC), comprenant deux

groupes: les P-glycoprotéines (Pgp) et les "multidrug resistance proteins" (MRP) (Muller et Jansen 1997, König *et al.* 1999, Borst *et al.* 2000).

De nouvelles techniques permettent d'établir l'existence de quelques transporteurs qui sont dépendants de l'ATP (Suchy *et al.* 1997). L'ecto-ATPase (Ca^{++} , Mg^{++} dépendante), aussi nommée "canalicular bile acid transporter/ecto-ATPase/canalicular cell adhesion molecule" (CBATP), présente sur la membrane canaliculaire, semble être responsable d'environ 10% du transport canaliculaire total des AB (Stieger *et al.* 1992). Une seconde protéine, membre de la superfamille ABC et localisée sur la membrane canaliculaire, a été nommée "sister of P-glycoprotein" (spgp) (Childs *et al.* 1995). Plus récemment, elle est référée davantage comme la "bile salt export pump" (Bsep) (Gerloff *et al.* 1998). De récentes observations indiquent que ce transporteur protéique joue un rôle marquant dans le transport canaliculaire des AB (Gerloff *et al.* 1997 et 1998), en favorisant le transport de l'acide taurocholique. Un des derniers transporteurs à être cloné à partir du foie de rats est le mrp2 (MRP1 chez l'homme), également identifié comme le "canalicular multiple organic anion transporter" (cmoat) (Paulusma *et al.* 1996, König *et al.* 1999). Des recherches démontrent en effet que cette protéine est impliquée dans le transport de différents anions organiques, incluant les AB sulphatés et glucuronidés (Paulusma et Oude elferink 1997, Bahar et Stolz 1999).

Des anomalies héréditaires ou acquises concernant des protéines impliquées dans le transport hépatobiliaire peuvent mener à des défauts d'excrétion, se traduisant par une cholestase intrahépatique. Plusieurs de ces troubles d'excrétion biliaire proviennent d'un défaut des transporteurs impliqués dans le transport des AB à travers la membrane canaliculaire. La cholestase intrahépatique familiale progressive de type 2, qui se manifeste par un défaut du gène SPGP (ou BSEP) chez l'homme, est caractérisée par des signes cliniques comme l'ictère, des prurits sévères et une grande concentration d'AB dans le plasma (Strautnieks *et al.* 1997, Jansen et Muller 2000). La BSEP n'étant pas exprimée chez ces individus, il y a accumulation d'AB dans l'hépatocyte qui provoque des lésions telles que l'apoptose et la nécrose hépatocytaire (Jansen *et al.* 1998, Kullak-Ublick *et al.* 2000). De récents travaux utilisant des souris spgp (-/-)

homozygotes ont montré que ces animaux ont développé une cholestase intrahépatique, mais avec moins de sévérité que chez les individus atteints de la cholestase intrahépatique familiale progressive de type 2 (Wang *et al.* 2001). L'apparition chez les souris mutantes d'AB tetrahydroxylés, ayant des propriétés hydrophiles, suggère que l'hydroxylation peut protéger contre des dommages cholestatiques sévères. De plus, les auteurs proposent chez les souris un système de transport alternatif assurant la sécrétion dans le canalicule des AB plus hydrophiles (Wang *et al.* 2001). Notons que des recherches ont démontré que des protéines spgp ou Bsep chez le rat et la souris ont un haut degré d'homologie avec la BSEP humaine (Jansen *et al.* 1999).

Un autre défaut héréditaire provoquant une anomalie de la protéine de transport de la membrane canaliculaire, MRP2, est identifié comme le syndrome Dubin-Johnson (Paulusma *et al.* 1997, Tsuji *et al.* 1999). Chez les individus porteurs de ce défaut génétique, l'apparition de l'hyperbilirubinémie est moins fréquente puisque la sécrétion biliaire dépendante des AB n'est pas modifiée (Kullak-Ublick *et al.* 2000, Jansen et Muller 2000). Deux souches de rat, GY/TR- et EHBR, ayant été soumises à des mutations et atteintes d'hyperbilirubinémie, sont considérées comme des modèles animaux du syndrome humain Dubin-Johnson (Paulusma *et al.* 1996, Ito *et al.* 1997). Il est probable qu'au cours des prochaines années, d'autres transporteurs canaliculaires, responsables de la sécrétion des lipides biliaires, soient identifiés.

1.4 Formation et sécrétion des phospholipides et cholestérol biliaires

1.4.1 Origine des phospholipides

Les phospholipides, classés comme lipides complexes, ont un rôle crucial dans la structure des membranes. Grâce à leurs propriétés amphiphiliques, ils se rassemblent spontanément et forment une couche double de lipides appelée bi-couches lipidiques, formant ainsi la membrane (Small 1986). Une description plus détaillée de cette classe particulière de lipides est traitée dans la partie 3 de l'introduction.

Chez l'homme, le processus de la formation la bile implique la sécrétion d'environ 11g de phospholipides chaque jour. Ces phospholipides biliaires sont nécessaires à la solubilisation du cholestérol biliaire et à la digestion et l'assimilation des lipides au niveau du tractus intestinal. Comme constituants biliaires, les phospholipides sont présents à plus de 90% sous forme de phosphatidylcholine (PC), et ce, chez la plupart des espèces animales incluant l'homme (Barnwell *et al.* 1987, Alvaro *et al.* 1986b). La phosphatidyléthanolamine (PE) et la sphingomyéline constituent la différence, soit 10% des phospholipides biliaires. La PC a aussi une configuration bien spécifique, c'est-à-dire reliée à sa composition en acides gras. Cette classe de phospholipide est composée majoritairement de l'acide palmitique (16:0) à la position un et l'acide linoléique (18:2) à la position deux du glycérol (Yousef et Fisher 1976, Kawamoto *et al.* 1980). La provenance des phospholipides biliaires fait l'objet de nombreuses recherches depuis plus de trois décennies, ce qui permet donc de proposer deux sources principales de phospholipides biliaires: hépatiques et extrahépatiques.

1.4.1.1 Phospholipides de source hépatique

Les phospholipides d'origine hépatique seraient une source importante de PC biliaires. D'après certaines études, la PC biliaire d'origine hépatique proviendrait principalement d'un carrefour métabolique microsomal réglé par le flux d'AB (Gregory *et al.* 1975, Yousef *et al.* 1975, Kawamoto *et al.* 1980). De plus, Yousef et collaborateurs (Chanussot *et al.* 1990) ont démontré que suite au marquage de la choline et à l'infusion de l'acide dehydrocholique et de l'acide cholique (dans le but d'altérer la sécrétion de phospholipides biliaires), la contribution hépatique peut être évaluée à environ 40% de l'apport total des PC biliaires. De ce pourcentage, une mince contribution (environ 2-3%) proviendrait de la membrane canaliculaire suite à l'action détergente des AB sur les phospholipides membranaires. D'ailleurs, Yousef *et al.* (1975) montre que la présence d'AB sous forme de micelles dans la lumière canaliculaire peu solubiliser certains segments de la membrane, nommés domaines, plus sensibles au pouvoir détersif des AB. Une autre source de phospholipides hépatiques est la nouvelle synthèse de PC destinés à la bile. Cependant, cette dernière ne contribuerait que très

peu, son apport n'étant estimé qu'à seulement 3 à 5% de l'apport total (Robins et Brunengraber 1985, Chanussot *et al.* 1990). Récemment, une étude a confirmé que la PC nouvellement synthétisée provient principalement de la voie de synthèse CDP-choline tandis que la voie de la méthylation de la PE n'est qu'une voie de dépannage (Agellon *et al.* 1999). Selon cette même étude, la composition des acides gras composant les PC serait indépendante de l'origine des PC.

1.4.1.2 Phospholipides de source extrahépatique (transportés par les lipoprotéines)

Il a été démontré, notamment par les études menées par Chanussot et collaborateurs, que les phospholipides de source extrahépatique contribuent significativement aux PC retrouvées dans la bile. Ces auteurs ont montré que les PC liées aux lipoprotéines de haute densité (HDL-PC) contribueraient largement aux PC biliaires (Chanussot *et al.* 1990). En effet, par le marquage des PC, ils ont établi cette contribution à 38% (Portal *et al.* 1993). Également, le caractère hydrophile/hydrophobe des AB liés à la surface des HDL-PC semble influencer la sécrétion de HDL-PC dans la bile, les AB plus hydrophobes stimulant davantage la sécrétion des PC dans la bile (Portal *et al.* 1993).

1.4.2 Origine du Cholestérol

Le cholestérol appartient à la grande famille des stéroïdes. Il est, comme les phospholipides, un composant crucial des membranes cellulaires. Pour une lecture plus exhaustive concernant le métabolisme du cholestérol, consultez la partie 3 de l'introduction.

Le cholestérol de la bile représente une voie majeure d'excrétion du cholestérol corporel. Ainsi, de 1 à 2 grammes de cholestérol biliaire sont excrétés via la sécrétion biliaire chaque jour, chez l'homme (Carey et Duane 1994). Tout comme les phospholipides biliaires, l'origine du cholestérol biliaire n'est pas clairement établie, mais il est suggéré qu'il provienne également de source hépatique et extrahépatique.

1.4.2.1 Cholestérol de source hépatique

En ce qui concerne la contribution du cholestérol nouvellement synthétisé, dirigé et sécrété dans la bile, la controverse est importante. Robins et Brunengraber 1985, ainsi que Turley et Dietschy 1981 démontrent que le cholestérol hépatique nouvellement synthétisé contribue peu à la totalité du cholestérol retrouvé dans la bile, contrairement à d'autres études qui démontrent un apport plus considérable (Gregory *et al.* 1975, Kawamoto *et al.* 1980). Par conséquent, la contribution du cholestérol synthétisé *de novo* est estimée entre 5 et 30%. Ce pourcentage varie également selon l'espèce animale étudiée, c'est-à-dire de 5 à 20% chez le rat (Turley et Dietschy 1981), et allant jusqu'à 30% chez l'homme (Schwartz *et al.* 1982).

1.4.2.2 Cholestérol de source extrahépatique (transporté par les lipoprotéines)

Le cholestérol biliaire d'origine extrahépatique proviendrait principalement des lipoprotéines plasmatiques (Schwartz *et al.* 1978, Stange 1986), c'est-à-dire des lipoprotéines de faible densité (LDL) et des HDL. Des études effectuées chez l'homme indiquent que le cholestérol non estérifié provenant des LDL est moins favorisé que celui lié aux HDL comme précurseur des stéroïdes biliaires (Schwartz *et al.* 1978b, Halloran *et al.* 1978). Des résultats similaires ont été constatés chez le rat (Bravo et Cantafora 1990, Bravo *et al.* 1995), démontrant que le cholestérol non estérifié des HDL est préféré au cholestérol estérifié des HDL quant à la contribution des stérols biliaires. Une démonstration solide de la contribution des HDL au cholestérol retrouvé dans la bile est établie par l'équipe de Kozarsky et de ses collaborateurs (1997). En induisant chez la souris une surexpression du récepteur hépatique "scavenger receptor class B1" (SR-B1), la capture du cholestérol des HDL est stimulée. Parallèlement, la sécrétion de cholestérol biliaire est augmentée, indiquant que le récepteur SR-B1 régularise à la fois le cholestérol du plasma et le cholestérol biliaire (Fluiter *et al.* 1999).

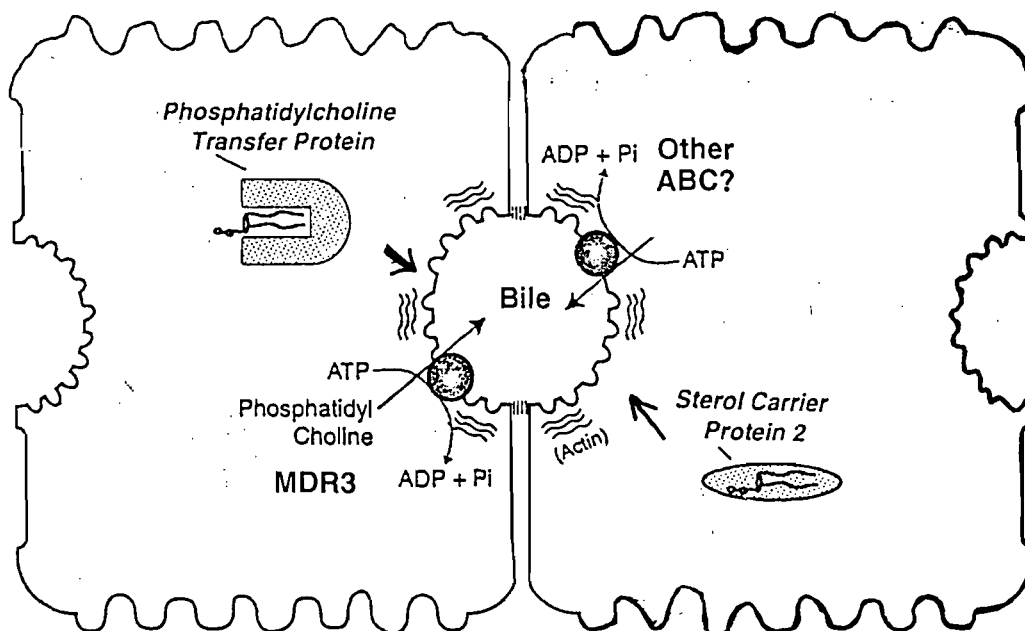
1.4.3 Le transport des phospholipides et du cholestérol

La sécrétion de la PC dans la bile est étroitement liée à la sécrétion de cholestérol et le flux des deux lipides est coordonné avec celui des AB (Cohen 1996).

1.4.3.1 Transport intrahépatocyttaire

La **figure 2** illustre les différentes voies de transport hépatique des phospholipides et du cholestérol vers la bile.

Figure 2



(Adapté de *Cohen 1996* et *Muller et Jansen 1997*)

1.4.3.1.1 Transport vésiculaire

Jusqu'à maintenant, il n'y a pas d'évidence claire démontrant que les phospholipides destinés vers la bile empruntent la voie vésiculaire pour atteindre la membrane apicale de l'hépatocyte. Crawford et son équipe (1988) ainsi que Coleman et Rahman (1992) suggèrent que les phospholipides destinés à la sécrétion biliaire soient transportés, entre autres, par des vésicules qui transiteraient par l'appareil de Golgi. En effet, des recherches utilisant des inhibiteurs de la fonction microtubulaire, tels que la colchicine, démontrent que la sécrétion des lipides biliaires est inhibée, suggérant que le transport vésiculaire est impliqué dans la livraison des lipides vers la bile (Barnwell *et al.* 1984, Crawford *et al.* 1988). De plus, des précurseurs lipidiques fluorescents, tel que le précurseur de la sphingomyéline, réagissant avec des couplets d'hépatocytes, démontrent que ces lipides peuvent être synthétisés et ensuite accumulés dans la région du Golgi (Crawford *et al.* 1991). Toutefois, la sphingomyéline constitue un lipide biliaire mineur et son niveau de sécrétion est plutôt bas (Coleman et Rahman 1992). Borst et ses collaborateurs ont proposé tout récemment une voie de transport de la PC du réticulum endoplasmique vers le feuillet interne de la membrane basolatérale à l'aide du transport vésiculaire, conséquemment au transport des protéines provenant de la membrane plasmique (Borst *et al.* 2000). Ensuite, les molécules de PC atteignent la membrane canaliculaire par diffusion latérale et sont ultimement sécrétées dans le canalicule (Borst *et al.* 2000). Des techniques de microscopie électronique plus sophistiquées permettront éventuellement de connaître la véritable implication du transport vésiculaire dans le transport cytoplasmique des phospholipides biliaires.

Comme dans le cas des autres lipides biliaires (phospholipides et AB), le transport du cholestérol à travers le cytoplasme jusqu'à la membrane apicale n'est pas encore clairement défini. Le transport vésiculaire pourrait être responsable en partie de la distribution intracellulaire du cholestérol jusqu'à la membrane canaliculaire. Une voie potentielle est la route qui transite à travers l'appareil de Golgi et où le cholestérol serait transporté en association avec des vésicules enrichies en sphingomyéline (Allen et Kallen 1993).

1.4.3.1.2 Transporteurs protéiques du cytoplasme

Des recherches initiées par Wirtz et Zilversmit effectuées en 1968 ont confirmé l'existence de transporteurs cytoplasmiques, responsables de l'échange de molécules de PC entre différentes membranes de l'hépatocyte. Ces mêmes auteurs ont identifié un premier transporteur protéique nommé phosphatidylcholine transfer protein (PC-TP), spécifique à la PC et possédant une grande affinité pour les molécules de PC ayant l'acide palmitique à la position 1 du glycérol (Wirtz 1991). Ensuite, des études utilisant des vésicules reconstituées imitant la composition lipidique du réticulum endoplasmique (microsomes) et de membranes canaliculaires démontrent que des molécules de PC marquées à la fluorescence sont transportées du réticulum endoplasmique vers la membrane apicale et que ce transfert est accéléré en présence d'AB, particulièrement les AB hydrophobes (Cohen *et al.* 1994). Ces auteurs suggèrent donc que le PC-TP peut jouer un rôle déterminant dans la formation et la sécrétion de la bile. Cependant, de récentes recherches indiquent que chez des souris génétiquement modifiées et n'exprimant plus le Pc-tp, la sécrétion de PC biliaires demeure normale (van Helvoort *et al.* 1999), infirmant l'hypothèse de Cohen et collaborateurs. Un autre transporteur protéique du cytoplasme impliqué dans le transport de la PC vers la membrane canaliculaire est le «sterol carrier protein 2» (SCP-2) (Wirtz 1991). Cependant, celui-ci serait beaucoup moins actif et n'agirait que lors de demandes accrues (Leonard et Cohen 1995). Tout le développement des techniques et des connaissances au niveau moléculaire a permis un avancement considérable dans le domaine du transport et de la sécrétion des lipides biliaires. De même, le clonage et la caractérisation de protéines de transfert spécifiques à la PC qui s'effectuent chez le rat (Wirtz 1991, Borst *et al.* 2000) et la vache (Cohen et Green 1995) contribueront à l'élucidation de la régulation du gène et de son rôle dans la formation de la bile.

Le transport du cholestérol dans le cytoplasme et jusqu'à la membrane canaliculaire, à l'aide de transporteurs, peut également s'apparenter à celui emprunté par la PC. En effet, le cholestérol peut se lier à la protéine SCP-2 (Puglielli et al 1995), ainsi qu'à

d'autres transporteurs cytoplasmiques comme les FABP. Ce serait le cas du cholestérol libre qui origine des lipoprotéines et qui, après avoir subi la dégradation lysosomale, emprunterait cette voie de transport en se liant à la protéine SCP-2 (Crawford 1996). Également, le cholestérol nouvellement synthétisé serait normalement transporté à partir du réticulum endoplasmique par le SCP-2 sans implication du système microtubulaire de la cellule (Puglielli *et al.* 1996).

1.4.3.2 Transport canaliculaire

Due à ses propriétés physicochimiques, la molécule de PC ne peut pas facilement traverser la membrane canaliculaire dans le but d'atteindre la lumière canaliculaire (Johnson *et al.* 1975). Toutefois, le transport transmembranaire des nombreuses molécules de PC nécessite l'existence d'un mécanisme capable de mouvements à travers cette membrane constituée de deux couches de lipides. Au début des années 1990, Berr et son équipe (1993) font la démonstration qu'il y a translocation de molécules de PC, à courtes chaînes et hydrosolubles, à travers une membrane canaliculaire purifiée. De plus, cette translocation se fait à l'aide d'une protéine de transport membranaire qui est indépendante de l'ATP. Depuis, d'autres protéines transmembranaires agissant également comme une flippase, ont été identifiées dans la membrane canaliculaire (Cornacchia *et al.* 1997).

Parallèlement à la découverte de l'équipe de Berr, des recherches ont démontré que la P-glycoprotéine *mdr2*, appartenant à la super-famille de transporteurs ABC et dépendant de l'ATP, est fortement exprimée au niveau de la membrane canaliculaire. Chez des souris qui n'expriment plus le gène *mdr2* P-glycoprotéine, la sécrétion de PC biliaire est complètement inhibée, tandis qu'elle est diminuée de 40% chez les souris hétérozygotes (Smit *et al.* 1993). Il a donc été spéculé que la fonction physiologique principale de cette P-glycoprotéine est la translocation de la PC à travers la membrane canaliculaire. La *mdr2* agit donc comme une flippase, transportant les molécules de PC du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane canaliculaire (Ruetz et Gros 1994, Oude Elferink *et al.* 1995) (**figure 2**). Chez les souris homozygotes, l'absence de

PC dans la bile mène à des pathologies hépatiques progressives. En effet, l'absence de sécrétion des phospholipides dans le canalicule n'assure plus de protection de la membrane. Par conséquent, la sécrétion d'AB étant normale, leur concentration importante dans le canalicule endommage la membrane canaliculaire et le ductule biliaire, ce qui provoque une prolifération de ductules biliaires et des dommages hépatiques (Oude Elferink *et al.* 1997). Les mutations homozygotes du gène MDR3 chez l'homme ont un haut degré d'homologie avec le gène *mdr2* de la souris. L'absence plus ou moins complète du gène MDR3 chez l'homme mène à un désordre génétique, nommé cholestase intrahépatique familiale progressive (PFIC) de type 3, et qui est caractérisé par une élévation de l'activité de la gamma-glutamyltransférase, une prolifération des ductules biliaires et une fibrose portale et périportale (de Vree *et al.* 1998). Le PFIC de type 3 cause de sérieuses lésions hépatiques répétitives de l'épithélium biliaire (Borst *et al.* 2000, Kullak-Ublick *et al.* 2000). Suite à la découverte de l'équipe de Smit (1993) concernant le rôle de la P-glycoprotéine dans la sécrétion de la PC biliaire chez la souris, ces chercheurs ont proposé que l'absence du gène MDR3 pourrait causer des pathologies hépatiques encore plus importantes chez l'homme. Ces chercheurs s'appuient sur deux observations. D'abord, il est démontré que les AB plus hydrophobes aggravent les perturbations hépatiques observées chez les souris *mdr2* (-/-) homozygotes (Van Nieuwkerk *et al.* 1996). De plus, la composition en AB de la bile humaine est plus hydrophobique que celle des rongeurs, notamment les AB monohydroxylés, lesquels sont plus toxiques.

Les AB semblent influencés l'activité de la P-glycoprotéine *mdr2*. En effet, les résultats d'une étude menée par Ruetz et Gros (1994) montrent une stimulation de la *mdr2* en présence de l'acide taurocholique. Ces auteurs suggèrent que la stimulation causée par l'AB ne module pas directement l'activité de la *mdr2* mais plutôt reflète la formation de micelles. Par la suite, d'autres recherches menées par l'équipe de Oude Elferink démontrent que les AB jouent un rôle sur la régulation de l'expression génique du *mdr2* et par conséquent stimulent la sécrétion de PC biliaires (Frifters *et al.* 1996, Frifters *et al.* 1997). En effet, chez des souris nourries avec une diète riche en acide cholique, on remarque une augmentation du niveau d'ARN messager du *mdr2*

concomitant avec une augmentation de la capacité de sécrétion maximale des phospholipides. D'ailleurs, des résultats très récents confirment ceux de l'équipe de Frifters (1997) en montrant que les AB induisent une régulation positive sur l'activité transcriptionnelle du *mdr2*, les AB plus hydrophobes comme l'acide taurocholique et l'acide taurodéoxycholique stimulant davantage la transcription du gène de la protéine de transport lorsque comparés aux AB plus hydrophiles (Gupta *et al.* 2000). Les AB et leur niveau d'hydrophobicité peuvent donc être d'importants régulateurs des PC biliaires.

Contrairement aux molécules de PC, les molécules de cholestérol libre ont la capacité de diffuser plus aisément à travers la membrane canaliculaire (Van Meer et Simons 1986), en basculant par un mouvement de flip flop du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique. Le passage des molécules de cholestérol à travers la membrane peut également s'effectuer par diffusion latérale (Robins *et al.* 1995), particulièrement lorsque le cholestérol provient des HDL (Acton *et al.* 1996). Ce dernier mode de translocation serait toutefois moins utilisé. Par ailleurs, même si aucun transporteur canaliculaire n'a encore été clairement identifié, il est hautement probable que le transport transcanaliculaire du cholestérol soit, du moins en partie, effectué à l'aide d'un transporteur protéique, possiblement de la famille de ABC1 (Kullak-Ublick *et al.* 2000). En effet, chez les personnes atteintes de la maladie de Tangier (absence complète de ABC1 menant à la diminution presque complète de HDL plasmatiques), le cholestérol ne peut plus être sécrété de la cellule, et l'assemblage du HDL est donc compromis (Borst *et al.* 2000). Les études portant sur les souris transgéniques *mdr2* homozygotes montrent que la sécrétion biliaire de cholestérol est diminuée de 40%, tandis qu'elle n'est pas affectée dans le cas des animaux hétérozygotes (Smit *et al.* 1994). Ceci démontre que si ce transporteur joue un rôle primordial dans la sécrétion des phospholipides biliaires, il n'est impliqué qu'à un niveau secondaire concernant le cholestérol de la bile. Par ailleurs, au cours d'une étude examinant les aspects physicochimiques de la solubilité du cholestérol, Carey et Small (1978) ont démontré que les micelles simples, dépourvues en PC, ont moins d'affinité pour le cholestérol que les micelles mixtes que l'on retrouve normalement dans le canalicule. Plus tard, une

recherche menée par Nervi et collaborateurs (Puglielli *et al.* 1994) indique que des vésicules présentes dans la lumière canaliculaire et composées de phospholipides et de cholestérol, représentent un facteur de protection important pour les cellules épithéliales contre les dommages induits par les AB. Ces vésicules sont d'abord sécrétées sous forme de complexes unilamellaires pour ensuite devenir des micelles mixtes, c'est-à-dire des complexes composés d'AB, de phospholipides et de cholestérol (Cohen et Carey 1990, Schmitz et Muller 1991, Cohen *et al.* 1998). Dans le cas où le gène *mdr2* n'est pas exprimé, la sécrétion des AB reste normale tandis que celle des phospholipides est complètement inhibée, faisant en sorte que seulement des micelles simples soient formées. Puisque le cholestérol a moins d'affinité pour ces micelles, sa sécrétion est fortement diminuée (Puglielli *et al.* 1994, Ruetz et Gros 1995, Oude Elferink et Groen 1999).

1.5 Sécrétion canaliculaire des lipides biliaires

1.5.1 Vésicules canaliculaires

La façon dont est sécrétée les lipides dans la bile demeure imprécise, considérant que la région du domaine canaliculaire procure un accès difficile à l'expérimentation. Cependant, des techniques de microscopie électronique (Ulloa *et al.* 1987) et des techniques employant la dispersion par lumière quasiélastique (Cohen *et al.* 1989), nous fournissent davantage de connaissances en mettant en évidence la présence de vésicules lipidiques composées de phospholipides et de cholestérol dans la lumière canaliculaire. Plus récemment, la démonstration de la sécrétion vésiculaire des lipides de la membrane canaliculaire est davantage appuyée par le raffinement des techniques de visualisation et d'imagerie. D'abord, la dispersion par la lumière à l'aide de microscopie au laser montre la présence de vésicules dans le canalicule biliaire, et cette vésiculation est induite par la sécrétion d'AB (Mockel *et al.* 1995). De plus, Crawford et son équipe (1995), à l'aide d'une technique de fixation tissulaire ultrarapide permettant le visionnement de vésicules sécrétoires instables, réussissent à visualiser des vésicules libres dans la lumière canaliculaire et des vésicules surgissant de la surface

exoplasmique de la membrane canaliculaire. Ces auteurs démontrent également que la concentration de ces vésicules est proportionnelle au taux de sécrétion de PC biliaires.

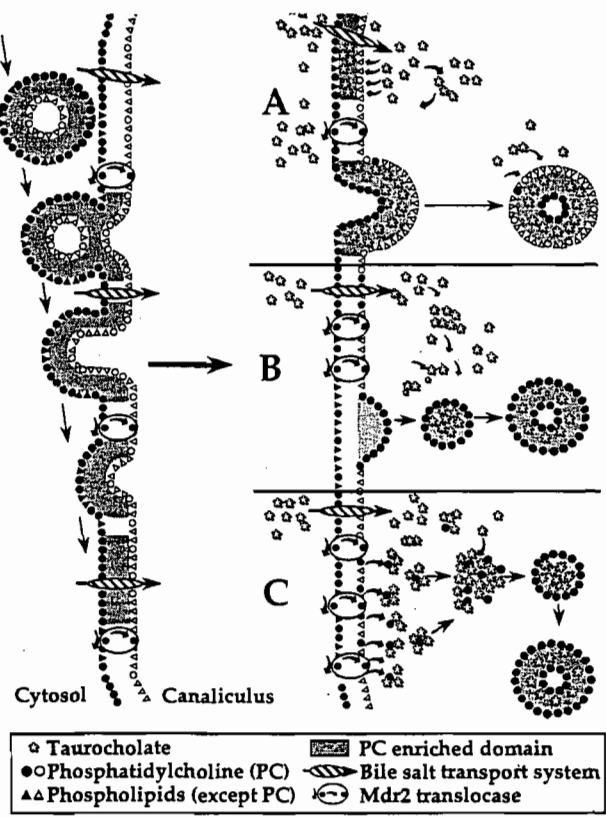
1.6 Modèles de vésiculation proposés

Cependant, le mécanisme par lequel ces vésicules lipidiques apparaissent dans la lumière canaliculaire n'est pas clairement élucidé. Les résultats de nombreuses études tentent à démontrer que l'apport de nombreuses molécules de PC qui sont transportées du réticulum endoplasmique vers le feuillet cytoplasmique de la membrane canaliculaire créent des segments membranaires nommés microdomaines, enrichis en PC (Devaux 1993). Plusieurs modèles sécrétoires ont été proposés, notamment celui de Billington et Coleman nommé "budding-off" ou le modèle de "shedding" qui montrent que les AB sont capables d'induire le bourgeonnement des deux feuillets de la membrane canaliculaire et ainsi former des vésicules (Billington et Coleman 1978, Coleman et Rahman 1992). À la suite de l'identification de la P-glycoprotéine mdr2, Higgins (1994), ainsi que Smit et ses coéquipiers (1994) proposent que suite à la translocation de la PC par la mdr2 à travers la membrane, le feuillet canaliculaire (externe) bourgeonne "pinched off" et forme des micelles et des vésicules en présence d'AB. Par la suite, Ruetz et Gros démontrent que l'activité de flippase de mdr2 induit une distribution asymétrique de PC sur les deux feuillets de la membrane (Ruetz et Gros 1995). Ces résultats amènent ces derniers à suggérer un troisième modèle qui s'établit comme suit: les AB, en grande concentration dans la lumière canaliculaire, attirent et solubilisent les molécules de PC du feuillet externe de la membrane pour former des vésicules constituées de PC et AB, et éventuellement de cholestérol. Subséquemment, la P-glycoprotéine mdr2 assure donc la translocation de d'autres molécules de PC vers le feuillet externe afin d'assurer l'approvisionnement de PC du côté du canalicule. Les **figures 3 et 4** illustrent les différents modèles de vésiculation du canalicule.

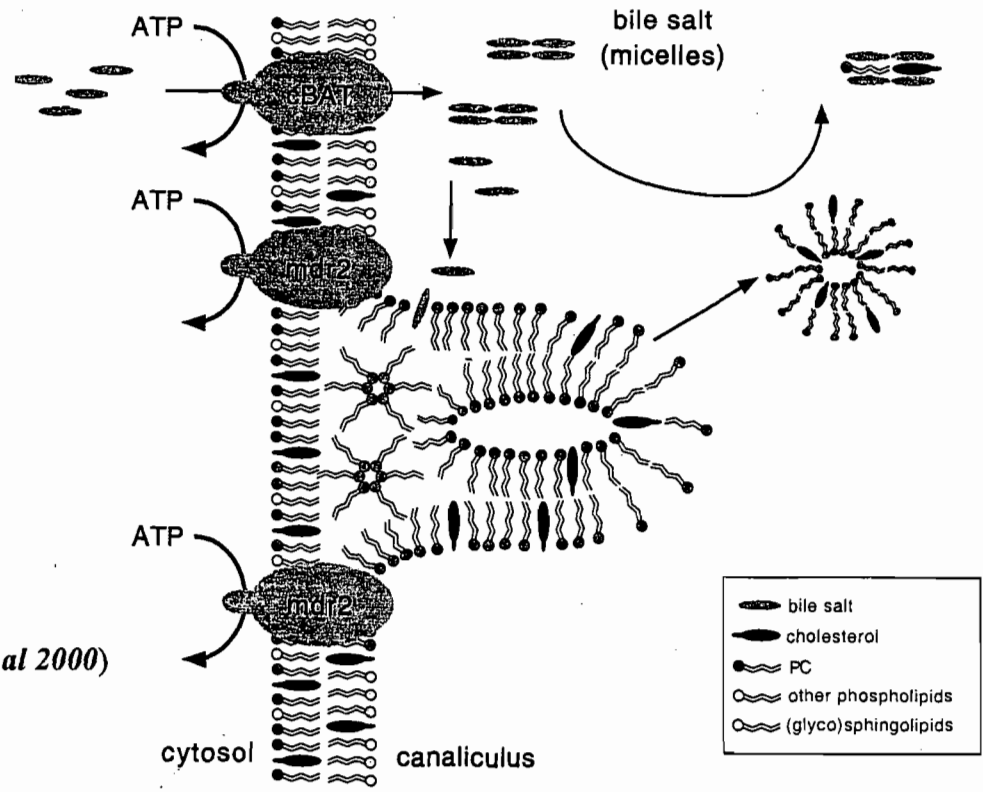
Par ces modèles de vésiculation proposés, une régulation du système de transport du mdr2 semble être induite par la présence d'AB. De plus, les AB et la composition de

leur pool peuvent être d'importants régulateurs de la quantité de phospholipides biliaires (Gupta *et al.* 2000), comme mentionné de façon plus détaillée à la section 1.4.2.2. Cependant, les récentes observations rapportées par l'équipe de Ling et collaborateurs (2001) concernant les souris *sppg* (-/-) homozygotes suggèrent que les AB au niveau intrahépatique sont la force d'attraction majeure de la sécrétion des lipides biliaires. En effet, bien que la sécrétion canaliculaire des AB soit grandement réduite tandis que leur concentration intrahépatique soit augmentée, on observe une augmentation de la sécrétion des phospholipides et du cholestérol biliaires chez ces souris mutantes. Bien sûr, tous ces modèles sont du domaine spéculatif, et d'autres recherches effectuées à l'aide de techniques plus sophistiquées sont nécessaires afin de vérifier ces hypothèses.

Figures 3 et 4. Modèles de vésiculation lipidique proposés dans la lumière canaliculaire



(tiré de *Ruetz et Gros 1995*)



(tiré de *Borst et al 2000*)

1.7 Modulation du transport et de la sécrétion canaliculaire par les acides biliaires

Suite aux nombreuses expériences faites sur l'homme et sur de nombreuses espèces animales, nous sommes en mesure de constater que la sécrétion des lipides biliaires, soit des phospholipides et du cholestérol, est fortement reliée à la sécrétion des AB (Mazer et Carey 1984, Yousef *et al.* 1990, Coleman et Rahman 1992, Verkade *et al.* 1995). Des études faites sur le rat ainsi que d'autres espèces animales montrent clairement que le taux de sécrétion biliaire du cholestérol et des phospholipides augmente de façon linéaire parallèlement avec un taux de sécrétion relativement bas d'acides biliaires (Barnwell *et al.* 1987, Bilhartz et Dietschy 1988, Cohen *et al.* 1992). De plus, les AB hydrophobes stimulent davantage la sécrétion des lipides biliaires que ne le font les AB hydrophiles (Heuman 1989).

Au delà de ces observations, bon nombre de résultats portant sur l'effet des AB sur le transport et la sécrétion des phospholipides et du cholestérol dans la bile indiquent que les AB stimulent ces deux paramètres (transport et sécrétion) à plusieurs niveaux de l'hépatocyte (voir 1.4.2.2 et 1.5.2). À la lumière de ces résultats, des modèles généraux au sujet de la modulation par les AB sur la sécrétion biliaire ont été proposés. Cohen (1996) suggère que l'accumulation d'AB à l'intérieur du feuillet ectoplasmique de la membrane canaliculaire favorise la vésiculation des molécules de PC membranaires. Cette vésiculation crée probablement un gradient des molécules de PC, qui, sous l'action de la flippase, subissent une translocation du côté cytoplasmique vers la lumière canaliculaire. Par conséquent, le feuillet endoplasmique de la membrane devient relativement déplété en PC. Le réapprovisionnement de molécules de PC est assuré par la présence de AB dans la membrane du réticulum endoplasmique qui stimulent l'activité de la PC-TP et, à un moindre degré, de la SCP-2. Ce modèle supporte celui de la régulation intracaniculaire par les AB proposé par Verkade et collaborateurs (1995). Ces derniers appuient leur hypothèse sur le mécanisme par lequel les anions organiques, tels que l'ampicilline, les AB sulfatés et la bilirubine ditaurate, se lient aux AB au

niveau du canalicule, empêchant les AB de stimuler la sécrétion de PC et de cholestérol biliaires. Également, les modèles proposés par Ruetz et Gros (1995) ainsi que Higgins (1994), Smit *et al.* (1994) (voir 1.5.2) corroborent bien l'hypothèse intracaniculaire (**figures 3 et 4**). Une autre hypothèse, celle dite intracellulaire, propose que la stimulation de la sécrétion des lipides par les AB s'effectue dans le milieu cytoplasmique par l'initiation et le co-transport des phospholipides et le cholestérol (Coleman et Rahman 1992). À cet effet, de récents travaux utilisant des souris homozygotes *sppg* (-/-) montrent qu'en dépit d'une diminution significative de la sécrétion biliaire des AB, on observe une augmentation de la sécrétion des phospholipides et du cholestérol dans la bile (Wang *et al.* 2001). Ces résultats, associés avec une augmentation des AB dans l'hépatocyte, suggèrent que le site intrahépatocytaire est le lieu où les AB stimulent la sécrétion des lipides dans la bile (Wang *et al.* 2001). Cette controverse au sujet de l'hypothèse intracellulaire versus intracaniculaire démontre que d'autres techniques plus raffinées sont nécessaires afin de permettre une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la sécrétion des lipides biliaires.

Que ce soit selon l'hypothèse intracaniculaire ou intracellulaire, l'approvisionnement des molécules de PC vers la membrane canaliculaire est assuré. Lorsque des doses croissantes d'AB sont infusées, la sécrétion des lipides biliaires, incluant celle des phospholipides, augmente jusqu'à atteindre un maximum de sécrétion (Yousef *et al.* 1987). Par la suite, on observe un déclin de la sécrétion de ces lipides et l'apparition de la cholestase (Yousef *et al.* 1987, Barnwell *et al.* 1987). Certains auteurs proposent que l'épuisement du pool des phospholipides destinés à approvisionner la membrane pourrait être un facteur majeur dans le contrôle de la réponse cholestatique (Yousef *et al.* 1987).

Au cours des dernières années, plusieurs études ont permis d'approfondir nos connaissances sur les diverses étapes qui caractérisent la sécrétion de la bile et des lipides biliaires. Entre autres, ces recherches ont permis d'établir l'importance de la sécrétion canaliculaire qui constitue une étape limitante dans la sécrétion des lipides

dans la bile. Plus récemment, l'identification de plusieurs protéines de transport contribue à comprendre davantage les facteurs impliqués dans la formation et la sécrétion biliaire. Également, ces nouvelles connaissances nous éclaireront sûrement sur les différentes causes de la cholestase intrahépatique, sujet du prochain chapitre.

2. Cholestase intrahépatique

2.1 Définition

La terme cholestase vient du grec *kholê*, qui veut dire bile, et du mot *stasis*, qui veut dire arrêt. On définit donc la cholestase comme une diminution du débit normal de la bile accompagnée d'une accumulation dans le sang et dans le foie de constituants biliaires (Tuchweber *et al.* 1986). La cholestase peut se manifester très différemment, par exemple selon le site anatomique d'obstruction, et la présence ou non de pathologies associées. C'est pourquoi il est difficile d'établir une classification selon des critères établis. Il existe quand même deux grandes classes de cholestase, soit la cholestase intrahépatique (CIH) et la cholestase extrahépatique. La CIH se définit comme une diminution de la sécrétion et de la formation de la bile indépendante d'un blocage des voies biliaires (cholestase extrahépatique).

Les causes menant à la CIH sont diverses. Ces perturbations d'ordre biophysique et biochimique peuvent être associées à la grossesse, à des infections diverses (hépatite), à la consommation d'alcool, aux AB monohydroxylés, aux hormones sexuelles, de même qu'à la nutrition parentérale totale. Plusieurs désordres génétiques, tels que la CIH familiale progressive de type 1,2 et 3, et le syndrome Dubin-Johnson, constituent également des facteurs étiologiques de la CIH (Jansen et Muller 2000).

2.2 Cholestase induite par les acides biliaires

De par leur composition, les AB possèdent des propriétés détergentes importantes, ce qui leur confère le pouvoir d'altérer la composition membranaire par la solubilisation

des composés lipidiques intrinsèques à cette membrane. Ce processus peut mener à la modification des propriétés physico-dynamiques des membranes hépatocytaires, incluant la membrane canaliculaire, et donc de diminuer la sécrétion de substances osmotiques normalement retrouvées dans la bile canaliculaire. De tels événements peuvent conduire à la diminution de la formation de la bile, phénomène nommé CIH. D'ailleurs, une accumulation d'AB et des modifications de leur profil qualitatif ont été observées dans plusieurs conditions cholestatiques. La cholestase induite par les AB étant très reproductible, elle s'avère être un modèle de choix dans l'étude des différents mécanismes portant sur les anomalies de formation de la bile.

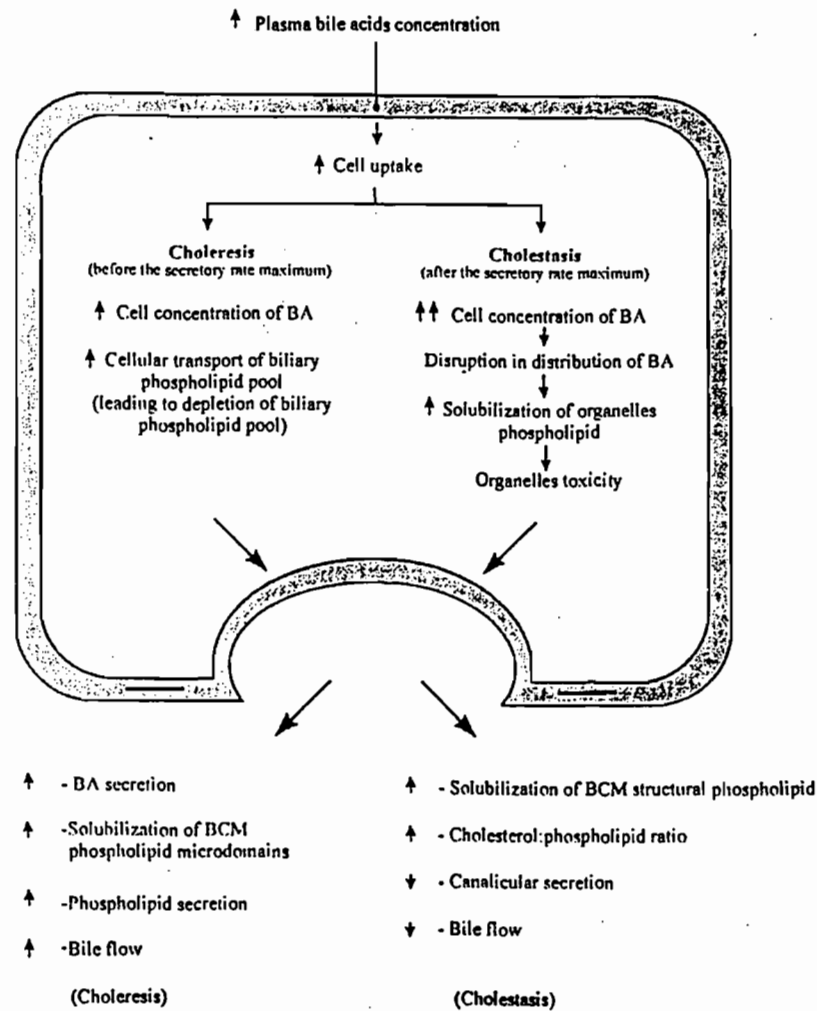
La CIH peut être induite par une altération à n'importe quel niveau des multiples étapes dans la sécrétion des AB. En effet, plusieurs recherches ont démontré que la cholestase induite par les AB peut être expliquée par plusieurs défauts affectant la sécrétion et le transport entérohépatique des AB, et qui concernent des anomalies dans la synthèse et dans la biotransformation des AB communs (Tuchweber *et al.* 1986, Sellinger et Boyer 1990, Yousef *et al.* 1998). Cette irrégularité peut se traduire par une augmentation de la concentration d'AB, une augmentation des AB monohydroxylés et à la présence d'AB atypiques (Radomska *et al.* 1993, Ostrow 1993).

2.2.1 Cholestase induite par des doses croissantes d'acides biliaires

Certains AB, comme les AB hydrophiles tels que l'acide cholique, sont cholérétiques à des doses physiologiques. Toutefois, tous les AB, lorsqu'ils sont administrés à forte concentration, induisent la CIH (**figure 5**). En effet, lorsqu'on infuse à des doses constantes l'acide cholique ou un autre AB, la sécrétion biliaire et le flux biliaire atteignent leur maximum de sécrétion (T_{Sm}) et diminuent par la suite. Lorsque le taux maximal de sécrétion est dépassé, une toxicité peut s'installer au niveau du système de transport et ainsi réduire la sécrétion des AB, ce qui mène à une diminution du débit biliaire (Drew et Priestly 1979). Cependant, d'autres mécanismes ont été suggérés afin d'expliquer la diminution de la sécrétion des AB après le T_{Sm}. En effet, lorsque les AB sont infusés en doses croissantes, ils seraient plutôt excrétés très efficacement par le

foie, ce qui augmenterait leur concentration cellulaire. D'ailleurs, Small (1970), ainsi que Yousef et Fisher (1976), ont suggéré que les AB solubilisent la PC de la membrane canaliculaire lorsqu'ils sont sécrétés dans la lumière canaliculaire. Cette hypothèse est par la suite confirmée par des résultats montrant qu'une infusion continue d'AB induit une déplétion des phospholipides biliaires, ainsi que la solubilisation des membranes hépatocytaires (Barnwell *et al.* 1987, Yousef *et al.* 1987, Roy *et al.* 1989). Des phospholipides provenant d'un pool intracellulaire sont alors mis à contribution afin de remplacer des domaines de phospholipides qui ont été préalablement réduits. À son tour, ce pool de phospholipides peut être épuisé, empêchant l'approvisionnement des phospholipides à la membrane canaliculaire et compromettant l'intégrité membranaire. Par conséquent, les AB en grande concentration deviennent toxiques pour l'hépatocyte et l'apparition de la cholestase est secondaire à cette toxicité (Yousef *et al.* 1998). C'est pourquoi Yousef et ses collaborateurs proposent que ce type de cholestase soit référé à la cholestase induite par la toxicité des AB (Yousef *et al.* 1998). La figure 5 illustre bien les différents mécanismes impliqués dans la phase cholérétique et cholestatique lors de la cholestase induite par une concentration croissante d'AB.

Figure 5. Mécanismes proposés lors d'une cholestase induite par des doses croissantes d'acides biliaires



(tiré de *Yousef et al 1998*)

2.2.2 Cholestase induite par les acides biliaires monohydroxylés

L'ALC est un AB monohydroxylé naturel et présent en très faible quantité chez les sujets normaux, c'est-à-dire environ 5% du pool d'AB. Il est synthétisé principalement dans l'intestin par la modification du substituant hydroxy des AB par les enzymes bactériennes présentes dans la section distale de l'intestin. Ce mécanisme se nomme la 7 α -déhydroxylation, c'est-à-dire la déhydroxylation de l'acide chenodeoxycholique en ALC. Il est également formé, mais en moindre importance, par un mécanisme

impliquant la réaction 26-hydroxylation du cholestérol hépatique. L'ALC peut être sous la forme hydroxylée, sulfatée et peut être également conjugué avec la glycine, la taurine et l'acide glucuronide.

L'ALC et sa forme conjuguée l'acide tauroolithocholique (ATLC) sont des agents cholestatiques et leur accumulation dans l'organisme peut initier ou contribuer à la toxicité hépatique. Une quantité anormalement élevée est observée chez les personnes s'alimentant par voie parentérale totale, chez ceux qui sont traités avec l'acide chenodeoxycholique contre les lithiases biliaires, et chez les patients qui présentent une cholestase. Chez les animaux, il a été montré que l'ALC et ses conjugués peuvent induire une CIH rapide, sévère, réversible et dépendante de la dose administrée (Kakis et Yousef 1978, Gratton *et al.* 1987, Vu *et al.* 1992b). Plusieurs perturbations et mécanismes ont été proposés en ce qui a trait à la pathogénèse de la cholestase induite par l'ALC et l'ATLC (**figure 6**). Toutefois, il est difficile de distinguer le désordre initial menant au développement de la CIH des conséquences secondaires, en raison des malfunctions hépatiques et de l'accumulation de composés toxiques associées à la CIH.

2.2.2.1 Perturbations observées

Dans la CIH expérimentale induite par l'ALC, la capture basolatérale de l'AB ne semble pas être affectée, contrairement à la sécrétion canaliculaire qui est significativement diminuée, ce qui conduit à une accumulation de l'AB dans l'hépatocyte (Tuchweber *et al.* 1986). Lors de la CIH induit par l'injection de l'ALC, on constate une réduction de la sécrétion des lipides biliaires, c'est-à-dire une diminution des AB endogènes, des phospholipides et du cholestérol. Également, on observe une augmentation de la sécrétion biliaire des protéines cytoplasmiques et membranaires. Ces perturbations sont également accompagnées par une augmentation importante de cholestérol dans la membrane canaliculaire (Kakis et Yousef 1978, Vu *et al.* 1992). Des observations effectuées à l'aide de la microscopie électronique révèlent des modifications structurales importantes telles que la dilatation canaliculaire, la perte

de microvillosités, la transformation lamellaire des membranes et l'accumulation des substances amorphes dans les membranes canaliculaires (Bonvicini *et al.* 1978).

2.2.2.2 Mécanismes proposés

Quelques mécanismes expliquant la pathogénèse de la cholestase induite par l'ALC ont été proposés et sont illustrés à la **figure 6**.

2.2.2.2.1 Augmentation de la nouvelle synthèse du cholestérol

Des études antérieures ont démontré que les altérations morphologiques observées dans la cholestase induite par l'ALC sont associées à une élévation de cholestérol dans la membrane canaliculaire (Kakis et Yousef 1978, Yousef *et al.* 1984). De plus, la synthèse *de novo* de cholestérol est augmentée et son transport vers les membranes canaliculaires facilité (Yousef et Tuchweber 1984). Ces auteurs montrent également que l'ALC peut décaper "stripping" le cholestérol des membranes du réticulum endoplasmique en l'absence de nouvelle synthèse de cholestérol, et suggèrent que le transfert du cholestérol vers la membrane canaliculaire pourrait être l'étape initiale dans le développement de la cholestase induite par l'ALC et l'ATLC. On ne connaît pas encore la façon dont le cholestérol est transporté jusqu'au pôle apical mais il est suggéré qu'il emprunte la même voie de transport que les AB, c'est-à-dire lié avec les protéines cytoplasmiques (Yousef *et al.* 1998).

2.2.2.2.2 Liaison entre ALT et les protéines cytoplasmiques

Les AB se lient donc aux protéines cytoplasmiques pour atteindre la membrane apicale. De plus, il est établi que le degré d'hydrophobicité est proportionnel à l'efficacité de la liaison. Par conséquent, la liaison de l'ALC avec des protéines cytoplasmiques semble jouer un rôle important dans la pathogénèse de la CIH. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse de protéines, le cycloheximide, protège partiellement contre la cholestase induite par l'ALC et son conjugué l'acide tauroolithocholique (ATLC)

(Yousef *et al.* 1983, Dahlstrom-King et Plaa 1989). La liaison AB monohydroxylé et protéines cytoplasmiques mène à une augmentation d'ALC dans la cellule hépatique, causant des perturbations dans la distribution intracellulaire et le transport vers les organelles de cet AB. Par exemple, il est suggéré qu'une liaison avec les protéines microsomales pourrait causer une augmentation de la synthèse de cholestérol ou du moins, que davantage de cholestérol nouvellement synthétisé soit libéré et transporté vers la membrane canaliculaire (Yousef *et al.* 1984, Gratton *et al.* 1987, Yousef *et al.* 1998).

2.2.2.2.3 Modification de la composition lipidique de la membrane canaliculaire

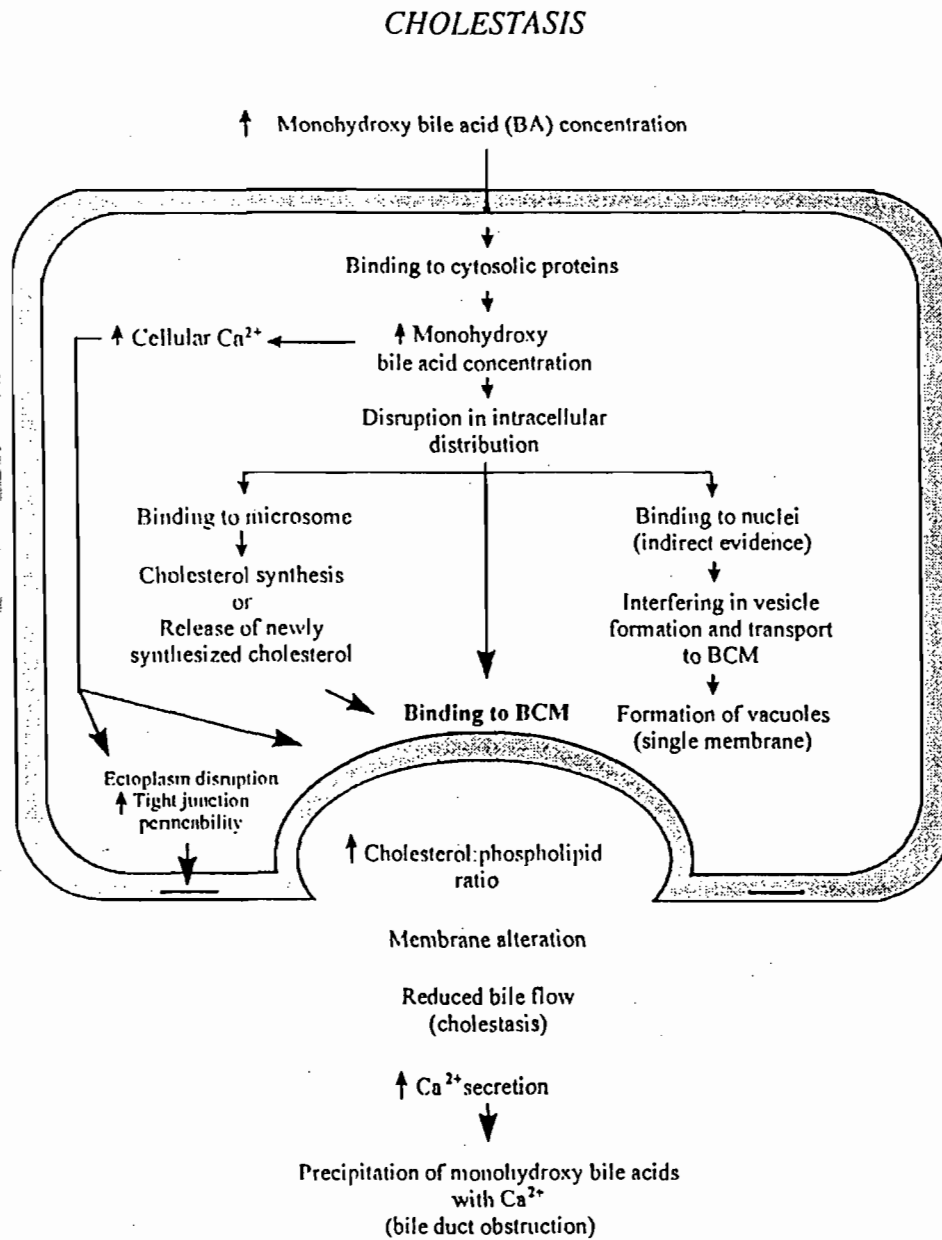
Bien que l'action de l'ALC et l'ATLC sur les membranes plasmiques et microsomales ne soit pas clairement établie, plusieurs recherches ont démontré que la liaison entre ALC et la membrane canaliculaire cause une altération à sa structure membranaire et facilite l'incorporation de molécules de cholestérol dans la membrane (Yousef *et al.* 1984). Par ailleurs, comme mentionné précédemment, l'ALC augmente la nouvelle synthèse de cholestérol et facilite son transport vers le pôle apical de l'hépatocyte. Par conséquent, le contenu en cholestérol dans la membrane canaliculaire est augmenté ainsi que le ratio cholestérol/phospholipides. L'équipe de Yousef (1984) a d'ailleurs montré que la liaison du cholestérol et de l'ALC à la membrane était dans un rapport de cholestérol/ALC de 2/1. Ces auteurs proposent que l'insertion de chaque molécule d'ALC dans la bi-couche membranaire perturbe l'organisation normale des molécules lipidiques et crée un espace libre dans cette membrane, permettant ainsi l'incorporation de deux molécules de cholestérol. De plus, la grosseur de la molécule d'ALC (30-35 Angström) est deux fois plus grande que celle du cholestérol (15 Angström), ce qui correspond avec le ratio 2/1 cholestérol/ALC. Les propriétés membranaires comme la fluidité et la perméabilité, sont alors modifiées (Kakis et Yousef 1978), ce qui peut causer une baisse de l'activité sécrétoire, donc une diminution du flux biliaire. L'altération de la composition membranaire du canalicule pourrait ainsi affecter l'activité des systèmes de transport impliqués dans la sécrétion des lipides biliaires, c'est-à-dire les protéines mrp2 et mdr2.

2.2.2.2.4 Interaction ALC et calcium

Des recherches démontrent que tous les AB peuvent induire une augmentation du calcium (Ca^{++}) intracellulaire. Également, il existe une corrélation positive entre le degré d'hydrophobicité de l'AB et le niveau de Ca^{++} intracellulaire. En effet, des études démontrent que les AB cholestatiques, particulièrement ALC et ATLC, peuvent moduler la concentration de Ca^{++} intracellulaire provenant d'un pool du réticulum endoplasmique, par un mécanisme de mobilisation indépendant de l'inositol-triphosphate, mais possiblement dépendant de la protéine kinase c (Marrero *et al.* 1994, Combettes *et al.* 1992). De plus, l'ALC et son conjugué possèdent une capacité jusqu'à dix fois plus grande de liaison avec le Ca^{++} comparé à un AB non cholestatique (Oelberg *et al.* 1984). Cependant, dans le modèle de la cholestase induite par l'ALC et ATLC, l'interaction ALC-calcium ne peut à elle-même être responsable de la CIH. De plus, la formation d'aggrégats insolubles résultant de la liaison du Ca^{++} avec l'ALC et pouvant mener à un blocage du canalicule ne constitue pas un élément indispensable à l'apparition de la cholestase.

Il n'est pas possible d'affirmer que chacune des altérations mentionnées ci-haut et considérées individuellement puissent causer la cholestase induite par l'ALC et l'ATLC. Cependant, l'ensemble de tous ces mécanismes proposés pour expliquer la pathogénèse de la cholestase induite par l'ALC et l'ATLC contribue à une diminution du flux biliaire et de la sécrétion de lipides biliaires et ce, chez plusieurs espèces animales.

La figure 6 résume les différents mécanismes proposés dans la cholestase induite par les AB monohydroxylés.



(tiré de *Yousef et al 1998*)

2.2.2.3 Sulfatation et glucuronidation des acides biliaires

La sulfatation des AB est associée à un effet protecteur contre la CIH (Yousef *et al.* 1992). Cependant, les AB monohydroxylés tel que ALC, lorsqu'il est sous forme sulfatée, s'avère être un agent hautement cholestatique (Yousef *et al.* 1981). Le ALC sulfaté présente une très forte capacité à se lier au Ca^{++} et serait présent sous forme précipitée dans le canalicule (Kuipers *et al.* 1992). La conjugaison de l'ALC avec le glucuronide cause également la CIH, d'autant plus qu'il est considéré comme l'agent le plus cholestatique identifié jusqu'à maintenant. Des événements intracellulaires et transcanaliculaires, tel que la liaison de l'ALC avec le micrososome, pourrait altérer l'homéostasie du Ca^{++} cellulaire, ce qui augmenterait la glucuronidation de l'ALC et contribuerait à la CIH (Vu *et al.* 1992, Yousef *et al.* 1998).

2.2.3 Acides biliaires atypiques

Les AB atypiques sont produits lors de perturbations des enzymes impliquées dans le métabolisme des AB. En effet, des anomalies dans le fonctionnement des enzymes telles que 3beta-hydroxy-5C27-steroïde deshydrogenase, la 3oxo-4-steroïde-5beta-reductase, 26 hydroxylase et des enzymes de la bêta-oxydation, peuvent se traduire par une diminution de la concentration et/ou une diminution de leur activité enzymatique. Il y a alors formation d'AB possédant, par exemple, des groupements hydroxyles en configuration 3beta, des AB à 27 carbones et identifiés comme AB atypiques. Ces derniers ont un grand potentiel cholestatique et, par conséquent, leur présence peut provoquer la CIH. Les mécanismes d'action de cette forme de cholestase ne sont pas très bien connus. Cependant, il est suggéré que la production substantielle d'AB atypiques diminue la quantité d'AB primaires et cholérétiques, ce qui cause une diminution du débit biliaire. Certaines maladies métaboliques peuvent entraîner la production d'acides biliaires atypiques. Un tel désordre est rapporté chez l'homme, incluant les enfants souffrant de cholestase et ayant une déficience en 3beta-hydroxy-5C27-steroïde deshydrogenase (Clayton *et al.* 1987), chez des enfants atteints de maladies cholestatiques familiales (Clayton *et al.* 1988), et chez les patients atteints de xanthomatose cérébrotendineuse (Bjorkhem *et al.* 1987).

3. Effets des phospholipides alimentaires sur l'homéostasie du cholestérol et la sécrétion des lipides biliaires

3.1 Métabolisme de la choline et des phospholipides

3.1.1 Métabolisme de la choline libre

La choline est une amine qui, sous forme libre, participe à cinq voies enzymatiques majeures. Elle peut être utilisée pour subir l'acétylation afin de produire l'acétylcholine, un neurotransmetteur cholinergique. La choline peut être oxydée en bétaine, un donneur de groupe méthyl, qui participe à la méthylation de l'homocystéine pour produire la méthionine, une protéine impliquée dans la synthèse protéique. Également, la choline peut participer à la formation de la sphingomyéline lors du transfert de la phosphocholine en céramide.

La choline libre est également un précurseur dans la synthèse de la PC. En effet, la choline est phosphorylée en phosphocholine, qui constitue la première étape qui mène à la formation de la PC. On estime que chez le rat, la choline libre serait utilisée à 30% pour la synthèse de la PC au niveau du foie, tandis que 60% sert à la production de la bétaine (Vance 1989). Une autre voie de synthèse de la PC, celle-ci beaucoup moins importante, consiste à substituer l'une des têtes des phospholipides, soit de la sérine, l'inositol ou l'éthanolamine, en échange d'une molécule de choline, pour former la PC. Plusieurs études ont démontré que la choline est nécessaire à la survie de la cellule et que celle-ci meurt par apoptose lorsqu'elle est dépourvue en ce nutriment (Albright *et al.* 1996, Shin *et al.* 1997). Le seul moyen de générer de nouvelles molécules de choline est par la voie de méthylation de la PE, expliquée plus en détail à la section 3.1.3.2. Actuellement, un débat persiste à savoir si la choline est un nutriment essentiel pour l'homme (Zeisel 2000).

3.1.2 Définition et structure des phospholipides

Les phospholipides englobent un groupe hétérogène de lipides, glycérophospholipides et sphingomyéline qui ont en commun leur rôle essentiel dans la structure des membranes, où ils participent à la formation de la matrice de la bicouche lipidique. Dans la membrane, ils sont placés de façon à présenter leur pôle hydrophile vers l'extérieur de la membrane et le pôle hydrophobe dans l'épaisseur de la membrane elle-même. Les phospholipides sont également précurseurs d'hormones comme les eicosanoïdes et de molécules de signalisation comme les produits de la dégradation des inositol-phospholipides.

Il existe deux grandes classes de phospholipides caractérisées par la nature du glycérol. Les glycérophospholipides et la sphingomyéline. Cette dernière est constituée d'une molécule de sphingosine et d'une molécule de phosphocholine. C'est un lipide majeur dans les membranes tissulaires des animaux, en particulier des tissus nerveux. Les glycérophospholipides sont constitués d'une molécule de glycérol estérifiée par un ou plusieurs acides gras et par une molécule d'acide phosphorique qui donne un acide phosphatidique. Cet acide phosphatidique est lui-même estérifié par un groupement alcool. La nature de l'alcool permet de distinguer les différentes têtes polaires des phospholipides. Également, les résidus acyles fixés sur les atomes de carbone (C) 1 et C2 peuvent varier considérablement suivant leur origine, par exemple selon leur longueur de chaîne et leur degré d'insaturation. Généralement, l'acide gras sur le C1 ou en position 1 (sn-1) est saturé tandis qu'en position 2 (sn-2), il est insaturé. La PC, la PE, la phosphatidylinositol et la phosphatidylsérine constituent les principaux phospholipides et leur structure moléculaire, ainsi que celle de la sphingomyéline, sont illustrées à la **figure 7**.

3.1.3 Métabolisme hépatique de la Phosphatidylcholine

Comme il a été mentionné précédemment, les phospholipides sont des constituants lipidiques des membranes cellulaires, dont celles de l'hépatocyte. Dans la bile, les

Il existe deux voies de biosynthèse de la PC. La voie de la CDP-choline et la voie de la méthylation de la PE. Un schéma décrivant les étapes de la biosynthèse de la PC et la PE est présenté à la **figure 8**.

3.1.3.1 Biosynthèse de la PC par la voie de la CDP-choline

La principale voie de biosynthèse de la PC chez les vertébrés est celle de la CDP-choline, également nommée la voie de Kennedy (Kennedy et Weiss 1956). Les principaux sites cellulaires de la biosynthèse sont le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries (Vance et Vance 1988, Bishop et Bell 1988). La deuxième voie de synthèse de la PC est celle de la méthylation de la PE, décrit à la page suivante (section 3.1.2.2).

La première étape de la voie de de la synthèse la CDP-choline est la phosphorylation de la choline qui produit la phosphocholine, sous l'action enzymatique de la choline kinase. Cette enzyme est cytoplasmique et requiert l'ATP et la présence de Mg^{2+} . Ensuite, la phosphocholine se lie avec une molécule de cytidine triphosphate (CTP) et forme la CDP-choline, cette réaction étant catalisée par l'enzyme choline phosphatase cytidylyltransferase (localisée dans le cytoplasme, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi). L'étape finale de la biosynthèse des PC est la combinaison d'une molécule de diacylglycérol avec la CDP-choline, qui est catalisée cette fois par la choline phosphotransférase (localisée dans le réticulum endoplasmique) (Vance 1989, Kent 1990).

De ces étapes décrites ci-haut, deux enzymes sont identifiées comme régulant la voie de biosynthèse CDP-choline: la choline kinase et la CTP: phosphocholine cytidylyltransferase ou cytidylyltransferase (CCT). La choline kinase provenant du foie de rat est un tétramère de 47kDa (Porter et Kent 1990). Il existerait plusieurs isoformes de la choline kinase, ce qui pourrait expliquer que l'augmentation de son activité n'est pas toujours reliée à l'augmentation de la synthèse de PC (Ishidate *et al.* 1985).

La CCT a reçu beaucoup d'attention en ce qui a trait à la régulation de la voie de la CDP-choline. Cette enzyme est d'ailleurs reconnue comme catalisant l'étape limitante de cette voie de synthèse (Vance *et al.* 1980). La CCT est un homodimère dont le poids moléculaire d'une sous-unité est de 42 kDa (Cornell 1989). Elle a été clonée à partir du foie de rat (Kalmar *et al.* 1990), révélant l'existence d'un domaine catalytique qui ne nécessiterait pas d'intermédiaire mais impliquerait plutôt une action directe de l'enzyme (Kent 1997). L'activation de la CCT se produit lorsqu'elle se lie à la membrane tandis qu'elle est inactive dans le milieu cytoplasmique (Kent 1990). Cette enzyme pourrait être également régulée par un cycle de phosphorylation/déphosphorylation, la forme déphosphorylée étant la forme active (Sanghera et Vance 1989).

3.1.3.2 Biosynthèse de la PC par la voie de la méthylation de la PE

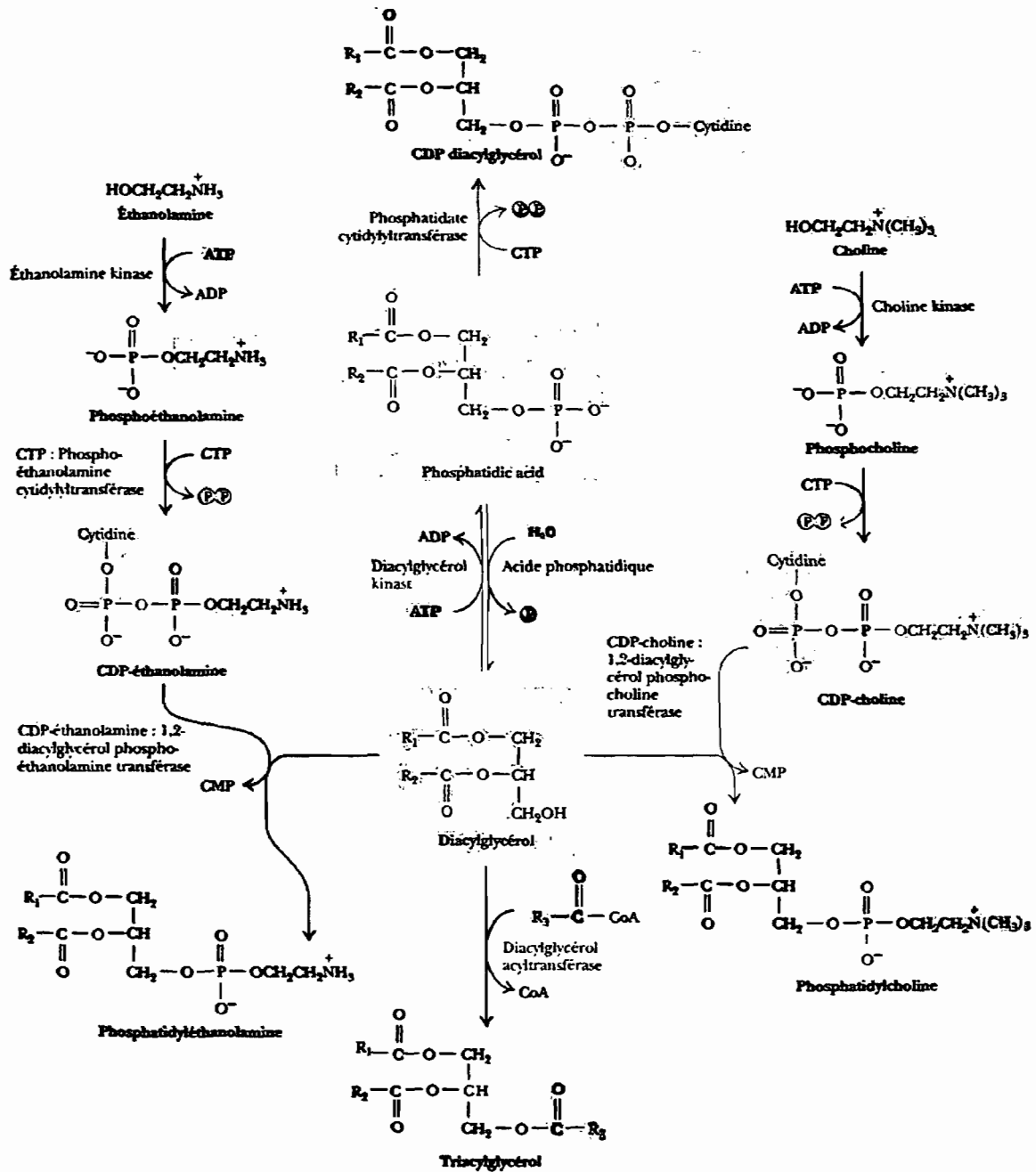
Bremer et Greenberg (1961) découvrent une deuxième voie de synthèse de PC et par laquelle la PE est méthylée en PC. Cette voie est surtout active dans le foie. On évalue sa contribution entre 20 et 40% du PC nouvellement synthétisé par l'hépatocyte. Dans ce sens, l'hépatocyte est unique parce qu'il possède l'activité enzymatique de la voie de méthylation de PE tout en maintenant aussi un très haut taux d'activité de la voie de la CDP-choline.

Cette voie de synthèse des PC est caractérisée, comme son nom l'indique bien, par la méthylation d'une molécule de PE. La PE est ainsi méthylée par trois molécules de S-adénosylméthionine de façon successive pour donner la monométhylPE, la diméthylPE et la triméthylPE, qui est en fait la PC.

La réaction de méthylation du PE est catalysée par une PE *N*-méthyltransferase (PEMT) qui est principalement active dans le foie et qui régularise cette voie de biosynthèse. PEMT est une protéine avec un poids moléculaire de 22.5 kDa et qui a été purifiée à partir du foie de rat (Cui *et al.* 1993). Jusqu'à maintenant, deux formes de cette enzyme, la PEMT1 et la PMET2, ont été identifiées. L'activité de la PEMT1 est

associée avec le réticulum endoplasmique tandis que la PEMT2 est localisée dans les membranes mitochondriales (Cui *et al.* 1993). L'expression du gène est régulée par la choline alimentaire, une diète déficiente en choline induisant une augmentation de l'activité (Cui et Vance 1996). De récents résultats révèlent que le profil en acides gras des molécules de PC est associé à l'origine de la voie de synthèse (DeLong *et al.* 1999). En effet, cette étude démontre que les molécules de PC qui proviennent de la voie CDP-choline sont constituées principalement d'acides gras saturés (l'acide palmitique et l'acide stéarique (16:0 et 18:0)) tandis que celles qui originent de la voie de la méthylation sont plus diversifiées, avec une préférence pour les acides gras saturés (l'acide stéarique 18:0) et polyinsaturés (l'acide arachidonique 20:4) à longue chaîne. Par ailleurs, les acides gras à longue chaîne sont considérés toxiques pour les cellules puisqu'ils auraient comme effet d'inhiber la croissance cellulaire (Cui *et al.* 1994). De ce fait, il est proposé que la distinction dans le profil des acides gras entre les deux différentes voies de synthèse peut contribuer aux fonctions spécifiques à chacune de ces voies. Les auteurs suggèrent que cette différence peut signifier que chacune des voies agit selon des fonctions spécifiques (DeLong *et al.* 1999). En ce qui concerne la voie de la méthylation de PE, la PEMT pourrait jouer un rôle dans la régulation de la croissance de l'hépatocyte et sa division cellulaire (Vance *et al.* 1997).

Figure 8



(tiré de Garrett et Grisham 2000)

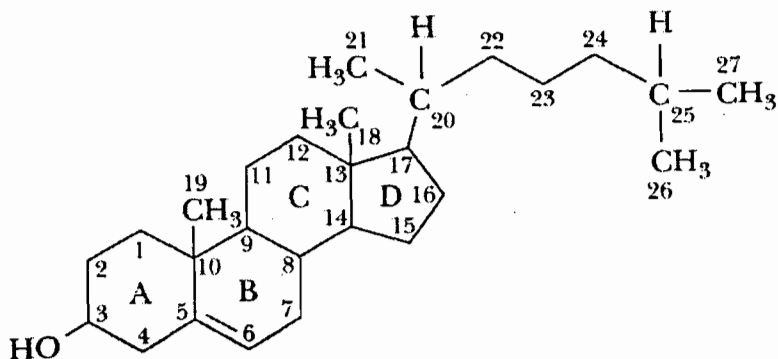
3.2 Métabolisme hépatique du cholestérol

Le foie est le principal lieu d'un grand nombre d'événements métaboliques qui mènent à la synthèse, la transformation et l'élimination du cholestérol via la sécrétion biliaire sous forme libre, ou sous forme d'acides biliaires, suite à une conversion hépatique. Chez l'homme, on estime que 50 à 60% du cholestérol métabolisé par jour est transformé en AB, tandis que 30% est sécrété dans la bile sous forme de cholestérol libre.

3.2.1 Biosynthèse du cholestérol

La biosynthèse du cholestérol commence dans le cytoplasme avec la formation de mévalonate. Les étapes initiales comportent la formation d'acétoacétyl coenzyme A (CoA) à partir de deux molécules d'acétyl CoA. Ensuite, une autre molécule d'acétyl CoA se lie à l'acétoacétyl CoA pour former le 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Cette réaction est catalysée par la HMG-CoA synthase. L'HMG CoA est par la suite réduit en 3R-mévalonate dans une réaction qui consomme 2 NADPH. Cette troisième étape de la séquence est catalysée par l' HMG-CoA réductase. Cette molécule subit une série de phosphorylations et de décarboxylations, menant à la formation d'isopentyl pyrophosphate. La polymérisation de l'isopentyl-pyrophosphate conduit à la formation de géranyl pyrophosphate et s'ensuit une série de réactions permettant d'obtenir le squalène. La cyclination et le réarrangement intramoléculaire du squalène aboutissent à la formation du quadruple noyau cyclo-pentano-phénantrène. Par la suite, de multiples déméthylations du squalène mènent enfin à la production d'une molécule de cholestérol, comme celle illustrée à la **figure 9**.

Figure 9. Structure moléculaire du cholestérol



(tiré de *Garrett et Grisham 2000*)

3.2.2 Régulation de la biosynthèse

Le foie est l'organe qui assure l'homéostasie du cholestérol à travers l'organisme. La régulation étroite des niveaux intracellulaires hépatiques en cholestérol est assurée par trois enzymes clefs: l'HMG-CoA réductase, l'acyl cholestérol acyl transferase (ACAT) et la cholestérol 7 α -hydroxylase.

3.2.2.1 L'HMG-CoA réductase

L'HMG-CoA réductase est identifiée comme l'étape limitante et le principal site de régulation de la nouvelle synthèse du cholestérol. C'est une enzyme de 97 kDa qui traverse la membrane du réticulum endoplasmique et dont le site actif fait face au cytoplasme. Trois mécanismes différents interviennent dans sa régulation. D'abord, une phosphorylation par des kinases dépendantes de l'AMP cyclique inactive la réductase. Cette inactivation peut être levée par deux phosphatases spécifiques, comme

illustré à la **figure 10**. Ceci permet un contrôle rapide des niveaux d'activité. La régulation de l'expression du gène par la concentration en cholestérol constitue le deuxième mécanisme. Par conséquent, si la concentration en cholestérol est élevée, la synthèse d'ARN messenger codant pour l'HMG-CoA réductase est diminuée. Au contraire, si la concentration du cholestérol est faible, la synthèse de l'ARNm est stimulée (Ness *et al.* 1991). Enfin, le troisième mécanisme à intervenir est la synthèse et la dégradation de l'enzyme, qui sont relatifs au niveau cellulaire de cholestérol (Hampton 1998). Ainsi, la durée de la demi-vie de l'enzyme, qui est de 3 heures, sera plus courte si la concentration de cholestérol est plus élevée.

3.2.2.2 La ACAT

La quantité de cholestérol libre dans l'hépatocyte est étroitement régulée par une variété de mécanismes cellulaires. Un des mécanismes importants de cette régulation est la conversion du cholestérol libre en ester de cholestérol, catalysée par l'enzyme ACAT. Certaines études suggèrent que cette enzyme a comme fonction première de prévenir l'accumulation toxique de cholestérol libre dans les membranes et de promouvoir l'assemblage des VLDL (Spector *et al.* 1979, Drevon *et al.* 1980). L'ACAT est localisée dans le réticulum endoplasmique rugueux et s'avère être une protéine membranaire intégrale (Chang *et al.* 1997). C'est une protéine monomère d'un poids moléculaire de 65 kDa. Son niveau d'activité est fortement influencé par les concentrations cellulaires de cholestérol et de 25-hydroxycholestérol provenant des LDL (Chang *et al.* 1997). L'ester de cholestérol nouvellement formé par l'action de l'ACAT est ensuite entreposé dans le réticulum endoplasmique lisse et dans le cytoplasme. Ce pool d'entreposage représenterait une étape intermédiaire avant d'être utilisé dans l'assemblage des lipoprotéines, comme constituants membranaires ou bien être reconverti en cholestérol libre pour être ensuite sécrété dans la bile (Chang *et al.* 1997, Drevon *et al.* 1980). Il y aurait plusieurs gènes ACAT fonctionnels, et les formes 1 et 2 présenteraient l'activité essentielle d'estérification du cholestérol chez l'homme (Chang *et al.* 1997).

3.2.2.3 La cholestérol 7alpha-hydroxylase

La cholestérol 7alpha-hydroxylase représente l'étape limitante dans la voie de synthèse des AB. Précisément, cette enzyme catalyse la conversion du cholestérol en 7alpha-hydroxycholestérol, précurseur d'AB, principalement de l'acide cholique. La cholestérol 7alpha-hydroxylase appartient au groupe des oxygénases à fonction mixte et comme les deux autres enzymes clefs, elle est localisée dans le réticulum endoplasmique (Vlahcevis *et al.* 1991) (**figure 11**). Elle a été purifiée à partir de foie de rat (Ogishima *et al.* 1987) et le gène de cette enzyme est constituée de 6 introns et 5 exons codant pour une protéine de 11 kDa (Li *et al.* 1990). L'activité de la cholestérol 7 alpha-hydroxylase est régulée au niveau transcriptionnel par le niveau d'AB. C'est ainsi que lorsque les AB atteignent le foie (cycle entérohépatique), un signal est acheminé au gène de la cholestérol 7 alpha-hydroxylase, entraînant la diminution de la transcription du gène (Stravitz *et al.* 1993). Cependant, seuls les AB hydrophobiques peuvent réguler négativement l'activité de l'enzyme (Heuman *et al.* 1989). Des études démontrent que le cholestérol alimentaire peut également réguler cette enzyme. Ainsi, le cholestérol de la diète augmente la transcription du gène chez le rat et la souris, tandis qu'il inhibe la synthèse de l'ARNm chez l'homme, les primates, le lapin et le hamster (Schwarz *et al.* 1998). L'activation de la transcription du gène chez le rat et la souris proviendrait d'une séquence promotrice sensible aux oxystérols. Toutefois, cette séquence promotrice serait absente chez l'homme (Schwarz *et al.* 1998). La cholestérol 7 alpha-hydroxylase pourrait être également régulée par un cycle de phosphorylation/déphosphorylation. En effet, des recherches montrent que la cholestérol 7 alpha-hydroxylase est active sous forme phosphorylée et inactive sous la forme déphosphorylée (Nguyen *et al.* 1996).

Une deuxième voie de synthèse des AB, la voie de la 27-hydroxycholestérol, représente une alternative à la voie classique et est impliquée dans la synthèse des AB primaires, soit l'acide cholique et l'acide chenodeoxycholique. On identifie donc la voie classique comme la voie neutre ou microsomale et la voie alternative comme la voie acide ou mitochondriale (Agellon et Torchia 1999). Au cours de la réaction impliquant la voie

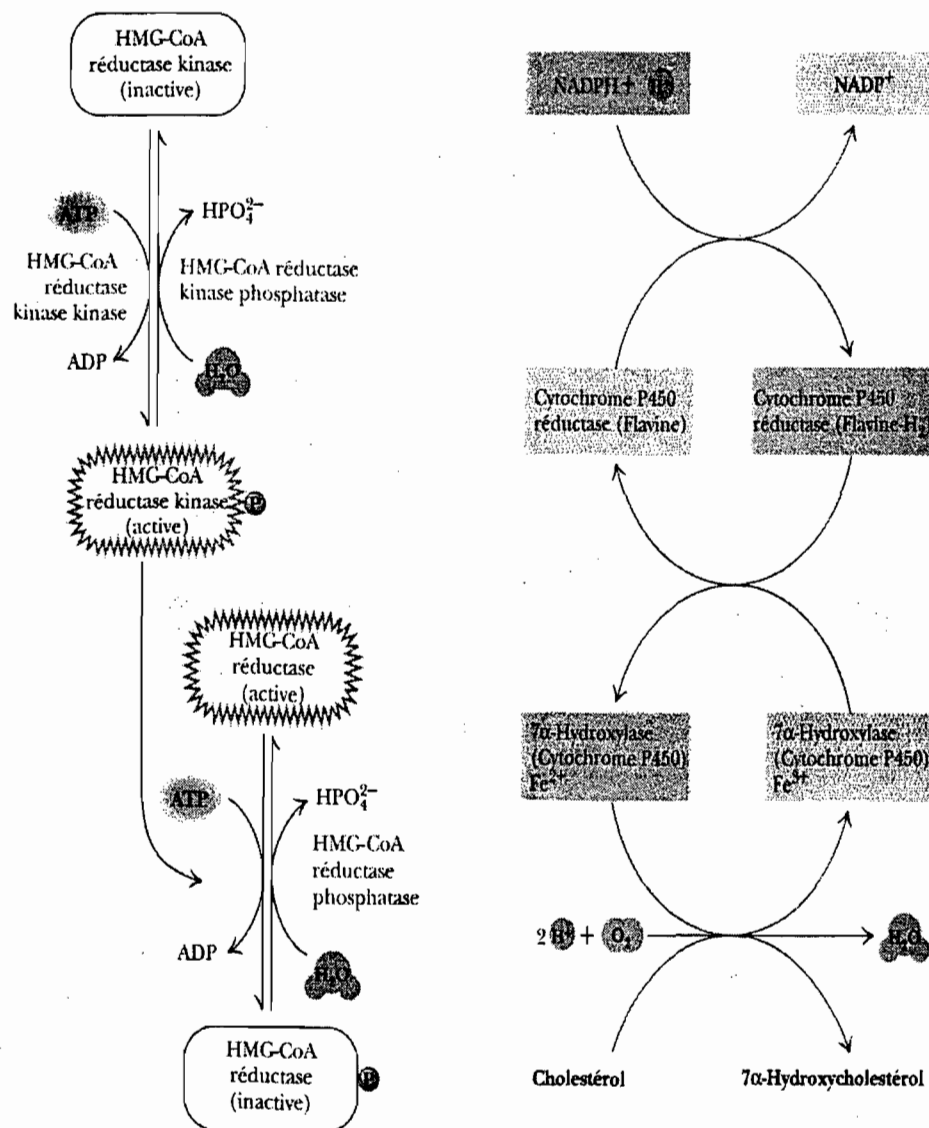
acide, il y a oxydation des chaînes latérales et production du 27-hydroxycholestérol, catalysée par une enzyme mitochondriale de la famille du cytochrome P-450, la stérol 27-hydroxylase (cyp27) (Cali et Russel 1991, Hofmann 1994). Le 27-hydroxycholestérol est par la suite hydroxylé par l'enzyme oxystérol 7 alpha-hydroxylase (cyp7b), et éventuellement transformé en AB (Schwarz *et al.* 1997, Schwarz *et al.* 1998). Il a été démontré que la production de 27-hydroxycholestérol aurait également un pouvoir d'inhibition sur la synthèse du cholestérol (Esterman *et al.* 1983, Martin *et al.* 1997). Les mécanismes impliqués dans la régulation de ces effets biologiques ne sont pas clairement élucidés mais plusieurs évidences indiquent que les oxystérols produits par la 27-hydroxylation interrompent la production de «short-chain sterol responsive element binding proteins» (SREBPs). Ces dernières seraient responsables de la régulation des gènes impliqués dans la synthèse des AB (Sheng *et al.* 1995). Cependant, d'autres recherches sont nécessaires afin de déterminer la contribution réelle de ces deux voies métaboliques d'hydroxylation des AB.

3.2.3 Transport du cholestérol par les lipoprotéines

Les phospholipides, les triglycérides, le cholestérol et les esters de cholestérol qui circulent dans l'organisme sont liés par des liaisons non covalentes dans des complexes lipoprotéiques. Les lipoprotéines plasmatiques sont généralement des particules sphériques, composées d'une couche superficielle de phospholipides dont les acides gras sont orientés vers le centre. Ancrées dans cette couche superficielle se trouvent des molécules de cholestérol libre et de protéines, nommées apolipoprotéines. Des molécules d'esters de cholestérol et de triglycérides forment le noyau des particules lipoprotéiques. On peut classer les lipoprotéines en fonction de leur mobilité à l'électrophorèse et de leur teneur relative en lipides et en protéines. Mais généralement, elles sont classées en fonction de leur densité. Les lipoprotéines d'origine hépatique empruntent un circuit qui permet d'assurer la liaison entre le foie et les tissus périphériques. Selon le modèle classique, le foie produit et sécrète des lipoprotéines de

très faible densité (VLDL), LDL et HDL. Les lipoprotéines nouvellement secrétées subissent alors l'action de nombreuses enzymes et acquièrent ou perdent des apoprotéines par échanges avec d'autres lipoprotéines. Les apoprotéines jouent un rôle crucial dans les activités de reconnaissance, de transfert ou catalytiques.

Figures 10 et 11. Mécanismes de régulation de la HMG-CoA réductase et de la cholestérol 7 α -hydroxylase.



(tiré de *Garrett et Grisham 2000*)

Le foie et l'intestin sont les principaux lieux de la formation des lipides circulants. Dans le foie, plus précisément dans l'hépatocyte, les VLDL et les HDL sont principalement assemblées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi tandis que la sécrétion a lieu au niveau de la membrane sinusoïdale (Glickman et Sabesin 1994, Hamilton 1994). Les HDL sont également sécrétées à partir de l'intestin mais de façon moins importante (Marsh 1976, Wu et Windmueller 1979).

Les VLDL ont comme fonction première de transporter les lipides provenant du foie vers les tissus périphériques. Sous l'action de la lipoprotéine lipase, les triglycérides sont hydrolysés et déposés dans les tissus périphériques. Ce processus convertit éventuellement les VLDL en LDL, qui déversent leur contenu en cholestérol dans les tissus avec l'aide des récepteurs apo B/E qui reconnaissent les lipoprotéines. Le foie est particulièrement riche en récepteurs apo B/E, ce qui lui permet de cataboliser efficacement les LDL (Dietschy et Spady 1986).

Les HDL qui sont sécrétées par le foie sont présentes dans le plasma sous forme d'HDL naissantes (forme immature), et vont se fixer à différentes surfaces tissulaires pour capter le cholestérol libre des cellules (Mahley *et al.* 1984, Miller *et al.* 1985). Ensuite, le cholestérol est estérifié par l'action de la lecithine cholestérol acyltransférase (LCAT) et transféré au noyau des HDL. Cette HDL mature et identifiée comme HDL2 peut alors être captée par le foie à l'aide de ses apoprotéines A et E qui sont reconnues par un récepteur hépatique spécifique des HDL (Steinberg 1996). D'ailleurs, le principal lieu de catabolisme des HDL est le foie (Hoeg *et al.* 1985). Le métabolisme des HDL est constitué à la fois d'un processus de synthèse et de dégradation. De façon simpliste, les HDL, avec la contribution des VLDL et LDL, forment donc un cycle qui permet de recueillir du cholestérol à partir des cellules, à l'estérifier et à faciliter son transfert jusqu'au foie qui le catabolise. Ces étapes constituent ce qu'on appelle le transport à rebours du cholestérol ou transport inverse du cholestérol (Glomset 1986). Également, l'augmentation du contenu en cholestérol hépatique provoquée par la capture des lipoprotéines par le foie, influence l'activité des trois enzymes clefs dans la régulation

du cholestérol hépatique; l'HMG-CoA réductase, l'ACAT et la cholestérol 7-alpha-hydroxylase.

3.3 Effets des phospholipides de la diète

C'est Gobley qui identifie la lécithine à partir du jaune d'oeuf vers la fin du XIX ième siècle. D'ailleurs, l'étiologie du mot lécithine vient du mot grec *lekitos*, signifiant jaune d'oeuf. Aujourd'hui, le mot lécithine désigne un ensemble de constituants phospholipidiques tels que PC, PE, phosphatidylsérine, triglycérides, acides gras etc. Le terme lécithine est particulièrement utilisé dans le domaine de l'industrie alimentaire. Les phospholipides sont extraits surtout de la fève de soya, mais également des céréales de colza et de tournesol, ainsi que du jaune de l'oeuf. L'intérêt pour la lécithine de soya date depuis longtemps mais a augmenté au cours des 60 dernières années, notamment pour ses propriétés émulsifiantes. Plus récemment, on étudie l'utilisation de lécithine ou phospholipides alimentaires, intégrés à des traitements diététiques, afin d'expérimenter ses effets thérapeutiques potentiels.

En effet, les résultats concernant le rôle préventif mais aussi curatif des phospholipides alimentaires se sont avérés très positifs. Au niveau de la nutrition préventive, les phospholipides alimentaires sont utilisés comme suppléments diététiques en regard à leur apport considérable en acides gras polyinsaturés, en plus d'être une bonne source énergétique. Les phospholipides alimentaires sont également employés à des fins thérapeutiques. Par exemple, plusieurs chercheurs se sont penchés sur le rôle potentiel d'un tel traitement diététique sur les fonctions cognitives (mémoire, raisonnement logique, démence sénile) par la stimulation de la synthèse de l'acétylcholine (Higgins et Flicker 2000, Zeisel 1995).

3.3.1 Effets sur les fonctions hépatiques

D'autre part, plusieurs recherches effectuées jusqu'à maintenant sont reliées au foie. La supplémentation de phospholipides dans la préparation liquide administrée aux

personnes alimentées à long terme avec la nutrition parentérale totale résorbe la stéatose hépatique (infiltration lipidique et dommages hépatocellulaires) qui avait été précédemment induite par une préparation sans supplémentation de phospholipides (Buchman *et al.* 1992). Plus précisément, la nutrition parentérale totale induit une baisse marquée de la choline plasmatique qui entraîne une augmentation des lipides hépatiques. Il a été proposé que cette augmentation soit causée par une diminution de la synthèse des PC qui mène à une incapacité du foie à sécréter les VLDL et une accumulation des triglycérides dans le cytoplasme de l'hépatocyte (Zeisel 1988, Zeisel 1995b) tandis que d'autres chercheurs suggèrent que la stéatose serait plutôt induite par la diminution de l'activité de l'ACAT (Gerbes *et al.* 1987, Buchman *et al.* 1992). L'ajout de phospholipides dans la préparation rétablie à un niveau normal la choline plasmatique et résorbe la stéatose hépatique. Par ailleurs, des études menées par l'équipe de Lieber (1990) ont démontré que la lécithine de soya polyinsaturée atténue la fibrose hépatique induite par l'éthanol chez les babouins. De plus, la PC, constituant de la lécithine de la diète à près de 96%, serait la composante responsable de cette protection notamment par une augmentation de la dégradation des fibres de collagène (Lieber *et al.* 1994). Ces résultats intéressants ont eu pour effet de pousser davantage la recherche, dans le but de vérifier si et comment la lécithine alimentaire peut influencer les différents changements hépatiques induits a priori par la prise d'alcool. D'abord, ces recherches ont révélé que la polyenylphosphatidylcholine (PPC), un extrait de la lécithine riche en PC polyinsaturés, diminue l'hépatomégalie et l'accumulation de lipides au foie, des signes précoces de toxicité dus à l'éthanol (Navder *et al.* 1997). Les auteurs suggèrent que l'action bénéfique de la PPC soit causée, du moins en partie, par l'inhibition des perturbations mitochondriales induites par l'éthanol, celles-ci étant la diminution de l'oxydation mitochondriale de la carnitine-1-palmitoyl et de la dépression de l'activité de la cytochrome oxidase (Navder *et al.* 1997). D'autre part, la PPC atténue l'apoptose de l'hépatocyte induite par l'éthanol (Mi *et al.* 2000). Le mécanisme proposé agirait possiblement par l'action antioxydante de PPC via une régulation négative sur l'induction par l'éthanol du cytochrome hépatique P-4502E1. L'action bénéfique de la lécithine s'étend même jusqu'à l'intestin, où elle prévient l'accumulation de collagène dans les tissus endommagés de rats souffrants de colites

par un mécanisme similaire à celui démontré par Lieber *et al.*, c'est-à-dire en augmentant la dégradation des fibres de collagène (Mourelle *et al.* 1996). Par ailleurs, des diètes enrichies en différents gras et combinées à une supplémentation en lécithine de 5% de l'apport total ont été administrées chez des rats (Lechowski *et al.* 1999). S'attardant à l'aspect morphologique, cette étude démontre que de telles diètes diminuent l'accumulation de lipides dans les hépatocytes lorsque comparées à des diètes sans supplémentation de lécithine.

Plusieurs diètes, notamment celles enrichies en différents types d'acides gras et/ou en cholestérol, ont été étudiées dans le but de déterminer leur influence sur la lipidémie du plasma et du foie. Dans le même ordre d'idée, les phospholipides alimentaires ont aussi intéressé plusieurs chercheurs qui ont entrepris l'étude des effets potentiels d'une telle diète sur les lipides plasmatiques. Cependant, l'ensemble des résultats qui ressort de ces recherches n'est pas très concluant, les conditions variant considérablement d'une étude à l'autre (espèce animale étudiée, différence dans la quantité de phospholipides administrés, composition de la diète, durée du traitement, etc). Certaines études démontrent que chez l'homme souffrant d'hypercholestérolémie, une diète enrichie en lécithine de soya s'avère bénéfique puisqu'elle cause une diminution du cholestérol plasmatique (Blaton *et al.* 1976, Simons 1978, Kesaniemi *et al.* 1986, Childs *et al.* 1981), tandis que les résultats concernant d'autres recherches n'indiquent pas d'effet significatif (ter Welle *et al.* 1974, Greten *et al.* 1980). Chez les personnes en santé, la même controverse semble persister (Childs *et al.* 1981, Cobb *et al.* 1980). Et, fait intéressant, Childs et collaborateurs (1981) rapportent que la lécithine alimentaire augmente le cholestérol des HDL plasmatiques.

L'effet des phospholipides sur la cholestérolémie a également été étudié sur d'autres espèces animales. Chez les rats avec une cholestérolémie élevée, on remarque une diminution de cholestérol dans le plasma (Samochowicz *et al.* 1976, Imaizumi *et al.* 1982, Jimenez *et al.* 1990), tandis que le cholestérol des HDL est augmenté (Jimenez *et al.* 1990, Iwata *et al.* 1993). L'augmentation du cholestérol des HDL plasmatiques est attribuée par certains auteurs à la hausse de l'activité de la lécithine cholestérol

acyltransférase, une enzyme impliquée dans l'estérification du cholestérol dans les HDL (Jimenez *et al.* 1990, Iwata *et al.* 1993). Par contre, chez les rats normolipidiques, il n'y a pas de consensus quant aux résultats obtenus (Clark et Small 1981, Polichetti *et al.* 1996). D'autres espèces animales ont aussi été investiguées dont le singe et le hamster. Récemment, la lécithine de soya, administrée à ces deux espèces animales, a réduit le cholestérol plasmatique sans réduire le cholestérol des HDL. Les propriétés antiathérogéniques attribuées à une diète enrichie en lécithine, telles qu'une diminution du cholestérol plasmatique, ne semblent pas être entièrement attribuables au contenu en acides gras linoléiques de la lécithine (Wilson *et al.* 1998).

Très peu d'études concernant l'effet des phospholipides alimentaires sur les lipides hépatiques, ainsi que les enzymes régulant le métabolisme du cholestérol ont été effectuées jusqu'à maintenant. O'Mullane et Hawthorne (1982) ont administré à des rats des diètes contenant 0.5% de cholestérol et enrichies de 6% de lécithine de soya purifiée à 98% pendant 6 semaines. Les résultats indiquent que l'activité de l'HMG-CoA réductase n'est pas modifiée par cette diète. D'autre part, l'étude menée par Imaizumi *et al.* (1983) a démontré qu'une diète enrichie de 2% en PE (purifiée à 82%) augmente l'activité de l'HMG-CoA réductase tandis que celle enrichie de 2% en PC (purifiée à 96%) induit une hausse de l'activité mais qui n'est pas statistiquement significative. Il faut préciser que le nombre d'études traitant de ce sujet n'est pas significatif, et d'autres études sont requises afin de déterminer l'effet des phospholipides de la diète sur le métabolisme hépatique du cholestérol, notamment leur effet sur les trois enzymes clefs de la régulation du cholestérol.

3.3.2 Effets sur la sécrétion des lipides biliaires

La sécrétion des lipides biliaires est dépendante de celle des AB, comme discuté au point 1.6 du présent chapitre. Cependant, le rôle des phospholipides biliaires devient de plus en plus prédominant dans le processus de la sécrétion des lipides de la bile, soit par sa capacité de solubilisation ou par sa protection potentielle face aux structures impliquées dans la sécrétion biliaire. Dans ce contexte, certains chercheurs se sont

penchés sur l'influence de telles diètes sur la sécrétion des lipides biliaires. L'équipe menée par Gilat s'est particulièrement intéressée au rôle des phospholipides sur la solubilisation du cholestérol biliaire chez les rats et les hamsters. En parallèle, ces chercheurs se sont intéressés à l'influence des phospholipides alimentaires sur les lipides biliaires, et de façon plus particulière, sur la stimulation potentielle de la sécrétion des phospholipides biliaires. Ils rapportent qu'une diète enrichie de 5% de lécithine (purifiée à 90%) peut induire une modification des lipides biliaires, notamment une augmentation des phospholipides dans la bile (Peled et Gilat 1994). Par ailleurs, des recherches entreprises chez le rat par l'équipe de Chanussot, en collaboration avec nos laboratoires, ont révélé que la lécithine de soya, purifiée (96%) et non purifiée (20%), augmente la sécrétion des AB, des phospholipides et du cholestérol dans la bile (Polichetti *et al.* 1996). Cette augmentation des lipides biliaires pourrait provenir de la stimulation de la capture de la phosphatidylcholine des HDL par le foie. Malgré ces quelques incursions dans le domaine, très peu d'études ont été menées afin de déterminer l'effet de ce type d'intervention nutritionnelle sur la formation et la sécrétion des lipides biliaires. Néanmoins, les résultats mentionnés ci-haut donnent des indications claires quant à l'influence des phospholipides de la diète sur la sécrétion de la bile et des lipides biliaires.

4. But de la présente étude

Selon l'ensemble des études traitant des différents effets des phospholipides alimentaires, il semble que ce traitement diététique soit bénéfique et ce, pour plusieurs espèces animales étudiées. D'une part, l'augmentation des phospholipides biliaires par un tel traitement diététique s'avère très encourageant étant donné ses propriétés émulsifiantes et son rôle dans la vésiculation et la solubilisation du cholestérol dans la lumière canaliculaire. D'autre part, la diminution du cholestérol plasmatique, de pair avec la stimulation de la sécrétion biliaire du cholestérol, semble influencer l'homéostasie du cholestérol et favoriser l'excrétion du cholestérol vers la bile.

Par ailleurs, des études préliminaires effectuées par nos laboratoires ont confirmé les résultats mentionnés ci-haut à l'effet qu'une diète enrichie en lécithine de soya stimule la sécrétion de la bile, de même que la sécrétion des lipides biliaries, notamment celle du cholestérol biliaire (Rioux *et al.* 1994). Le traitement diététique administré à des rats était de très courte durée (3 jours) avec un enrichissement de 50% de lécithine de soya. De même, des expériences ont été faites avec la même diète mais dans des conditions impliquant l'infusion de doses croissantes de l'acide cholique (Rioux *et al.* 1994). Cette étude a révélé que suite à une stimulation du pool d'AB et des autres lipides biliaries, la diète enrichie en lécithine peut influencer le taux de sécrétion maximum des AB et, par le fait même, retarder et atténuer la cholestase induite par l'infusion d'acides biliaries. Ces observations, ainsi que les résultats de d'autres études précédentes (Yousef *et al.* 1987, Barnwell *et al.* 1987), suggèrent que la lécithine alimentaire pourrait exercer son effet bénéfique par l'accroissement du pool de phospholipides hépatiques destiné à la sécrétion biliaire. De plus, l'inhibition partielle de la cholestase induite par les AB, ainsi que l'augmentation du taux de sécrétion maximum des lipides biliaries peuvent suggérer que le transport jusqu'à la membrane est accru, assurant un meilleur approvisionnement des molécules de PC à la membrane canaliculaire. Ainsi, cette dernière est davantage protégée contre l'effet détergent des AB.

La lécithine alimentaire utilisée dans ces diètes est composée de différents phospholipides, dont un des principaux est la PC. Au cours de son absorption intestinale, la PC est transformée en lysophosphatidylcholine, acides gras et choline. La choline participe alors à la nouvelle synthèse de PC par la voie de la CDP-choline. Ainsi, cette composante de la lécithine pourrait augmenter le contenu hépatique en PC qui serait ensuite dirigé vers la bile. Cette hypothèse s'appuie sur une étude qui montre que l'enrichissement de la choline dans la diète augmente la PC biliaire provenant de la synthèse hépatique *de novo* (Robins et Amrstrong 1976).

Dans ce contexte, la présente étude vise, en premier lieu, à étudier le rôle de la choline alimentaire en lien avec les effets bénéfiques de la lécithine sur la formation de la bile. Ces travaux sont effectués dans des conditions de base et à la suite d'une infusion

croissante d'acide taurocholique. Au delà de ces observations, il est intéressant de vérifier de quelle façon les phospholipides alimentaires influencent les mécanismes impliqués dans l'homéostasie du cholestérol hépatique. Il est donc proposé, en deuxième lieu, d'évaluer les effets des phospholipides de la diète sur les lipoprotéines plasmatiques et les enzymes clefs régulant le cholestérol hépatique. En dernier lieu, le potentiel hépatoprotecteur des phospholipides alimentaires est étudié dans le modèle de la cholestase induite par l'acide tauroolithocholique, un agent cholestatique qui altère le transport vésiculaire et la composition membranaire.

Pour cette recherche, nous avons opté pour la souche de rat mâle Sprague-Dawley afin d'assurer une continuité avec les travaux précédents. La composition de la lécithine de soya employée au cours de ces travaux est la même que lors des études préliminaires, pour les mêmes raisons que mentionnées ci-haut. Toutefois, l'apport de la lécithine dans la diète est moindre (20%) et la durée du traitement diététique se déroule sur une plus longue période, soit de deux semaines. Notons que ce traitement diététique permet d'assurer un apport en lipides équivalent à 32% de l'apport calorique total.

Ainsi, ce travail permet d'évaluer, par une supplémentation dans la diète, l'effet des phospholipides provenant de la fève de soya, particulièrement la PC et une de ses composantes, la choline, sur le métabolisme lipidique au niveau du plasma et du foie, ainsi que la sécrétion des lipides biliaires chez le rat. Dans le but de comprendre les mécanismes d'action responsables des changements lipidiques au niveau du foie, l'activité des enzymes responsables de la régulation de l'homéostasie du cholestérol hépatique ainsi que les lipoprotéines plasmatiques sont mesurées. Enfin, une protection hépatique potentielle d'un tel traitement diététique sur la cholestase intrahépatique induite par l'infusion de l'acide tauroolithocholique est étudié.

CHAPITRE 2. ARTICLE I

**The role of choline in the beneficial effects of lecithin on the secretion
of biliary lipids in rats**

Marie-Josée LeBlanc, Victor Gavino, Aline Péréa, Ibrahim M Yousef,
Emile Lévy, Beatriz Tuchweber

Biochimica Biophysica Acta 1393:223-234, 1998.

**THE ROLE OF DIETARY CHOLINE IN THE BENEFICIAL EFFECTS OF
LECITHIN ON THE SECRETION OF BILIARY LIPIDS IN RATS**

Marie-Josée LeBlanc¹ Victor Gavino¹, Aline Pérea¹, Ibrahim M, Yousef^{2,3}, Emile Lévy^{1,3}, and Beatriz Tuchweber^{1,3*}

¹Department of Nutrition, Université de Montréal, Que., Canada,

²Department of Pharmacology, Université de Montréal, Que., Canada

³Unité de recherche en Nutrition-Gastroentérologie, Hopital Ste-Justine, Que., Canada.

*Correspondence address:

Beatriz Tuchweber

Succursale Centre-Ville

Montreal, Québec

Canada, H3C 3J7

telephone number:

514 343 6393

fax number:

514 343 6103

Key words: bile secretion, biliary lipids, dietary phospholipid, dietary choline, plasma cholesterol

Summary

Earlier studies showed that dietary soybean lecithin increases biliary lipid secretion, which mainly comes from the contribution of high density lipoprotein (HDL) and hepatic microsomal pools of phosphatidylcholine and cholesterol. In addition, a lecithin diet enhances bile secretion and prevents bile acid-induced cholestasis. This study evaluated the contribution of choline, a component of lecithin, to the observed effect of lecithin on biliary secretory function. Rats were fed either a control diet (CD), a choline diet (ChD) or a lecithin-enriched diet (LD) for two weeks. Results showed that like LD, the ChD induced an increase in bile flow and bile acid secretion rate when compared with the control diet. However, unlike the LD, the ChD did not significantly increase biliary phospholipids and cholesterol output. An increase of hydrophilic bile acids (i.e. ursodeoxycholic and muricholic acids) in bile of rats fed with choline could explain why the biliary phospholipid and cholesterol secretion was not increased. During taurocholic acid infusion, both experimental diets increased bile flow and the bile acid secretion rate maximum (BASR_m). The cholestasis usually observed after the BASR_m is reached, was inhibited by the ChD and the LD. Both diets induced a decrease in plasma cholesterol (total and HDL), however, only the LD induced statistically significant changes. Analysis of total cholesterol and phospholipid content of microsomes and canalicular membranes indicated no statistically significant difference between control and experimental groups, either under basal conditions or after bile acid infusion. Similarly, the phospholipid classes and fatty acid composition of biliary phosphatidylcholine were not altered by feeding ChD and LD. We conclude that choline contributes to the beneficial effect of a lecithin diet on bile secretion. It is postulated that this effect may be attributed to modulation of HDL and an enhancement of the cholesterol and phospholipid pools destined for biliary secretion.

INTRODUCTION

The biliary secretion of lipids (bile acids, phospholipids and cholesterol) is critical for cholesterol homeostasis and dietary fat absorption in the small intestine. Under physiological conditions, bile acids regulate the secretion of phospholipid and cholesterol in bile [1,2]. The bile acid hydrophobicity is one of several factors that seems to be an important determinant of the biliary lipid secretion rate [3].

Biliary phospholipids consist of up to 90% phosphatidylcholine containing predominantly sn-1 palmitic acid and sn-2 linoleic acid phosphatidylcholine, suggesting the existence of a specific hepatic sub-pool of phosphatidylcholine destined for bile secretion [4,5]. This pool of phosphatidylcholine in microsomal membranes seems to be recruited for secretion in bile and modulated by the flux of bile acids in the liver [6-7]. Recent studies showed that in rats, biliary phosphatidylcholine may be derived not only from the preformed hepatic microsomal pool but also from an extrahepatic source, the circulating lipoproteins mainly high density lipoproteins (HDL) [8,9]. Newly synthesized phosphatidylcholine only contributes a small percentage to biliary phosphatidylcholine [10].

Feeding rats pure or semi-purified soybean lecithin was shown to lower plasma cholesterol [11-13] by a mechanism related to enhanced biliary lipid secretion and bile formation [14,15]. Recently, we showed that this increased lipid in bile is derived from hepatic microsomal pools and from phosphatidylcholine and cholesterol contained in HDL, giving further support for the important role of HDL in the modulation of lipid output in bile [9,15]. Soybean lecithin-enriched diet can also prevent intrahepatic cholestasis induced by cholic acid infusion [14]. When bile acids are infused by I.V. in rats in increasing amounts, a maximum hepatic transport capacity called the bile acid secretory rate maximum (BASR_m) is reached, after which bile formation and lipid output are markedly impaired (cholestasis). Earlier studies indicated that dietary lecithin could exert its beneficial effect by expanding the hepatic phosphatidylcholine pool destined for bile [7,16,17].

Dietary lecithin is extensively metabolized into lysolecithin, fatty acids and choline, which raises the question of the contribution of choline to the enhanced biliary lipid output and bile formation induced by lecithin. Data show that 60 to 85% of the

phosphatidylcholine in the liver is synthesized via the cytidine diphosphate-choline (CDP-choline) pathway with the remainder coming from methylation of phosphatidylethanolamine [18].

The present study examined the role of dietary choline in the beneficial effects of lecithin in bile formation. Comparative effects of diets enriched in lecithin and free choline were studied in rats under basal conditions and with taurocholate-induced cholestasis.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, St. Constant, Quebec, Canada) weighing 170-200 g were randomly separated into three groups: a control group fed a 16% polyunsaturated triacylglycerol-enriched diet containing sunflower-seed oil, referred to as the control diet (CD); a group fed a 16% polyunsaturated triacylglycerol-enriched diet containing in addition 4% free choline (ChD); or a group fed a 20% semi-purified soybean lecithin diet (LD). This study did not include a group fed basal diets (10% fat, choline included), since we showed in earlier work [14] that bile flow and biliary lipid secretion were similar in groups fed basal and control diets. Diet composition is given in table 1. A detailed composition including phospholipid and fatty acid composition was published elsewhere [14]. The diets were stored at 4°C and fresh supplies were given to the rats daily for two weeks. Tap water was given ad libitum. All rats were housed in a standard environment, in which temperature was maintained at a constant 22°C with a 12 h light/dark cycle.

Experimental procedures

Two experimental series were carried out after feeding the various diets during 14 days. In the first series (basal conditions), on the 15th day, the bile duct was cannulated with a PE 10 catheter while rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (48 mg/kg bw). Bile was collected on ice in pre-weighed tubes for 60 minutes in 30 minutes aliquots. Body temperature was maintained at 37°C, using a rectal probe coupled to a thermostatically controlled heat lamp. Biliary lipids were extracted immediately after

bile collection, and extracts kept at -80°C until analyzed. Bile flow was determined gravimetrically, assuming a density of 1g/ml . After the last bile collection, blood was obtained from the abdominal aorta with a heparinized syringe and the liver was perfused with physiological saline solution (0.9% NaCl) via the portal vein.

A portion of liver was taken for lipid analysis and the remaining was used to obtain microsomes and cell membrane fractions enriched in bile canalicular complexes. Liver cell membrane fractions enriched in canalicular complexes were prepared by discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation according to procedures developed by our laboratory [16]. Microsomes were obtained according to a previously described method [16]. The relative purity of the membrane preparations was assessed by measuring the activities of glucose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9) as a microsomal marker, and leucine aminopeptidase (EC 3.4.11.1) as a canalicular marker [16]. The relative specific activities (membrane/homogenate activity) of membrane marker enzymes, and the membrane protein recovery were similar in all groups. Before sacrifice, livers of 3 rats per group were processed for electron microscopy examination, as previously described [19]. Pieces were dehydrated in a graded ethanol series and embedded in Araldite. Semithin sections were cut and stained with toluidine blue for light microscopy examination and ultrathin sections were cut and stained with uranyl acetate and lead citrate.

In the second experimental series, bile acid transport and secretion during taurocholic acid infusion were studied after 2 weeks of dietary intervention. The model consisted of the following procedures: on the fifteenth day, rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (48 mg/kg bw) and a PE 50 catheter was inserted into the right internal jugular vein. The common bile duct was also cannulated and the bile collected for 60 minutes in 30 minutes aliquots to substantially deplete the endogenous bile acid pool. It was followed by the infusion of 2 ml of 3.5% albumin in 0.45% NaCl solution over a 30 minute period into the vein, and bile samples were collected every 15 minutes to assess basal bile formation. Taurocholic acid was dissolved in albumin-saline solution and infused in stepwise increasing doses, that is $1, 2$ and $3\ \mu\text{mol/min}$ per 100 g body weight. Taurocholic acid C^{14} (Dupont; $50\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) was used as tracer. Each dose was infused

for 30 minutes and bile samples were collected every 10 minutes. Control groups consisted of animals infused with the albumin-saline solution alone.

Assay techniques

The total cholesterol, HDL-cholesterol fraction and triacylglycerol levels in plasma were measured as previously described [20] with kits supplied by Boehringer-Mannheim. The phospholipid phosphorous was assayed by phosphorous analysis with the Bartlett method [21]. The choline in plasma was measured by an enzymatic method using phospholipase B, with a kit supplied by Wako, Richmond, VA, USA.

Total lipids in liver were measured gravimetrically, after extraction according to the technique of Folch et al [22]. Total and free cholesterol determinations in liver homogenates as well as phospholipid and triacylglycerol analysis were carried out after extraction by the Bligh and Dyer technique, as above [23]. The cholesteryl ester was calculated as the difference between total cholesterol and free cholesterol. Total biliary bile acids were assessed by using the enzyme 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (Sigma, St-Louis, MO, U.S.A) [24] and by the measure of total radioactivity (liquid scintillation counting) derived from taurocholic acid C¹⁴. The profile of bile acid was evaluated by gas liquid chromatography as before [25]. Biliary cholesterol levels were measured with a kit supplied by Boehringer-Mannheim while phospholipids were determined as above.

The phospholipid species in bile were separated by thin-layer chromatography [26] and phospholipids determination was performed by phosphorous analysis with the Bartlett method [21]. The percent distribution of fatty acids in phosphatidylcholine was evaluated by gas-liquid chromatography after direct transesterification [27].

Bile canalicular membrane fractions and microsomes were analyzed for protein according to the method of Lowry et al [28]. The total phospholipid and cholesterol content in membranes was determined as for bile in the lipid extracted by the method of Bligh and Dyer [22]. Fluidity of membranes was assessed by the technique of fluorescence polarization, with a Shimadzu spectrofluorometer equipped with a polarization attachment, according to techniques previously described [29,30]. 1,6-

diphenyl-1,3,5-hexatriene was used as the fluorescent probe. Measurements were performed at 37°C.

Statistical methods

Statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA), and F values lower than 0.05 considered to be significant. Comparisons between groups were done with Duncan's test, where a p value lower than 0.05 was found to be significant.

RESULTS

Food intake, body and liver weights

The consumption of food (average: 15 g/day) and the number of calories ingested (average: 107/day) were comparable in rats of all groups (results not shown). The average of body weights was 242 ± 11 g and the livers weighed on average 3.70 ± 0.08 g/100 g body weight. No significant difference between the various groups was observed (results not shown).

First experimental series

Plasma lipid levels

Figure 1 shows the pattern of change in plasma lipids at 1, 7 and 14 days of dietary intervention. The total cholesterol and HDL-cholesterol levels were decreased in rats fed the ChD and LD on day 7 and 14. However, when compared to the control diet, the difference was statistically significant only for LD. The cholesterol/HDL-cholesterol ratio was not significantly affected by the different diets. When compared to the control group, the lecithin diet increased plasma triglycerides on day 7, while two weeks later, no significant difference was observed between the three groups.

Plasma choline concentration

As expected, feeding choline and lecithin-enriched diets led to an increase in the total plasma choline level (2.00 ± 0.04 and 1.70 ± 0.06 μM respectively), compared to the control diet (1.40 ± 0.05 μM).

Hepatic lipid content

As shown in Table 2, the total lipid concentration, as well as triacylglycerols and cholesteryl esters contents were significantly lower in rats fed the LD compared to control and ChD groups. The free cholesterol content increased in LD rats but changes were not statistically significant. The cholesteryl ester and phospholipid contents were, however, significantly increased by ChD.

Bile flow and biliary lipid secretion

Table 3 shows the spontaneous bile flow and biliary lipid secretion, after one hour of bile collection. The LD significantly increased bile flow by 25%, biliary bile acids and phospholipids by 61% and 90%, respectively, when compared to the control diet. The cholesterol secretion rate was also significantly increased (180% and 238%) compared to the control diet and ChD respectively. Bile flow as well as bile acid secretion rates were also significantly higher in the ChD group than in the control group. However, choline feeding resulted only in a tendency for higher phospholipids secretion, and the cholesterol output was unchanged. The cholesterol/bile acid ratio was lower in the ChD when compared to other diets (cholesterol/bile acid: 0.05 ± 0.02 compared to 0.09 ± 0.03 and 0.10 ± 0.02 for control diet and LD respectively), while the phospholipids/bile acid ratio was unchanged between three groups.

The bile acid profile in the bile of rats from three groups is shown in Table 4. Cholic acid was the main bile acid in all groups. However, compared with control and LD diets, a significant increase in the % contribution of ursodeoxycholic and muricholic acids, (particularly β muricholic acid), was observed in the ChD group. This increase was associated with a significant decrease in % contribution of cholic acid. The lecithin diet induced a significant increase in the % contribution of deoxycholic acid, which could partly explain the enhanced biliary phospholipid and cholesterol output observed with this diet.

Light and electron microscopy

By light microscopy, liver sections of rats fed control and choline enriched diets showed a moderated lipid droplet accumulation mainly in the periportal zone. No other abnormality was seen. By contrast, the livers of animals fed the LD showed few lipid droplets (Figure 2). Electron microscopy corroborated the decrease in lipid droplet accumulation by LD feeding. The bile canalicular area including Golgi complex as well as hepatocytic ultrastructure appeared normal in all groups (not illustrated)

Second experimental series

Bile formation and biliary lipid secretion during bile acid infusion

Figure 3 shows the effects of feeding choline and lecithin enriched diets on bile output and hepatic transport of bile acids during taurocholic acid infusion. As anticipated, when taurocholic acid was infused, the bile flow began to decrease; by the end of infusion, it was significantly lower than during the basal period (cholestasis) in the control group. Both lecithin and choline supplementation increased the secretion of bile and biliary bile acids (Fig. 3). The BASRm (the average of the 3 highest consecutive values) for the LD and ChD groups, respectively 322 ± 79 and 343 ± 82 nmol/min/g liver, were significantly elevated when compared to the CD group (204 ± 35 nmol/min/g liver).

Figure 4 illustrates that following bile acid infusion, biliary cholesterol secretion increased, and subsequently decreased in all three groups. The lecithin diet induced a higher cholesterol secretion ($p < 0.001$) compared to controls. Unlike the bile flow, as well as bile acid and phospholipid secretion rates, the biliary cholesterol in rats fed the choline diet was not statistically different from those fed the control diet.

Biliary phospholipids, phospholipid classes and total fatty acid composition

The biliary output of phospholipids, biliary phospholipid classes and total fatty acid composition are shown in Figure 4 and Table 5. The phospholipids secretion rate increased with the bile acid infusion to reach a maximum before the BASRm.

Thereafter, phospholipid output decreased, but at all times, the phospholipid secretion in ChD and LD groups was significantly higher than in the CD. In the control group, whether under basal conditions or after taurocholic acid infusion, the major biliary phospholipid was phosphatidylcholine and the principal fatty acids were palmitic acid (16:0) and linoleic acid (18:2). The phospholipids or fatty acid distribution in the experimental groups did not differ markedly from control with the exception of the contribution of 18:1 which was significantly lower in the LD during the basal period. It should be noted that control groups (i.e., given the vehicle of taurocholic acid) were included in the series receiving taurocholic acid infusions. The data for biliary lipid content and composition were similar to those obtained during the basal period (prior to taurocholate infusion), and therefore only results from the basal period are shown.

Membrane lipid composition and fluorescence polarization

Table 6 shows that, during the basal period, the phospholipid and cholesterol content, as well as the cholesterol-to-phospholipid ratio and the fluorescence polarization of canalicular and microsomal membrane fractions were not significantly different between rats fed the CD, ChD, and LD. However, in the bile acid infused rats, the membrane phospholipid content, particularly in the bile canalicular membranes, decreased (and the cholesterol/phospholipid ration consequently increased), but differences did not reach statistical significance. The lipid content and fluorescence polarization of membranes from rats fed diets enriched in lecithin or choline did not differ from control rats.

DISCUSSION

The present study clearly demonstrated that feeding a choline-enriched diet enhanced spontaneous bile secretion and the maximum transport of bile acids, and thus reduced the cholestatic effects of high bile acid concentrations. Thus, the beneficial effects of diets enriched in lecithin may be attributed to choline, one of the components of lecithin. Choline also led to reduced levels of total cholesterol and HDL-cholesterol in plasma, but differences from controls did not prove to be statistically significant. Since our semi-purified lecithin preparation contained about the same amount of

phosphatidylcholine and of phosphatidylethanolamine, part of the plasma lowering effect of lecithin may be attributed to this phospholipid [13, 32]. Other microcomponents of the lecithin preparation, such as plant sterols, may have additional effects on plasma cholesterol [33].

Earlier work from this laboratory has provided evidence that a hepatic phospholipid pool destined for bile may modulate the bile flow and the bile acid output in bile [16]. Moreover, the enhancement of bile formation by diets enriched in phospholipids was explained by the greater availability of exogenous biliary phospholipids [14]. Biliary phospholipids are mainly composed of phosphatidylcholine (about 90%) of a specific molecular species. Studies of the origin of biliary phosphatidylcholine have provided evidence that it may be derived from preformed pools in microsomes and from a small newly synthesized pool of phospholipids in hepatocytes [7,10]. Another major source of biliary phospholipids may be the circulating lipoproteins. In rats, we showed that HDL contributes about 38% of the total biliary phosphatidylcholine [9]. More recent work indicated that dietary lecithin may stimulate uptake of HDL-phosphatidylcholine by the liver as well as the release of phosphatidylcholine from neosynthesized and preformed pools in microsomes, these mechanisms contributing to the higher phosphatidylcholine output in bile [15]. There are few studies on the contribution of dietary choline to biliary lipid secretion and it is difficult to compare the present findings to previous work [31,34], as experimental conditions differ considerably. However, it seems that the magnitude of biliary phospholipid secreted is dependent on biliary phospholipid synthesis, which is regulated by dietary choline content, and of biliary bile acid composition [34]. In the present work, choline feeding resulted in higher hepatic phosphatidylcholine content. However, it may be that its contribution to the phosphatidylcholine biliary pool is not increased to the same extent that it is with lecithin. Alternatively, the mobilization of the pool and the proteins involved in phosphatidylcholine transport and secretion in bile may be modulated to different extents by the diets. Recent studies have suggested the involvement of proteins in the process of bile acid-induced biliary lipid secretion [35, 36]. There is clear evidence that a P-glycoprotein encoded by the *mdr2* gene may be implicated in phospholipid transport across the canalicular membrane [37,38]. Therefore, it may be suggested that a lecithin

enriched diet could enhance expression of the *mdr2* gene, inducing greater mobilization of hepatic lipids destined for bile. Interestingly, in choline fed rats, the secretion of hydrophilic bile acids was increased. Thus, the lower biliary lipid secretory rate, compared to the LD group, seen under basal conditions, may be attributed to the less detergent properties of secreted bile acid on membranes [2, 41].

Following infusion of increasing amounts of bile acids, both choline and lecithin rich diets resulted in similar enhancements of bile flow and of bile acid transport. Also, the total biliary phospholipid output at the BASRm period was higher in the choline and lecithin groups than in controls. By the end of bile acid infusion, the total phospholipid secreted was 1138 ± 140 nmol and 945 ± 242 nmol in LD and ChD, respectively, compared to 624 ± 140 nmol in the control group, indicating greater availability of phosphatidylcholine for biliary secretion.

The analysis of hepatic lipids provides some information on the distribution of various lipids in total liver, microsomes, and canalicular plasma membranes in relation to the lipid secretion in bile. Both choline and lecithin fed rats showed higher total hepatic uptake and new synthesis of phosphatidylcholine via the CDP choline pathway. Only lecithin significantly lowered the hepatic triacylglycerols content, and decreased lipid droplet accumulation in hepatocytes, indicating that fat accumulation cannot be solely attributed to choline deficiency. The beneficial effect of lecithin may be attributed to greater mobilization of hepatic lipids destined for bile. Neither dietary intervention significantly affected either the phospholipid or cholesterol content of microsomes and canalicular membranes, or membrane microviscosity. This is explained by the observation of the rather low contribution of exogenous phosphatidylcholine to plasma membranes and microsomes in the liver. Previous work has demonstrated that under basal conditions, plasma membrane phosphatidylcholine contributes less than 10% to phospholipid secretion in bile [39]. This phospholipid, which is thought to be derived from the solubilization of specific membrane domains [40], is very rapidly replaced by phospholipids from a specific biliary pool. As observed under basal conditions, the lipid microsomal and plasma membrane composition did not change significantly during infusion of taurocholate in both lecithin and choline groups, when compared to controls. Also, the biliary phospholipid and fatty acid composition of phosphatidylcholine were

unaltered by the dietary interventions. In conclusion, diets enriched in lecithin or choline exert a beneficial effect against bile acid-induced cholestasis. It is suggested that this beneficial effect may be mainly mediated by an increased availability of preformed biliary phospholipid, and its greater mobilization through enhanced expression of translocator proteins involved in bile acid-induced biliary lipid secretion. A very recent report [42] indicates that the genetic background in inherited types of cholestasis (e.g., Byler's disease) may be a defect in genes playing a direct or indirect role in canalicular transport. This raises the possibility of overcoming such a defect by modulation of hepatic phosphatidylcholine mobilization by lecithin.

ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were supported by grants from the Medical Research Council of Canada. The authors thank Mr. Maurice Audet for technical assistance.

REFERENCES

- [1] Alvaro, D., Angelico, M., Cantafora, A., Di Biase, A., Gaeta, G.B., Ginanni Corradini, S., Tripodi, M.F., Attili, A.F. and Utili, R. (1986) *Biochim. Biophys. Acta.* 878, 216-224.
- [2] Alvaro, D., Angelico, M., Cantafora, A., Di Biase, A., De Santis, A., Bracci, F., Minervini, G., Ginanni Corradini, S., Attili, A.F. and Capocaccia, L. (1986) *Biochem. Med. Metab. Biol.* 36, 125-135.
- [3] Vlahcevic, E., Gurley, O., Heuman, D.M. and Hylemon, P.B. (1990) *J. Lipid Res.* 31, 1063-1071.
- [4] Yousef, I.M., Fisher, M.M., Piekarski, J. and Holub, B.J. (1977) *Lipids.* 12, 140-144.
- [5] Gregory, D.H., Vlahcevic, Z.R., Schartzki, P. and Swell, L. (1975) *J. Clin. Invest.* 55, 105-114.
- [6] Lowe, P.J., Barnwell, S.G. and Coleman, R. (1984) *Biochem. J.* 222, 631-637.
- [7] Coleman, R. and Rahman, K. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1125, 113-133.
- [8] Kawamoto, T., Mao, S.J. and Russo, N.F. (1987) *Gastroenterology* 92, 1236-1242.
- [9] Portal, I., Clerc, T., Sbarra, V., Portugal, H., Pauli, A.M. and Lafont, H., Tuchweber, B., Yousef, I.M. and Chanussot, F. (1993) *Am J. Physiol.* 264, G1052-1056.
- [10] Chanussot, F., Lafont, H., Hauton, J., Tuchweber, B. and Yousef, I.M. (1990) *Biochem J.* 270, 691-695.
- [11] Childs, M.T., Bowlin, J.A., Ogilvie, J.T., Hazzard, W.R. and Albers, J.J. (1981) *Atherosclerosis.* 38, 217-228.
- [12] Iwata, T., Kimura, Y., Tsutsumi, k., Furukawa, Y. and Kimura, S. (1993) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39, 63-71.
- [13] Jimenez, M.A., Scarino, M.L., Vignolini, F. and Mengheri, E. (1990) *J. Nutr.* 120, 659-667.
- [14] Rioux, F., Perea, A., Yousef, I.M., Levy, E., Malli, L., Carrillo, M. and Tuchweber, B. (1994) *Biochim. Biophys. Acta.* 1214, 193-202.

- [15] Polichetti, E., Diaconescu, N., Malli, L., Portugal, H., Pauli, A.M., Tuchweber, B., Yousef, I.M. and Chanussot, F. (1996) *Brit. J. Nutr.* 75, 471-481.
- [16] Yousef, I.M., Barnwell, S.G., Gratton, F. and Tuchweber, B. (1987) *Am. J. Physiol.* 252, 84-691.
- [17] Barnwell, S.G., Tuchweber, B. and Yousef, I.M. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* 992, 221-233.
- [18] Canty, D.J. and Zeisel, S.H. (1994) *Nutr Rev.* 52, 27-339.
- [19] McDowell, E.M. and Trump, B.F. (1976) *Arch. Pathol. Lab. Med.* 100, 521-532.
- [20] Levy, E., Thibault, L., Roy, C.C., Bendayan, M., Lepage, G. and Letarte, J. (1988) *J. Lipid Res.* 29, 215-226.
- [21] Bartlett, G.R. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 466-468.
- [22] Folch, J., Less, M. and Sloane-Stanley, G.H. (1957) *J. Biol. Chem.* 2, 497-509.
- [23] Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) *J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- [24] Talalay, P. (1960) *Methods Biochem. Anal.* 8, 119-143.
- [25] Yousef, I.M., Fisher, M.M. and Myher, J.J. (1976) *Anal. Biochem.* 75, 538-544.
- [26] Arvidson, G.A.E. (1968) *Europ. J. Biochem.* 4, 478-486.
- [27] Gavino, V.C., Miller, J.S., Ikharebha, S.O., Milo, G.E. and Cornwell, D.G. (1981) *J. Lip. Res.* 22, 763-769.
- [28] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biochem.* 193, 265-275.
- [29] Cheng, S. and Levy, D. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 424-429.
- [30] Kim, C., Leo, M.A., Lowe, N. and Lieber, C.S. (1988) *Hepatology* 8, 735-741.
- [31] Peled, Y. and Gilat, T. (1994) *Hepatology* 19, 708-713.
- [32] Alvaro, D., Cantafora, A. Gandin, C., Masella, R., Santini, M.T. and Angelico, M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta.* 1006, 116-120.

- [33] Nervi, F., Marinovic, I., Rigotti, A. and Ulloa, N. (1988) *J. Clin. Invest.* 82, 1818-1825.
- [34] Robins, S.J. and Armstrong, M.J. (1976) *Gastroenterology* 70, 397-402.
- [35] Verkade, H.J., Vonk, R.J., and Kuipers, F. (1995) *Hepatology* 21, 1174-1189.
- [36] Verkade, H.J., Kuipers, F., Domingo, N., Leonardi, J., Vonk, R.J., and Lafont, H. (1997) *Hepatology* 25, 38-47.
- [37] Ruetz, S. and Gros, P. (1994) *Cell* 77, 1071-1081.
- [38] Ruetz, S. and Gros, P. (1995) *J Biol Chem* 270, 25388-25395.
- [39] Bilhartz, L.E. and Dietschy, J.M. (1988) *Gastroenterology* 95, 771-779.
- [40] Yousef, I.M., Bloxham, D.L., Phillips, M.J. and Fisher, M.M. (1975) *Can. J. Biochem.* 53, 989-997.
- [41] Small, D.S. (1970) *Adv. Internal Med.* 16, 243-264.
- [42] Bull, L.N., van Eijk, M.J.T., Pawlikowska, L., DeYoung, J.A., Juijn, J.A., Liao, M., Klomp, L.W.J., Lomri, N., Berger, R., Scharschmidt, B.F., Knisely, A.S., Houwen, R.H.J., and Freimer, N.B. (1998) *Nature Genetics* 18, 219-224.

Figure legends

Figure 1.

Plasma concentrations of Tg, cholesterol, HDL-cholesterol and cholesterol/HDL-cholesterol ratio in rats fed control diet (CD), choline-enriched (ChD) and lecithin-enriched diet (LD). Differences were analyzed by ANOVA test and are significant at $P < 0.05$

* : different of CD at the same day.

Figure 2.

Light microscopy of liver sections in rats fed control diet (top), choline-enriched diet (middle), and lecithin-enriched diet (bottom). Note that in the LD group, there is a decrease of lipid droplets (LD).

X 400.

Figure 3.

Effect of feeding a control diet, choline-enriched (ChD) and lecithin-enriched (LD) diet on bile flow and bile acid secretion during taurocholic acid infusion. Results are expressed as means \pm SD of 12 animals per group. Differences were analyzed by ANOVA test and are significant at $P < 0.05$

* : different of control diet

Figure 4

Effect of feeding a control diet, choline-enriched (ChD) and lecithin-enriched (LD) diet on biliary phospholipid and cholesterol secretion rates during taurocholic acid infusion. Results are expressed as means \pm SD of 12 animals per group. Differences were analyzed by ANOVA test and are significant at $P < 0.05$

* : different of control diet

Table 1
Composition of diet.

Ingredients	Control diet	Choline-enriched diet	Lecithin-enriched diet
	g/Kg food		
Casein	197	197	197
Methionine	3	3	3
Sucrose	185	172	172
Dextrose	186	172	172
Dextrine	185	172	172
Vitamin mixture	10	10	10
Mineral mixture	40	40	40
Agar	34	34	34
Triacylglycerols ^a	160	160	
Lecithin granules ^b			200
Choline ^c		40	

^a : Triacylglycerols: Becel™ margarine made from 87% sunflower oil and 13% vegetable oils.

^b : Lecithin granules, Sigma (St-Louis, MO) from soybeans contained 22% total phospholipids, whose 11% was phosphatidylcholine, and 78% triacylglycerols.

^c : Choline bitartrate, ICN Biomedicals Inc.

Details of the diet, as phospholipid and fatty acid composition of control and lecithin diets, have been published before [14].

Table 2
Hepatic lipid concentration in rats fed control diet (CD), choline (ChD) and lecithin-enriched diets (LD).

Parameters	CD	ChD	LD
Total lipids $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein	252 \pm 3	254 \pm 2	177 \pm 2 ^{ab}
Triacylglycerols nmol/mg protein	32.0 \pm 1.0	29.5 \pm 0.3	19.3 \pm 0.6 ^{ab}
Free cholesterol nmol/mg protein	18.0 \pm 2.0	18.0 \pm 0.4	23.0 \pm 2.0
Cholesteryl esters nmol/mg protein	8.0 \pm 0.4	11.0 \pm 0.7 ^a	5.0 \pm 0.6 ^{ab}
Phospholipids nmol/mg protein	138 \pm 8	200 \pm 8 ^{ac}	165 \pm 6

Values are means \pm SEM of 4 rats per group.

^a $p > 0.05$ compared to CD.

^b $p > 0.05$ compared to ChD.

^c $p > 0.05$ compared to LD.

Table 3
 Bile flow and biliary lipid secretion rate during 1 hour collection in rats fed control diet
 Choline diet, and lecithin-enriched diet

Parameters	Control diet	Choline diet	Lecithin diet
Bile flow μl/min/g/liver	1.2 ± 0.2	1.5 ± 0.3 ^a	1.4 ± 0.1 ^a
Bile acid Nmol/min/g/liver	12.3 ± 1.9	19.0 ± 9.0	19.6 ± 3.4 ^a
Phospholipids Mmol/min/g liver	4.1 ± 0.9	5.3 ± 1.4	7.6 ± 2.4 ^b
Cholesterol Mmol/min/g liver	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.1	1.9 ± 0.3 ^b

Values are means ± SEM of 11-15 rats per group

^A: $p < 0.05$ compared to control group

^B: $p < 0.05$ compared to control and choline groups

Table 4

Percent of bile acid composition of bile in rats fed control diet (CD), choline-enriched diet (ChD) or lecithin-enriched diet (LD).

Bile acid	CD	ChD	LD
Lithocholic acid	8.5 ± 1.1	1.1 ± 0.3	4.4 ± 2.2
Deoxycholic acid	5.0 ± 2.4	7.1 ± 1.0	14.0 ± 3.0 ^{ab}
Chenodeoxycholic acid	11.4 ± 3.0	11.2 ± 2.7	10.3 ± 1.7
Cholic acid	64.6 ± 6.2	41.7 ± 1.7 ^a	55.2 ± 7.6
Ursodeoxycholic acid	ND	11.5 ± 0.8 ^{ac}	1.4 ± 1.4
α Muricholic acid	8.3 ± 2.1	12.2 ± 1.3 ^c	6.5 ± 2.3
β Muricholic acid	2.2 ± 0.9	9.6 ± 1.4 ^{ac}	0.6 ± 0.5
Others	ND	5.7 ± 3.0	7.7 ± 6.0

Values are means ± SEM of 3-4 rats per group.

Others refer to bile acid that could not be identified by their retention time.

ND = not detectable.

^a*p* > 0.05 compared to Control diet.

^b*p* > 0.05 compared to ChD.

^c*p* > 0.05 compared to LD.

Table 5
Biliary phospholipid (PL) classes and total fatty acids (FA) composition of phosphatidylcholine (PC) during basal period and after taurocholic acid infusion.

PL classes (%)	Basal period			After TCA infusion		
	CD	LD	ChD	CD	LD	ChD
PC	81.0 ± 8.0	80.0 ± 14.0	83.5 ± 8.8	79.0 ± 10.0	78.0 ± 6.0	76.0 ± 15.0
LysoPC	9.5 ± 4.9	6.0 ± 2.0	8.0 ± 4.0	10.0 ± 8.0	10.0 ± 3.0	7.0 ± 4.0
PE	3.0 ± 3.0	7.0 ± 5.0	3.0 ± 3.0	4.0 ± 2.0	5.0 ± 3.0	7.0 ± 10.0
SPH	4.0 ± 3.0	7.0 ± 9.0	3.0 ± 3.0	6.0 ± 4.0	4.0 ± 2.0	7.0 ± 5.0
Others	2.0 ± 3.0	0.6 ± 0.4	1.5 ± .1	2.0 ± 2.0	2.0 ± 2.0	2.5 ± 2.9
FA composition						
16:0	56.0 ± 9.0	47.0 ± 7.0	52.0 ± 5.0	48.0 ± 5.0	47.0 ± 5.0	48.0 ± 5.0
18:0	12.0 ± 2.0	10.0 ± 2.0	12.0 ± 1.0	13.0 ± 4.0	14.0 ± 1.0	10.0 ± 3.0
18:1	5.0 ± 1.6	1.4 ± 0.2 ^a	3.0 ± 2.0	2.0 ± 0.3	1.0 ± 0.7	3.5 ± 2.0
18:2	19.0 ± 6.0	29.5 ± 5.0	18.5 ± 3.0	23.5 ± 5.0	24.0 ± 3.0	18.0 ± 8.0
20:4	6.5 ± 2.0	10.0 ± 3.0	13.0 ± 3.0	12.0 ± 0.7	11.5 ± 3.4	17.0 ± 7.0
Others	2.5 ± 0.9	2.4 ± 0.7	2.5 ± 0.3	1.5 ± 0.5	2.0 ± 0.6	3.7 ± 0.8 ^a

Values are means ± SEM of 3-8 rats per group. Others refer to phosphatidylinositol and phosphatidylserine for PL classes as well as 14:0 and 16:1 for FA composition. SPH; sphingomyeline PE; phosphatidylethanolamine, LysoPC; lysophosphatidylcholine.

^aP < 0.05 compared to CD group.

Table 6

Cholesterol, Phospholipid content, cholesterol/phospholipid ratio and fluorescence polarization of membranes in rats fed control diet (CD), Choline-enriched diet (ChD) and Lecithin-enriched diet (LD) during basal period and after taurocholic acid infusion.

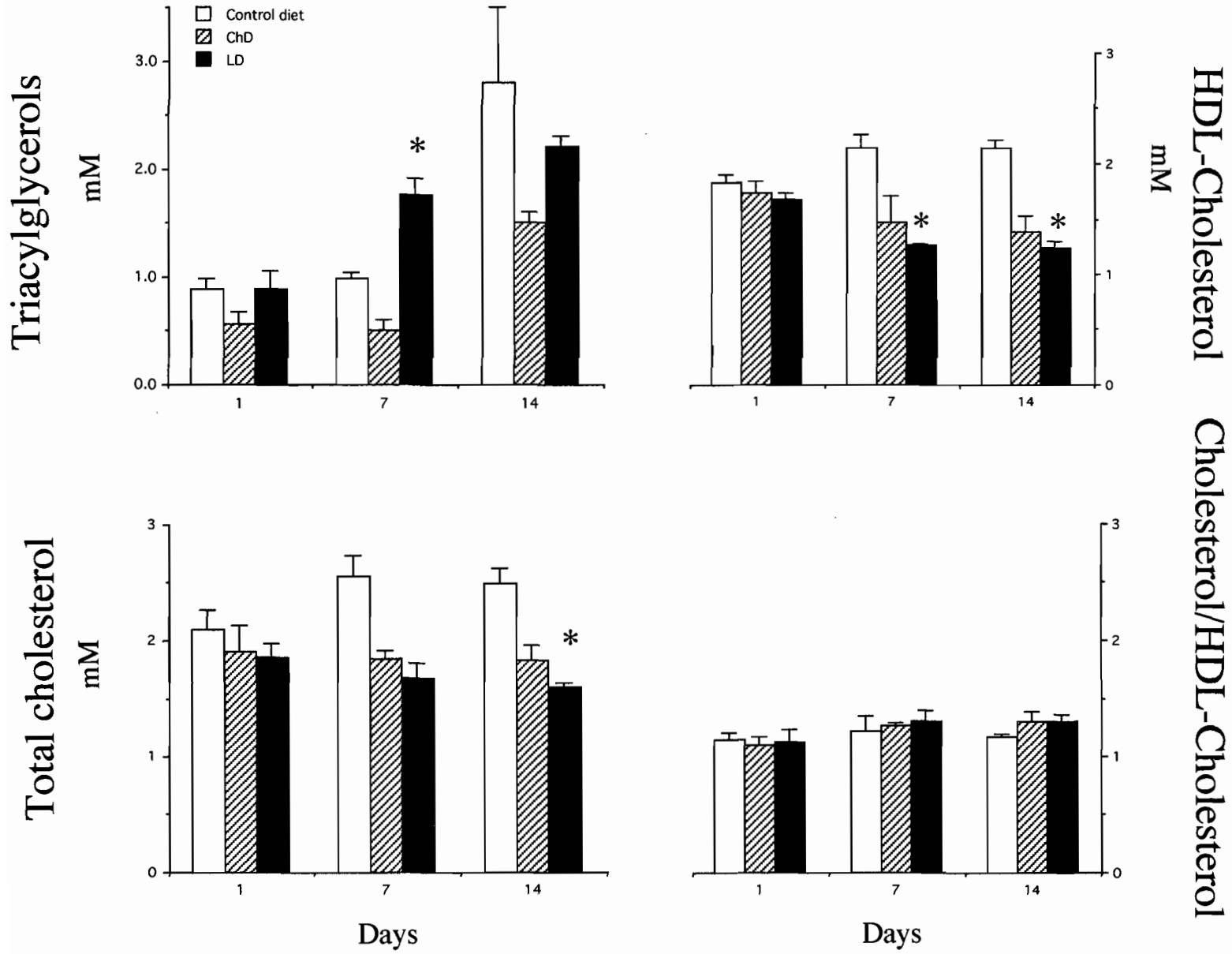
Groups	Cholesterol nmol/mg/protein		Phospholipids nmol/mg protein		Cholesterol/Phospholipid ratio		Polarization	
	M	BCM	M	BCM	M	BCM	M	BCM
During basal period								
CD	41 ± 1	272 ± 32	504 ± 36	634 ± 89	0.08 ± 0.01	0.4 ± 0.1	0.086 ± 0.009	0.193 ± 0.009
ChD	40 ± 10	220 ± 43	447 ± 171	608 ± 144	0.09 ± 0.02	0.4 ± 0.1	0.109 ± 0.011	0.197 ± 0.009
LD	36 ± 10	249 ± 32	520 ± 106	659 ± 73	0.07 ± 0.01	0.4 ± 0.03	0.120 ± 0.007	0.194 ± 0.010
After taurocholic acid infusion								
CD	36 ± 7	292 ± 48	394 ± 63	469 ± 139	0.09 ± 0.01	0.7 ± 0.02	0.107 ± 0.007	0.208 ± 0.010
ChD	34 ± 19	246 ± 23	418 ± 49	473 ± 79	0.08 ± 0.03	0.5 ± 0.1	0.117 ± 0.005	0.202 ± 0.007
LD	29 ± 8	287 ± 59	448 ± 66	520 ± 104	0.07 ± 0.02	0.6 ± 0.1	0.121 ± 0.003	0.206 ± 0.010

Values are means ± SEM of 4 rats per group.

M: Microsomes.

BCM: Bile canalicular membrane.

Figure 1



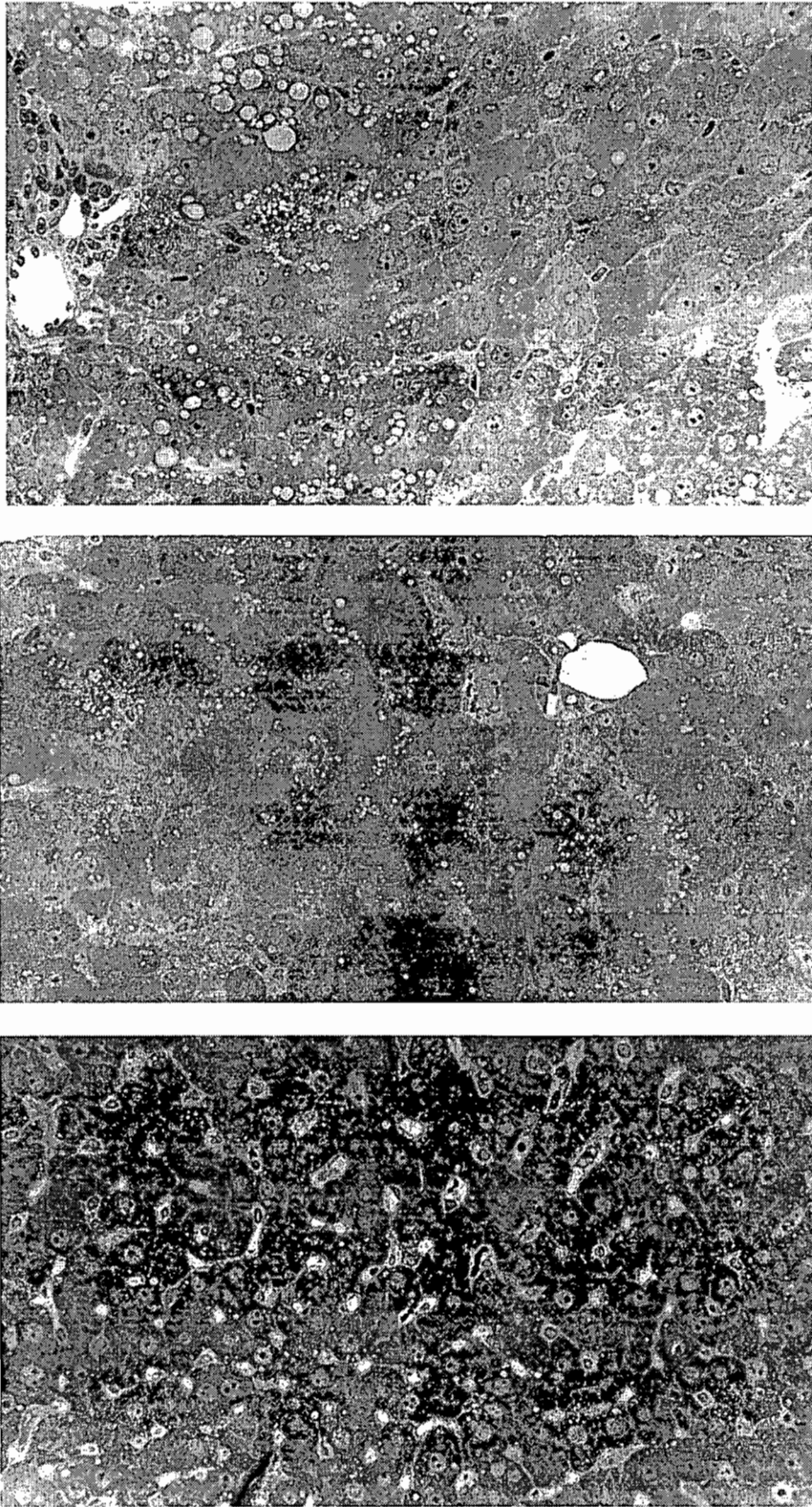
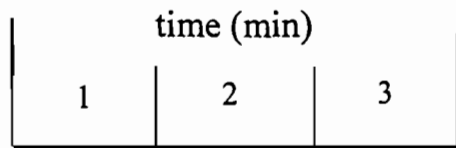
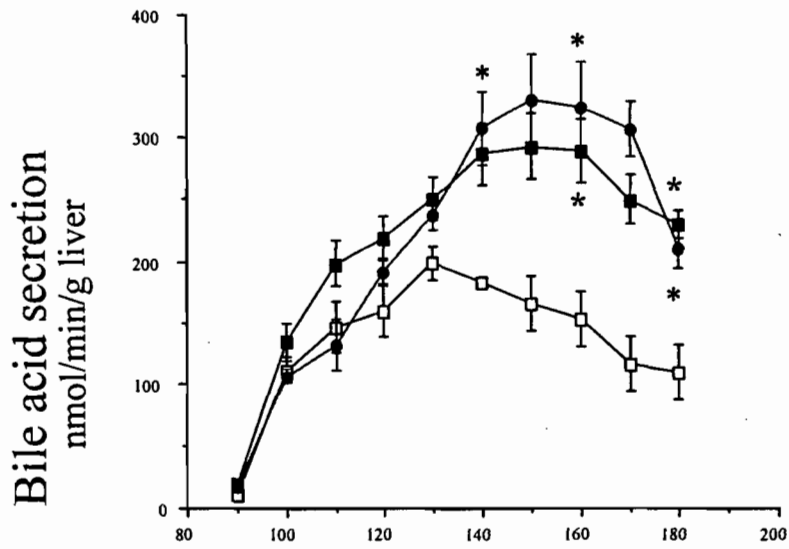
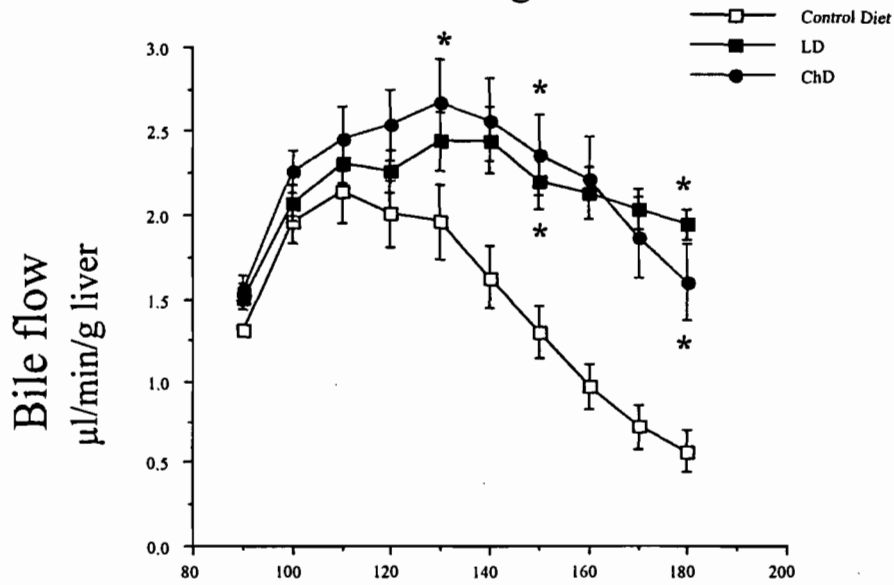


Figure 2. Light microscopy of liver sections in rats fed control diet (top), choline-enriched diet (middle), and lecithin-enriched diet (bottom).

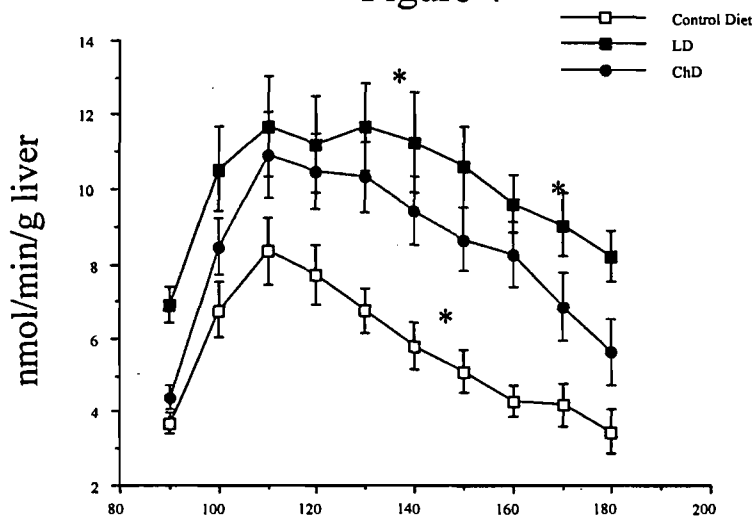
Figure 3



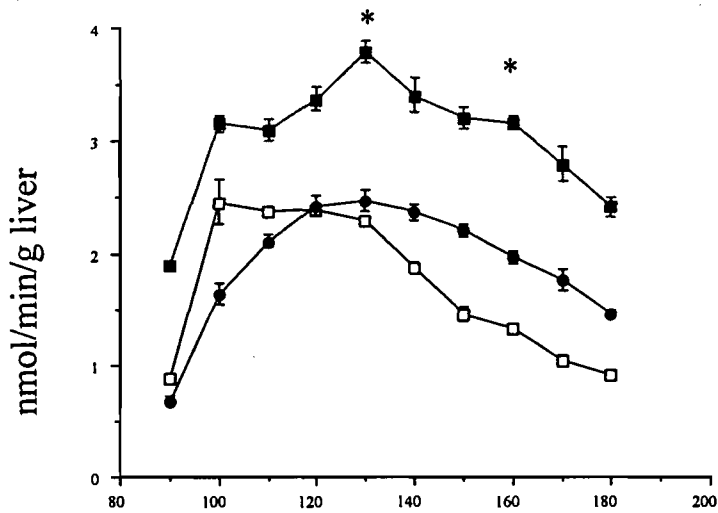
Taurocholic acid infusion rate
µmol/min/100 g bw

Figure 4

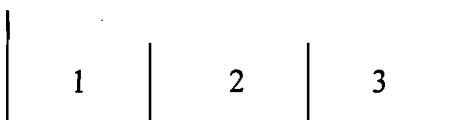
Phospholipid secretion rate



Cholesterol secretion rate



time (min)



Taurocholate acid infusion rate

$\mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g bw}$

CHAPITRE 3. ARTICLE II

**Effects of dietary soybean lecithin on plasma lipid transport and
hepatic cholesterol metabolism in rats**

Marie-Josée LeBlanc, Sylvain Brunet, Grace Gavino, Victor Gavino,
Ibrahim M Yousef, Emile Lévy, Beatriz Tuchweber

Soumis à **Journal of nutritional biochemistry**

**EFFECTS OF DIETARY SOYBEAN LECITHIN ON PLASMA LIPID TRANSPORT
AND HEPATIC CHOLESTEROL METABOLISM IN RATS**

Marie-Josée LeBlanc¹, Sylvain Brunet³, Guylaine Bouchard³, Ibrahim M. Yousef^{2,3}, Victor Gavino¹, Emile Lévy^{1,3} and Beatriz Tuchweber^{1,3}

Correspondance address: Beatriz Tuchweber, PhD

Professor

Department of Nutrition


University of Montreal, C.P. 6128

Succursale Centre-Ville, Montreal, Quebec

Canada, H3C 3J7

Telephone number: 514 343 6393

Fax number: 514 343 7395

E-mail : 

From the ¹Department of Nutrition, ² Department of Pharmacology, Université de Montréal, Qué., Canada and the ³Unité de Recherche en Gastroenterologie-Nutrition, Centre de Recherche, Hopital Ste-Justine, Qué., Canada.

Short title: Lecithin diet and hepatic cholesterol metabolism

Supported by a grant from the Medical Research Council of Canada

Key words: dietary lecithin, plasma lipoproteins, biliary cholesterol, hepatic cholesterol regulatory enzymes

Abstract

Dietary lecithin can stimulate bile formation and biliary lipid secretion, particularly cholesterol output in bile. This effect was associated with decreased hepatic cholesteryl ester and triglycerides content, which suggested that the lecithin-rich diet could modify hepatic cholesterol regulatory enzymes and lipoprotein metabolism. Therefore, we examined hepatic activities of 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme A reductase "HMG -CoA reductase", cholesterol 7 α -hydroxylase and acyl-CoA: cholesterol acyltransferase "ACAT" as well as plasma lipids and lipoprotein composition in rats fed diets enriched with 20% of soybean lecithin during 14 days. We also evaluated the content of hepatic canalicular membrane proteins involved in lipid transport to the bile (all P-glycoproteins as detected by the C 219 antibody and the sister of P-glycoprotein "spgp" or bile acid export pump) by Western blotting. As predicted, lecithin diet modified hepatic cholesterol homeostasis. The activity of hepatic HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase was enhanced by 30 and 12 % respectively. By contrast, microsomal ACAT activity showed a dramatic decrease of 75% which was associated with lower cholesterol content and increase of microsomal membrane fluidity. As previously reported from ACAT inhibition, the plasma level and size of very low density lipoprotein (VLDL) were significantly decreased and bile acid pool size and biliary lipid output were significantly increased. The canalicular membrane content of lipid transporters did not seem to be significantly affected by dietary lecithin. The current data on inhibition of ACAT activity and related metabolic effects by lecithin mimic the previously reported effects following drug-induced inhibition of ACAT activity, suggesting potential beneficial effects of dietary lecithin supplementation in vascular disease.

Introduction

The liver plays a major role in cholesterol homeostasis by regulating plasma lipoprotein metabolism and lipid output in bile ^{1,2}. The organ is the main site of formation of very low density lipoprotein (VLDL) and takes up and degrades high density lipoprotein (HDL) and other lipoprotein fractions ^{3,4}. Hepatic bile formation and secretion are essential in maintaining cholesterol balance since the sterol is eliminated from the body almost exclusively via bile as such, or after its conversion into bile acids. Several hepatic microsomal enzymes are implicated in regulating cholesterol hepatic homeostasis: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase), the rate limiting enzyme in cholesterol synthesis ⁵, cholesterol 7 α -hydroxylase the main route catalyzing the conversion of cholesterol into bile acids ⁶ and, acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) which is implicated in the acylation of cholesterol and in the assembly and secretion of VLDL particles. Thus, ACAT activity plays a major role in the VLDL secretion in blood and the subsequent cholesteryl ester accumulation and risk of vascular disease ^{7,8}. There have been studies indicating a correlation between inhibition of ACAT activity, reduced hepatic cholesteryl ester content and reduced VLDL secretion. Drug induced ACAT inhibition in hepatocyte's cell culture was shown to enhance the pool of free cholesterol which served as substrate and inducer of cholesterol 7 α -hydroxylase ⁹⁻¹¹. This suggested that enhanced excretion of biliary bile acids may account for the reduction of VLDL secretion by the liver and could represent a major mechanism in the lipid lowering effect of ACAT inhibitors and their potential antiatherogenic action.

The nutritional effects of soybean lecithin on lipid homeostasis and secretion of lipids in bile has been the subject of several studies ¹²⁻¹⁴. In rats, feeding diets enriched in soybean lecithin can stimulate bile formation and secretion rate of biliary lipids, phospholipid and cholesterol. This diet also improved bile formation when a high concentration of bile acid was infused, enhancing the maximum secretory rate of bile acids and preventing bile acid-induced cholestasis (impaired bile formation) ^{12,14}. This effect was attributed to greater availability of biliary lipid particularly phospholipid and free cholesterol preventing canalicular membrane damage induced by bile

acids. In normolipidic rats, lecithin-rich diets can modulate plasma total and HDL-cholesterol and it was suggested that the transport of unesterified cholesterol to the liver may be stimulated and directed towards bile to be secreted as such or as its metabolites ¹³. In the model of hypercholesterolemic rabbit, lecithin also induces a decrease of beta-VLDL cholesterol and of beta-VLDL-triacylglycerol while enhancing biliary lipid output ¹⁵. Thus, we hypothesized that lecithin induces decrease of VLDL may be linked to inhibition of ACAT activity and stimulation of lipid secretion in bile. In the present study, we investigated in rats the effect of lecithin on hepatic cholesterol metabolism, lipoprotein lipid composition and expression level of canalicular transporter protein involved in biliary lipid secretion.

Materials and methods

Animals and Diets

Adult male Sprague-Dawley rats, weighing 200-250 g were purchased from Charles River Breeding Laboratories (St-Constant, Quebec, Canada). Rats were allowed free access to water and food and were maintained at 22° C with a 12-hour light cycle. After 2 to 3 days of acclimatization, the rats were randomly divided into two groups: one was assigned to an 16% polyunsaturated TG-enriched diet containing sunflower seed oil, referred to as the control diet, and the other was a 20% semi-purified soybean lecithin diet. The percentage of TG in both diets was comparable. The detailed composition of the diets was published previously ¹⁴. Fatty acid composition did not differ significantly between diets with palmitic and linoleic acid contributing 25.1% and 54.6% in lecithin diet compared to 18.5% and 49.6% in control diet respectively. Energy intake of control and lecithin fed groups was 404 and 375 KJ/day respectively. After 14 days on the control and experimental diets, rats were food-deprived overnight and used for the following studies.

Blood Collection and Lipoprotein Isolation

Rats were anesthetized by the intraperitoneal injection of pentobarbital (45 mg/kg body wt) after overnight fast. Blood was collected from the abdominal aorta into EDTA-containing tubes (1 mg/ml) and plasma separated immediately by low speed centrifugation (2800 rpm, 15 minutes, 4°C). A fraction of plasma was rapidly frozen and stored at -80°C for lipid analysis.

Lipoproteins were isolated from fresh plasma by conventional discontinuous density gradient ultracentrifugation as previously described in detail ¹⁶. Briefly, after preliminary centrifugation to remove chylomicrons, VLDL and low density lipoproteins (LDL) were isolated at a density of 1.006 and 1.063 g/ml, respectively, running at 40,000 rpm for 18 hours at 5°C. The separation of HDL2 and HDL3 was performed at 40,000 rpm for 48 hours at 5°C. Each fraction was dialyzed against phosphate buffered saline (PBS) with 0.001 mol/L EDTA, pH 7.0 at 4°C.

Plasma Lipid and Lipoprotein Analysis

Plasma concentrations of total cholesterol, free cholesterol, HDL-cholesterol and TG were measured enzymatically using commercial kits (Boehringer Mannheim, Montreal, Canada). CE was calculated as the difference between total and free cholesterol x 1.6. The lipoprotein lipid composition was determined by the same methodology as above. Lipoprotein-protein was quantified according to Lowry et al ¹⁷ with bovine serum albumin as a standard. Phospholipids were determined by the Bartlett method ¹⁸.

Hepatic Lipid Determination

Rats were sacrificed after blood collection and a portion of the liver was taken, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until assayed. Samples were homogenized in 0.9% NaCl and lipids extracted with chloroform-methanol (2:1, vol/vol), followed by TG, total and free cholesterol, as well as phospholipid analysis as described before. Total liver lipid content was determined gravimetrically, after extraction with chloroform-methanol (2:1, vol/vol).

Bile Sampling and Bile Analysis

Biliary lipid output and bile acid pool size was evaluated in additional groups of rats fed control and lecithin rich-diets. Animals were anesthetized with pentobarbital (45 mg/Kg body weight i.p.) and the common bile duct was cannulated with a PE-10 catheter. They were then immediately placed in restraining cages with free access to water. Bile was collected for 17 hours at 1 hour intervals with a automatic fraction collector maintained at constant temperature of 8°C. The bile acid pool was measured according to the «washout» technique of Ericksson ¹⁹. Total bile acids in bile were assessed by using 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (Sigma, St-

Louis, MO, USA) ¹⁴. The total cholesterol and phospholipid output in bile was measured in samples obtained during the first hour of collection as described above for plasma.

Preparation of Liver Microsomes

Livers were removed and placed in ice-cold buffer (pH 7.4) containing 250 mmol/L of sucrose, 20 mmol/L of tris-HCL, 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 50 mM sodium fluoride, and 20 mM dithiothreitol (DTT). After tissue homogenisation, microsomal fractions were prepared according to a previously described technique ²⁰. The washed microsomal pellets were quickly frozen and stored at -80°C for later use.

Microsomal HMG-CoA Reductase Activity.

Microsomal enzymatic activity was assayed as described previously ²¹. Briefly, the reaction mixture contained 160 mM potassium phosphate (pH 7.4), 300 µg microsomal protein, 20 mM glucose-6-phosphatase, 2.5 mM DTT and 1.2 units glucose-6-phosphatase dehydrogenase. The reaction was initiated by the addition of [3-¹⁴C]-HMG-CoA (15,000 dpm/nmol). After incubation for 30 minutes at 37°C, the [¹⁴C]-mevalonate formed was converted into lactone, isolated by thin-layer chromatography, and counted using an internal standard to correct for incomplete recovery. HMG-CoA reductase activity was expressed as nanomoles of mevalonate synthesized per milligram of protein per minute.

Microsomal cholesterol 7 α-Hydroxylase Activity

Microsomal cholesterol 7 α-hydroxylase activity was measured according to Hylemon et al. ²² after modification by Brunet et al ²³. Briefly, 1 mg of microsomal protein was diluted in a potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 50 mM NaF, 5 mM DTT, 1mM EDTA, 20% glycerol, 0.015% CHAPS and 0.25 mM desferal. The reaction was started by adding an NADPH regenerating system containing 1 mM NADP, 10 nM glucose-6-phosphate and 0.15 UI glucose-6 phosphate dehydrogenase. Following 20 minutes reaction at 37°C, the endogenous 7 α-hydroxycholesterol form was derivatized with a 0.1% cholesterol oxidase solution. Dried petroleum ether extract was resuspended in 70% acetonitrile/30% methanol mobile phase, prior

to HPLC chromatography, with UV detection at 240 nm, using 7 β -hydroxycholesterol as an internal standard. The 7 α -hydroxycholesterol product was expressed as pmoles/min/mg protein.

Microsomal ACAT Activity

The determination of ACAT activity was based on an assay described previously²⁰. A sample containing 75 μ g microsomal protein was mixed with 5 μ mol [¹⁴C]oleoyl coenzyme A (specific activity ~ 10,000 dpm/ μ mol) to initiate the reaction in a buffer solution (pH 7.5) consisting of 0.1 M Tris-HCl, 0.25 M sucrose, and 1 mM EDTA. After incubation for 10 minutes at 37°C, the reaction was stopped by adding chloroform/methanol (2:1, vol/vol) and this was followed by addition of [³H] cholesteryl oleate as an internal standard to estimate recovery.

Analysis of Microsome Lipid Composition and Fluidity Measurement

The lipids in microsomal membranes were extracted by the method of Bligh and Dyer²⁴. Total phospholipid and cholesterol content were determined as described above. Fluidity of microsomal membranes was estimated by the incorporation of a fluorescent probe (1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene p-toluene-sulfonate) (TMA-DPH) and measurement of polarization²⁵. To membrane samples containing 500 μ g microsomal protein in potassium phosphate buffer solution (pH 7.2) were added 6 μ l TMA-DPH (1 mmol/L in acetonitrile) by vortexing for 10 seconds. Following an incubation of 30 minutes at 37°C and evaporation of acetonitrile, fluorescence was measured in a spectrofluorophotometer at 22°C with polarization filters parallel and perpendicular to the excitation beam. The excitation wavelength was at 360 nm and emission wavelength was 430 nm.

Preparation of liver plasma membranes enriched in bile canalicular complexes and Western Blotting.

Additional groups of rats fed control and lecithin rich diets for 14 days were used to prepare bile canalicular enriched membrane fractions and to assess lipid transport proteins.

Plasma membranes were isolated from liver homogenates by a procedure described by this laboratory²⁶ with the addition of protease inhibitor cocktail as described²⁷. Protein concentrations in membrane fractions were determined with the Micro BCA protein assay

reagent kit from Pierce and the degree of purification was determined by the relative enrichment of marker enzymes²⁶. Lecithin feeding did not modify marker enzymes enrichment.

Western blot analysis was carried out as published²⁷. Briefly, 30 µg protein normalized for enrichment in the membrane marker leucine aminopeptidase was separated using SDS gel electrophoresis and subsequently blotted onto nitrocellulose and probed with the mouse monoclonal C 219 antibody (Signet Laboratories Inc. Dedham. MA) which detects all p-glycoproteins including mdr 2 and with a rabbit polyclonal anti-spgp antibody^{27,28} (kindly provided by Dr V Ling, British Columbia Cancer Res. Center, Vancouver, BC. Canada) at a 1:5000 dilutions. Protein density was determined by scanning the blots using an Image System.

Statistical Analysis

All values were expressed as the mean ± SEM. Statistical differences were assessed by Student's two-tailed *t* test.

RESULTS

Biliary lipid secretion and bile acid pool

As shown in Figure 1 and in accordance with previous results¹⁴, lecithin-rich diet stimulated biliary bile acid, phospholipid and cholesterol secretion rates. Total daily biliary bile acid secretion for the lecithin-fed rats was also elevated when compared to triglyceride fed rats (442.84 ± 57.65 versus 282.89 ± 16.17 µmol/24 hrs, $P < 0.05$). The calculation of the bile acid pool size, following a 17 hours biliary washout revealed a marked increase in the lecithin group. The similar degree of elevation of bile acid secretory rate and pool are indicative of unchanged recycling frequency of bile acids.

Plasma Lipids, lipoprotein profile and composition

Figure 2 illustrates the influence of feeding lecithin diet on plasma lipids. The dietary intervention significantly increased total cholesterol, contributed by both higher free and

cholesterol ester levels. However, the lecithin fed rats exhibited a decreased plasma TG and phospholipid levels although reaching statistically significant difference only for phospholipids.

Feeding the lecithin diet did not affect significantly IDL and HDL lipoprotein fractions but produced a marked decrease of VLDL (54%, $P < 0.05$ compared to control group). By contrast, LDL class increased (Figure 3).

The relative lipid content of plasma lipoproteins, isolated by sequential ultra-centrifugation, is shown in Table 1. VLDL (1.006g/ml) particles from lecithin fed rats demonstrated a significant decrease of the proportion of TG (16%). This change resulted in a lower ratio of TG+CE/FC+PL+protein, indicative of smaller VLDL particles in the experimental group.

Sterol Enzymes

The activity of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 alpha-hydroxylase in liver microsomes showed a tendency to be increased by 30% and 12% respectively after 14 days of dietary intervention (Figure 4). In contrast, ACAT activity was profoundly inhibited (75%) by lecithin diet when compared to rats fed control diet.

Hepatic Lipid Content

As shown in Table 2, the total lipid content in liver homogenates from lecithin fed rats was significantly decreased compared to control rats. Detailed analysis indicated that TG and total cholesterol content were significantly decreased. The decreased in total cholesterol content was attributed to a decline in both the free and the esterified cholesterol, although not reaching statistically significant differences for the latter.

Phospholipid and Cholesterol Content in Microsomes

Analysis of the lipid content in isolated microsomes (Table 3) reveals that total cholesterol was decreased by 30% in lecithin group ($P < 0.01$) whereas the PL content was not significantly different between two groups. Consequently, the cholesterol/PL ratio was decreased in the experimental group and a significant increase in membrane fluidity was observed.

P-glycoproteins in canalicular membranes

Representative Western blot showing membrane preparations from rats fed control and lecithin-rich diet is presented in Figure 5. The relative C219 and spgp levels revealed no significant differences between the control and lecithin groups (Figure 5).

Discussion

This study clearly shows that feeding rats diets enriched in soybean lecithin results in remarkable changes in hepatic cholesterol homeostasis. The major finding is a decrease of ACAT activity and an altered cholesterol compartmentalization in the liver. Previous work indicated that this enzyme plays a pivotal role in cholesterol distribution in the hepatocyte, specifically, whether it is diverted to lipoprotein or biliary pathways or to the cholesterol ester storage compartment^{11,29-30}. Under the present experimental conditions, lower ACAT activity was associated with lower free and cholesterol ester content. It is likely that the free cholesterol available after ACAT inhibition in the hepatocyte was very rapidly directed for elimination in bile either directly or after conversion to bile acids. The increased diversion of cholesterol and its metabolites into bile by the inhibition of hepatic ACAT resulted in a decline of cholesteryl ester secretion by the cells accompanied by lower plasma VLDL levels^{31,32}. In rats, lecithin supplements have been shown to reduce availability of fatty acids for triglyceride synthesis by decreasing the rate of fatty acid synthesis³³⁻³⁴. A reduced rate of triglyceride and/ or cholesteryl ester synthesis may be an additional mechanism contributing to the diminished plasma VLDL. In this study, we further evaluated microsomal lipid content and fluidity as well as the HMG-CoA reductase and cholesterol alpha hydroxylase activity (the primary route to bile acid synthesis). The cholesterol content of microsomal membranes was significantly decreased and membrane fluidity increased. This may have triggered the enhanced activity of the rate limiting enzyme in cholesterol synthesis in order to compensate for the reduction of cellular cholesterol pool.

Several studies have shown incorporation of cholesterol, available from ACAT inhibition, into the bile acid synthetic pathway^{9,35}. This is corroborated in the present study as lecithin-fed rats also showed greater bile acid pool size and an increase, although not statistically significant, of

the 7 alpha-hydroxylase activity. It is known that this enzyme is sensitive to bile acid pool than in control rats which may have inhibited enzyme activity³⁶.

In this study, we corroborate that lecithin induces a substantial increase in biliary output of bile acid, cholesterol and phospholipid which is co-secreted in bile with cholesterol. The hepatic availability of substrates for biliary excretion is a significant factor in bile secretion. However, it is well established that the transport across the hepatic canalicular membrane is the rate limiting step for biliary secretion of most bile components and for hepatic bile formation³⁷. This transport is driven mainly by ATP-dependent export pumps³⁸. This raised the question whether increased availability of biliary lipid after lecithin-rich diet was also associated with greater content of membrane proteins involved in biliary lipid secretion. The canalicular secretion of phospholipid is mediated by an ATP-dependent mdr2 glycoprotein which transfers phospholipid from the inner to the outer canalicular membrane³⁸⁻³⁹. Mice with disrupted mdr2 protein do not secrete phospholipid and the cholesterol output in bile is markedly impaired⁴⁰. The canalicular secretion of monovalent bile acids (e.g. taurocholate) is also mediated by an ATP-dependent glycoprotein, the spgp or bile acid export pump and in mice inactivation of spgp, leads to failure to secrete monovalent bile acids^{41,42}. In the present study, membrane canalicular content of spgp and of C 219 reactive proteins which includes mdr2 and spgp was evaluated and results indicated no significant modification by lecithin feeding. Since in normal rodent livers these transporters are present in high levels it may be that they are not functioning at maximal capacity. Thus, increased output of biliary could occur without modulation of the transport proteins.

In summary, dietary lecithin increases bile acid pool and stimulates biliary lipid secretion and bile which is associated with significant changes in hepatic cholesterol compartmentalization favoring a greater mobilization of cholesterol to bile. Diet intervention also drastically reduced ACAT activity and plasma VLDL as well as their triglyceride and cholesteryl ester content. Thus, lecithin feeding mimics the effect of drug-induced inhibition of ACAT activity which corroborates the potential antiatherogenic properties of lecithin supplementation.

ACKNOWLEDGMENT

These studies were supported by grants from the Medical Research Council of Canada. The authors thank Maurice Audet and Grace Gavino for valuable technical assistance.

References

1. Marzolo MP, Rigotti A, Nervi F: Secretion of biliary lipids from the hepatocyte. *Hepatology*. 12 (1990) 134S-142S.
2. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK: Role of the liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different abnormal species, including humans. *J. Lipid Res.* 34 (1993) 1637-1659.
3. Cooper AD: Role of the liver in the degradation of lipoproteins. *Gastroenterol.* 88 (1985) 192-205.
4. Turley SD, Dietschy JM: The metabolism and excretion of cholesterol by the liver, in Arias IM, Jacoby H, Popper D, Schachter D, Schafritz DA. (Eds): *The liver: Biology and Pathology*, New York, Raven, 1988, pp 617-641.
5. Goldstein JL, Brown MS: The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46 (1977) 897-930.
6. Mayant NG, Mitropoulos KA: Cholesterol 7 α -hydroxylase. *J. Lipid Res.* 18 (1977) 135-153.
7. Suckling KE, Stange EF: Role of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J. Lipid Res.* 26 (1985) 647-671.
8. Burnett J, Wilcox LJ, Huff MW. Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibition and hepatic apolipoprotein B secretion. *Clin. Chim. Acta.* 286 (1999) 231-242.
9. Azuma Y, Kawasaki T, Ohno K, Seto J, Yamada T, Yamasaki M, Nobuhara Y. Effects of NTE-122, a novel Acyl-Coa:cholesterol acyltransferase inhibitor, on cholesterol esterification and secretions of apolipoprotein B-containing lipoprotein and bile acids in HepG2. *Jpn. J. Pharmacol.* 79 (1999) 151-158.

10. Muriki S, Yamagishi I, Sto M, Tomisawa K, Nara Y, Yamori YL. ACAT inhibitor HL-004 accelerates the regression of hypercholesterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP): stimulation of bile acid production by HL-004. *Atherosclerosis* 133 (1997) 97-104.
11. Post SM, Zoetewij JP, Bos MHA, De Wit ECM, Havinca R, Kuipers F, Princen HMG: Acyl-coenzyme A:Cholesterol acyltransferase inhibitor, Avasimibe, stimulates bile acid synthesis and cholesterol 7 α -hydroxylase in cultured rat hepatocytes and in vivo in the rat. *Hepatol.* 30 (1999) 491-500.
12. Rioux F, Perea A, Yousef IM, Levy E, Malli L, Carrillo M, Tuchweber B: Short term feeding of diet enriched in phospholipids increase bile formation and bile acid transport maximum in rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1214 (1994) 193-202.
13. Polichetti E, Diaconescu N, Malli L, Portugal H, Pauli AM, Tuchweber B, Yousef I, Chanussot F: Cholesterol-lowering effect of soyabean lecithin in normolipidaemic rats by stimulation of biliary lipid secretion *Br. J. Nutr.* 75 (1996) 471-481.
14. LeBlanc MJ, Gavino V, Perea A, Yousef IM, Levy E, Tuchweber B: The role of dietary choline in the beneficial effects of lecithin on the secretion of biliary lipids in rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1393 (1998) 223-234.
15. Polichetti E, Janisson A, Lechène de la porte P, Portugal H, Léonardi J, Luna A, La Droitte P, Chanussot F. Dietary polyenylphosphatidylcholine decreases cholesterolemia in hypercholesterolemic rabbits. Role of the hepato-biliary axis. *Life Sciences* 67 (2000) 2563-2576.
16. Levy E, Thibault L, Garofalo C, Messier M, Lepage G, Ronco N and Roy CC: Combined (n-3 and n-6) essential fatty acid deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes. *J. Lipid. Res.* 31 (1990) 2009-2017.
17. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

18. Bartlett GR: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 466-468.
19. Ericksson S: Biliary excretion of bile acids and cholesterol in bile fistula rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94 (1951) 578.
20. Levy E, Garofalo C, Rouleau T, Gavino V, Bendayan M: Impact of essential fatty acid deficiency on hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology*. 23 (1996) 848-857.
21. Brown MS, Goldstein JL, Dietschy JM: Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver of the rat. *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 5144-5149.
22. Hylemon PB, Studer ES, Pandak WM, Heuman DM, Vlahcevic ZR and Chiang JYL: Simultaneous measurement of cholesterol 7 α -hydroxylase activity by reverse-phase high-performance liquid chromatography using both endogenous and exogenous [4-¹⁴C] cholesterol as substrate. *Anal. Biochem.* 182 (1989) 212-216.
23. Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M, Levy E: Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology*. 29 (1999) 1809-1817.
24. Bligh EG, Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Biophys.* 37 (1959) 911-917.
25. Kapitulnik J, Tshershedsky M, Barenholz Y: Fluidity of the rat liver microsomal membrane: increase at birth. *Science* 206 (1979) 843-844.
26. 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.* 252 (1987) G84-G91.
27. Hooiveld GJEJ, Vos TA, Scheffer GL, van Goor H, Koning H, Bloks V, Loot AE, Meijer DKF, Jansen PLM, Kuipers F, Muller M: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) induce hepatic expression of the phospholipid translocase mdr2 in rats. *Gastroenterol.* 117 (1999) 678-687.

28. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Nemeth A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ: A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nature. Genet.* 20 (1998) 233-238.
29. Nervi F, Bronfman M, Allalon W, Depiereux E, del Pozo R: Regulation of biliary cholesterol secretion in the rat. Role of hepatic cholesterol esterification. *J. Clin. Invest.* 76 (1984) 1773-1781.
30. Erickson SK, Van Zuiden PEA: Effects of bile salts on rat hepatic acyl CoA:cholesterol acyltransferase. *Lipids.* 30 (1995) 911-915.
31. Burnett JR, Wilcox LJ, Huff MW. Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibition and hepatic apolipoprotein B secretion. *Clin. Chim. Acta.* 286 (1999) 231-242.
32. Brown A-M, Wiggins D, Gibbons GF. Manipulation of cholesterol and cholesteryl ester synthesis has multiple effects on the metabolism of apolipoprotein B and the secretion of very-low-density lipoprotein by primary hepatocyte cultures. *Biochim. Biophys. Acta.* 1440 (1999) 253-265.
33. Ide T, Murata M, Sunada Y: Triacylglycerol and fatty acid synthesis in hepatocytes in suspension isolated from rats fed soybean phospholipid. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58 (1994) 699-702.
34. Ide T, Murata M. Depressions by dietary PL of soybean and egg yolk origins of hepatic triacylglycerol and fatty acid synthesis in fasted-refed rats. *Ann. Nutr. Metab.* 38 (1994) 340-348.
35. Murakami S, Yamagishi I, Sto M, Tomisawa K, Nara Y, Yamori Y. ACAT inhibitor HL-004 accelerates the regression of hypercholesterolemia in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP): stimulation of bile acid production by HL-004. *Atherosclerosis* 133 (1997) 97-104.

36. Carulli N, Bertolotti M, Carubbi F, Concari M, Martella P, Carulli L, Loria P. Effect of bile salt pool composition on hepatic and biliary functions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14 (2000) S14-S18.
37. Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology*. 14 (1991) 551-566.
38. Borst P, Zelcer N, van Helvoort A: ABC transporters in lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta*. 1486 (2000) 128-144.
39. Oude Elferink RPJ, Ottenhoff R, van Wijland MJ, Smit JJM, Schinkel AH, Groen AK: Regulation of biliary lipid secretion by *mdr2* P-glycoprotein in the mouse. *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 31-38.
40. Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM, Ottenhoff R, van der Lugt NMT, van Roon MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P: Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75:451-462, 1993.
41. Childs S, Yeh RL, Georges E, Ling V: Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer. Res.* 55 (1995) 2029-2034.
42. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ: The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 10046-10050.

Figure legends

Figure 1.

Values of biliary bile acid pool, biliary bile acid secretion, biliary phospholipid secretion and biliary cholesterol secretion in rats fed control diet and lecithin diet.

Values represent the mean \pm SEM of 4-5 animals per group.

* $P < 0.05$ when compared to Control diet.

Figure 2.

Effect of feeding lecithin-enriched diet on plasma lipids.

Data are means \pm SEM of 4 animals per group.

* $p < 0.05$ compared to control diet.

Figure 3.

Effect of feeding lecithin-enriched diet on plasma lipoproteins.

Values represent the means of \pm SEM of 6 animals per group.

* $p < 0.05$ compared to control diet.

Figure 4.

Activity of liver hydroxymethylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, cholesterol 7 alpha-hydroxylase and acyl-coenzyme-A:cholesterol acyltransferase (ACAT). Rat liver microsomes were isolated and assayed for the three key regulatory enzymes. Values represent the mean of \pm SEM of 6 rats per group.

$P < 0.05$ compared to Control diet.

Figure 5.

P-gps and spgp protein levels in membranes fractions of control rat liver and lecithin diet rat liver. Lanes 1 and 2, control; lanes 3 and 4, lecithin group. Immunoblotting analysis was performed using the primary antibodies C219 and spgp, recognizing all Pgps and spgp respectively. Each band represents the results of a single animal.

Figure 6.

Relative areas for C219 and spgp protein expression.

4 rats per group

Table 1
Chemical composition of plasma lipoproteins

Lipoproteins	Composition					Weight Ratios		
	TG	FC	CE	PL	PR	TG/PR	CE/PR	(TG+CE)/(FC+PL+PR)
VLDL(1.006g/ml)								
Control	60.23 ± 2.69	2.41 ± 0.46	5.34 ± 0.63	17.23 ± 1.58	14.79 ± 3.91	4.42 ± 1.14	0.78 ± 0.41	2.00 ± 0.23
Phospholipid	51.53±1.82*	2.32 ± 0.32	5.00 ± 0.24	17.49 ± 0.48	23.69 ± 2.49	2.4 ± 0.46	0.23 ± 0.04	1.32 ± 0.11*
LDL (1.063 g/ml)								
Control	3.33 ± 1.14	2.73 ± 0.51	26.64 ± 1.67	29.98 ± 5.90	37.32 ± 7.69	0.09 ± 0.04	0.57 ± 0.04	0.44 ± 0.04
Phospholipid	2.88 ± 0.32	3.44 ± 0.32	32.35 ± 3.00	22.37 ± 2.59	39.03 ± 2.28	0.08 ± 0.02	0.86 ± 0.12	0.56 ± 0.07
HDL2(1.21 g/ml)								
Control	0.26 ± 0.17	2.05 ± 0.44	36.42 ± 5.66	27.53 ± 3.34	30.75 ± 7.38	0.03 ± 0.01	0.93 ± 0.17	0.68 ± 0.19
Phospholipid	0.40 ± 0.25	2.52 ± 0.36	34.02 ± 2.35	26.79 ± 1.10	36.32 ± 3.01	0.04 ± 0.01	0.99 ± 0.14	0.54 ± 0.06
HDL3(1.21 g/ml)								
Control	0.24 ± 0.15	1.17 ± 0.13	32.67 ± 3.98	28.60 ± 4.08	34.70±47.62	0.02 ± 0.001	0.74 ± 0.11	0.53 ± 0.09
Phospholipid	0.22 ± 0.14	0.94 ± 0.12	29.48 ± 3.10	21.75 ± 3.39	47.62 ± 5.54	0.02 ± 0.002	0.68 ± 0.12	0.44 ± 0.06

Values are means ± SE of total plasma lipoproteins for n=6 in control and Phospholipid diets. TG, triglyceride; FC, free cholesterol; CE: cholesteryl ester, PL, phospholipid; PR, protein.

* : $p < 0.005$

Table 2
Hepatic lipid content from control and phospholipid groups

	Total lipids	TG	TC	FC	CE	PL
	$\mu\text{g}/\text{mg protein}$	$\text{nmol}/\text{mg protein}$				
Control group	227.5 ± 5.1	33.53 ± 1.82	23.1 ± 0.5	11.60 ± 0.80	11.5 ± 0.9	343.9 ± 10.5
Phospholipid group	$169.5 \pm 2.5^*$	$26.49 \pm 2.10^*$	$18.3 \pm 0.7^*$	$8.74 \pm 0.63^*$	9.5 ± 1.1	373.2 ± 7.3

Lipids were extracted from liver homogenates and microsomal fractions and quantified by enzymatic techniques.

Values are means \pm SEM for n=6 / group.

Abbreviations: TG, triglycerides; TC, total cholesterol; FC, free cholesterol; CE, cholesteryl ester; PL, phospholipids

* p < 0.05

Table 3
 Cholesterol and Phospholipid content, cholesterol/phospholipid ratio and fluorescence polarization of microsomes in rats fed control diet and phospholipid diet.

	Cholesterol	Phospholipid	Cholesterol/ Phospholipid ratio	Polarization
	nmol/mgprotein	nmol/mgprotein		
Control diet	43.48 ± 2.45	359.72 ± 31.07	0.127 ± 0.016	3.77 ± 0.11
Phospholipid diet	30.89 ± 3.13*	405.56 ± 17.98	0.077 ± 0.009*	4.14 ± 0.08*

Values are means ± SEM for n=6 per group

* P < 0.05 compared to control diet

Figure 1

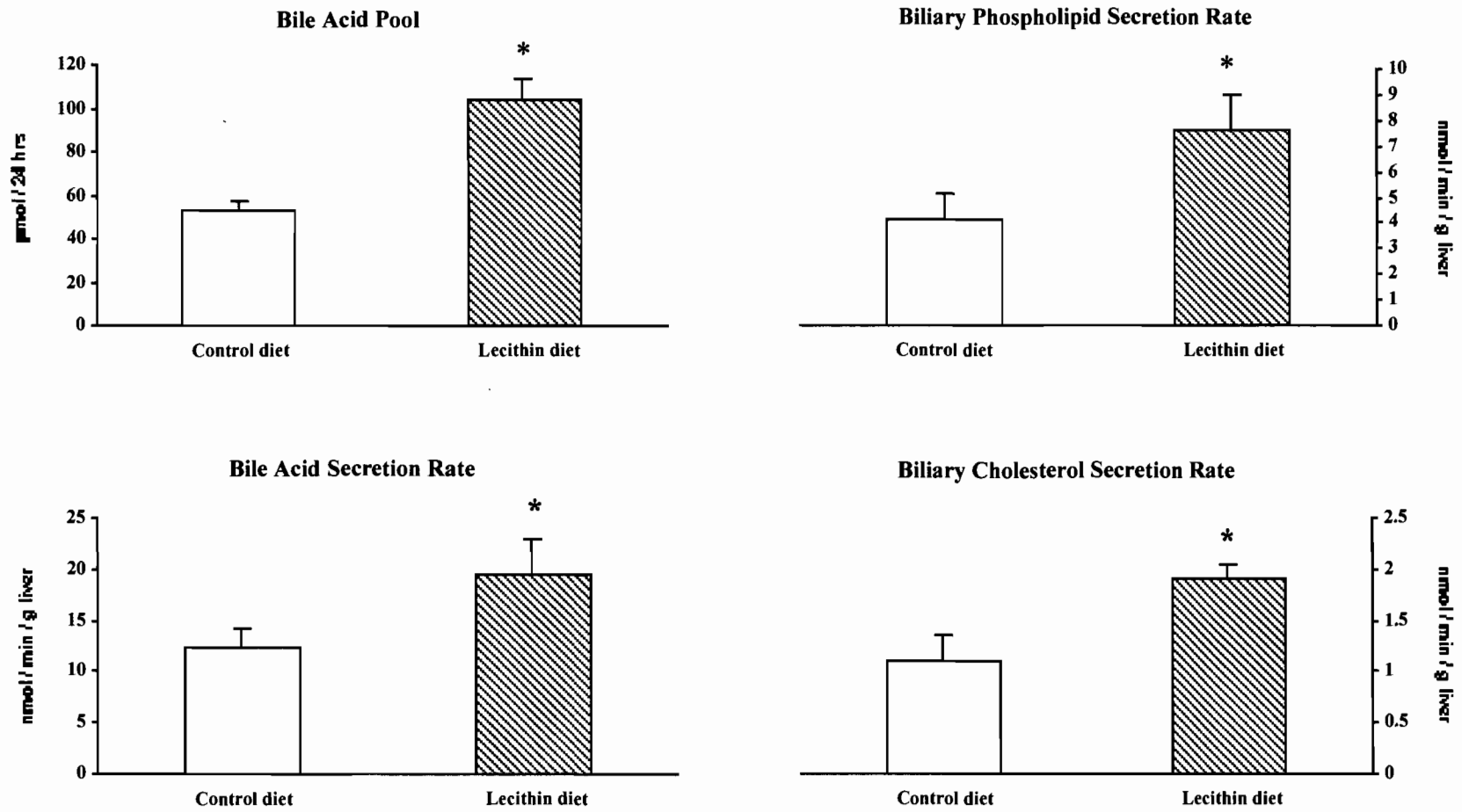


Figure 2

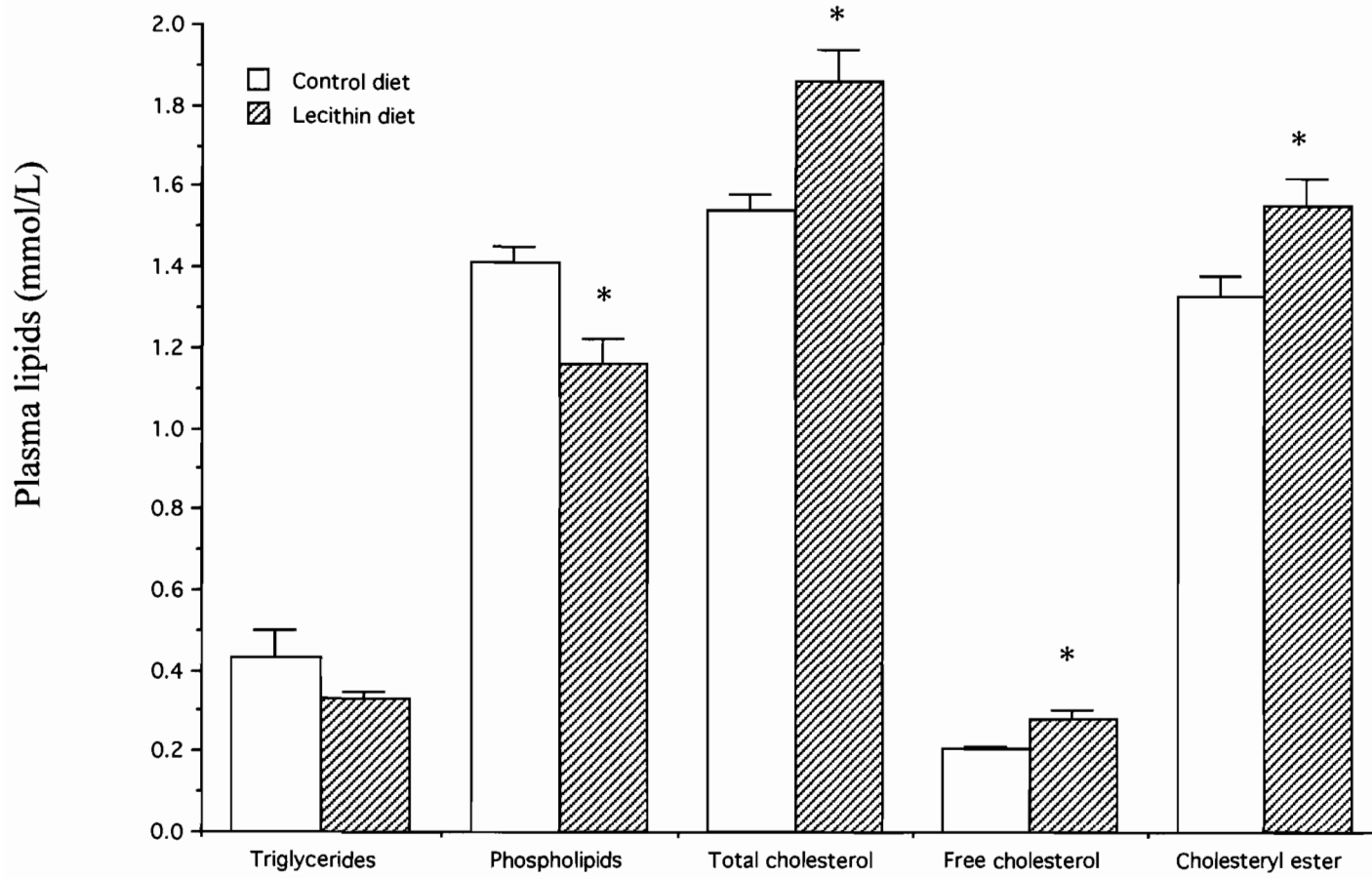


Figure 3

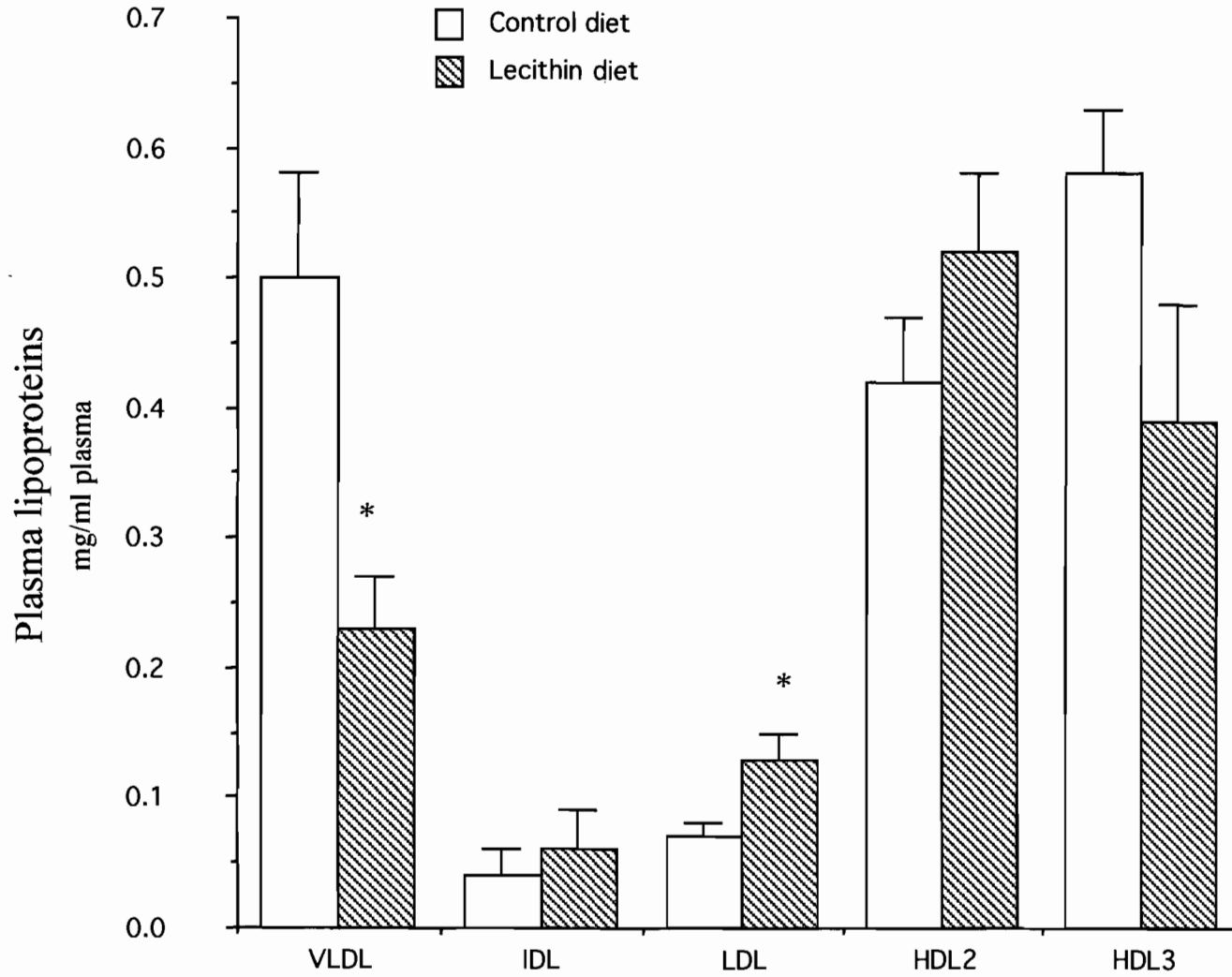
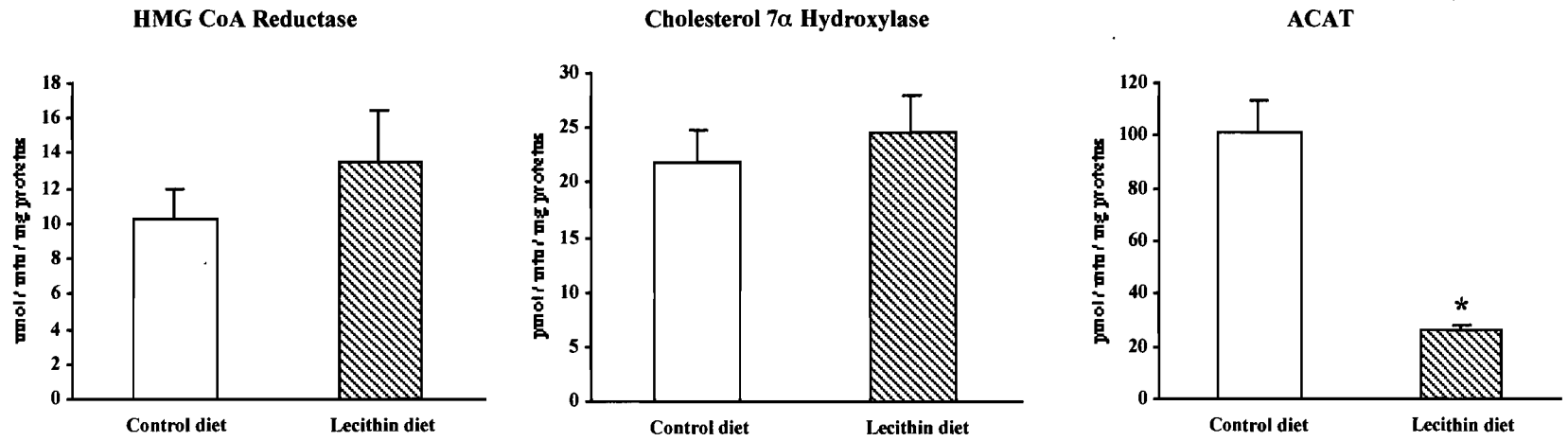


Figure 4



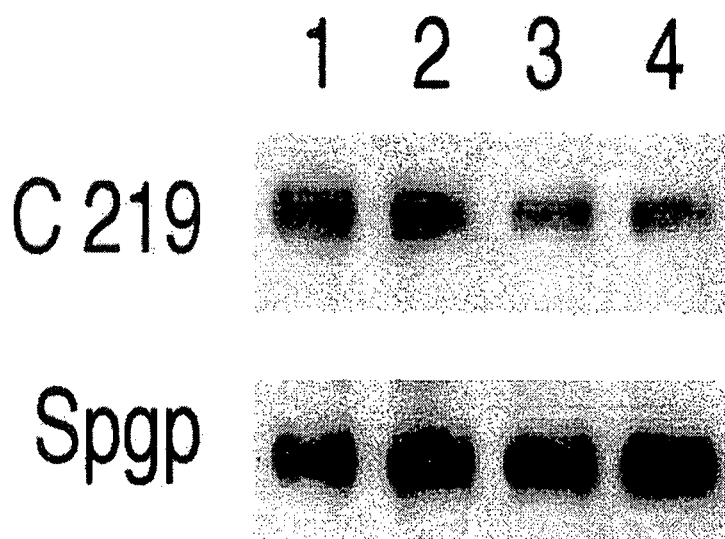


Figure 5.

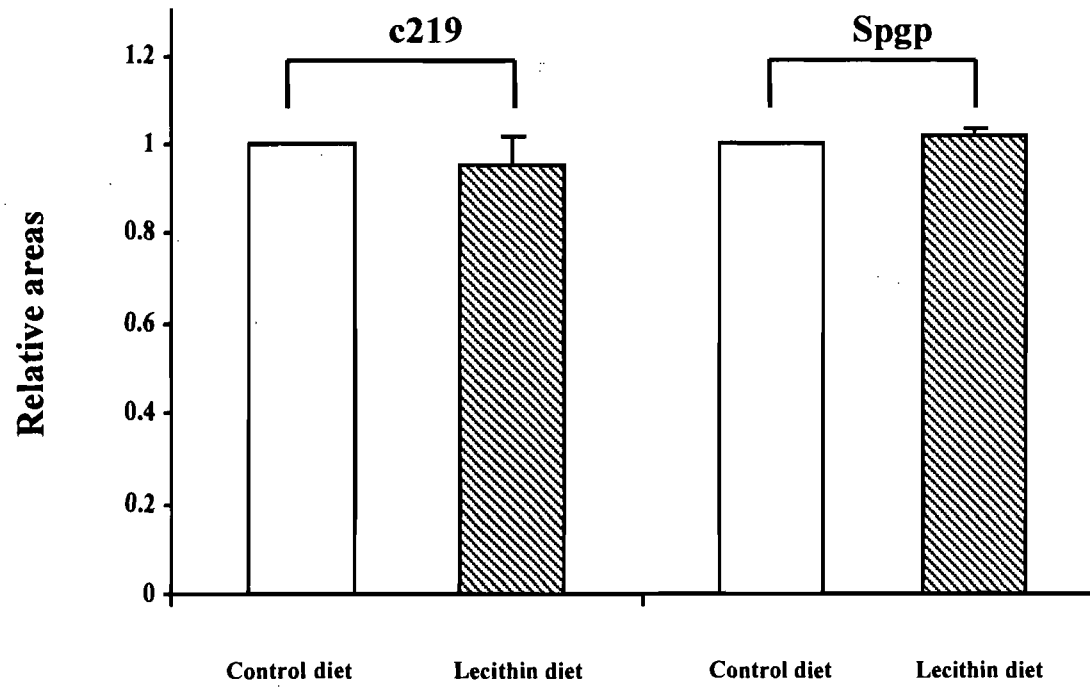
P-gps and spgp protein levels in membranes fractions of control rat liver and lecithin idet rat liver.

Lanes 1 and 2, control; lanes 3 and 4, lecithin group.

Immunoblotting analysis was performed using the primary antibodies C219 and spgp, recognizing all P-gps

And spgp respectively. Each band represents the results of a single animal.

Figure 6



CHAPITRE 4. ARTICLE III

Dietary soybean lecithin offers protection against the impaired bile formation, biliary lipid excretion and vesicular transport induced by taurolithocholic acid in rats

Marie-Josée LeBlanc, Grace Gavino, Victor Gavino, Ibrahim M Yousef,
Emile Lévy, Beatriz Tuchweber

Soumis à Gastroenterology

**DIETARY SOYBEAN LECITHIN OFFERS PROTECTION AGAINST THE
IMPAIRED BILE FORMATION, BILIARY LIPID EXCRETION AND
VESICULAR TRANSPORT INDUCED BY TAUROLITHOCHOLATE IN
RATS**

Short title: Lecithin and bile acid-induced cholestasis in rats.


Marie-Josée LeBlanc¹, Ibrahim M, Yousef^{2,3}, Emile Lévy^{1,3}, and Beatriz Tuchweber^{1,3*}

¹Department of Nutrition, Université de Montréal, Que., Canada,

²Department of Pharmacology, Université de Montréal, Que., Canada

³Unité de recherche en Gastroentérologie-Nutrition, Hôpital Ste-Justine, Que., Canada.

Supported by a grant from the Medical Research Council of Canada

*Correspondence address: Beatriz Tuchweber
Professor
Department of Nutrition
Université de Montréal
C.P. 6128 Succursale Centre-Ville
Montreal, Québec, Canada, H3C3J7
Telephone number: 514 343 639
Fax number: 514 343 7395
E-mail: 

SUMMARY

BACKGROUND /AIMS: Tauro lithocholic acid (TLCA) injection in rats leads to impaired bile formation and biliary lipid secretion which are associated with alteration of the canalicular membrane function and of the transcellular vesicular transport system. Lecithin feeding can stimulate biliary lipid secretion, thus the aim of this study was to evaluate the potential hepatoprotection by lecithin of the bile acid-induced alterations in rat liver.

METHODS: Male adult Sprague-Dawley rats were fed either a control diet or a diet enriched in soybean lecithin for 14 days. On the 15th day, they were given TLCA by i.v. infusion and bile flow, biliary output (phospholipid, cholesterol and bile acid) as well as the biliary secretion of membrane enzymes (alkaline phosphatase, phosphodiesterase 1) were evaluated. The vesicular transport system was also assessed using the biliary excretion of horseradish peroxidase as a marker. Furthermore, hepatic plasma membrane content of p-glycoproteins implicated in lipid transport to bile (P-glycoproteins as detected by the C219 antibody and of spgp or bile acid export pump) was evaluated by Western blotting.

RESULTS: In rats fed control diet, TLCA induced a rapid decrease (about 50%) of bile flow, of total bile acids and of phospholipid secretion in bile. The cholesterol output was decreased by 80%. Lecithin feeding significantly improved bile formation and the cholesterol secretory rate was maintained at baseline values. The lithocholic acid (LCA) secretion was significantly increased after lecithin (62% of bile acid injected was excreted compared to 7% for control group) but the output of LCA-metabolites was similar to that in control group. The increased biliary secretion of membrane enzymes and the impairment of vesicular transport observed after TLCA were prevented by lecithin-enriched diet. The signals detected in the membrane by the C 219 and spgp antibodies were decreased by TLCA when compared to those in the non -bile acid treated rats. Lecithin-rich diet up-regulated the expression of the proteins.

CONCLUSIONS: This study shows that feeding diets enriched in lecithin markedly improves the defect in biliary lipid secretion and vesicular transport induced by TLCA. This protection is associated with enhanced biliary secretion of the toxic bile acid and

may be related to the high output of cholesterol and phospholipid and up-regulation of canalicular membrane proteins involved in lipid transport.

INTRODUCTION

Previous work has shown that lithocholic acid (LCA) and its taurine conjugated form (TLCA) are toxic bile acids which induce when given intravenously, acute biliary dysfunction (intrahepatic cholestasis) (1,2). Biochemical and morphological studies demonstrated that in animals receiving TLCA, the cholesterol content and the incorporation of the bile acid into bile canalicular membranes increase (1). This results in membrane damage and decreased function as well as the release of membrane protein components in bile (3-8). TLCA also inhibits the biliary secretion of both phospholipid and cholesterol which has been attributed to impaired transcellular vesicular pathway, as evaluated by the biliary excretion of horseradish peroxidase, an exogenous protein used as a marker of para-and transcellular biliary access (9).

Over the last decade, many studies have demonstrated the existence of multidrug resistance gene products (MDR3 and *mdr2*), localized at the canalicular membrane of the hepatocyte (10, 11). MDR3 and *mdr2* are members of the P- glycoproteins (P-gp) sub-family and act as a flipase, that flips phosphatidylcholine molecules from the inner to the outer leaflet of the membrane (12). Their involvement in the translocation of phosphatidylcholine across the canalicular membrane became apparent when knock-out mice were developed in which the *mdr2* gene was disrupted (13). Absence of *mdr2* P-gp leads to the complete absence of phospholipid in bile and of significant reduction in cholesterol output. (13). Another member of the P-glycoprotein subfamily is the sister of P-gp (*spgp*), which is the major canalicular bile acid export pump in the liver and functions as a transporter for monovalent bile acids (14,15). Consistent with this are the recent observations in a *spgp* knockout mouse which showed impaired taurocholate secretion in bile (16).

Previous studies from this laboratory have shown that in rats, feeding diets enriched with soybean lecithin increases bile flow, bile acid, phospholipid and biliary cholesterol output (17,18). In addition, lecithin diet resulted in enhancement of the bile acid maximum secretory rate capacity and prevented the cholestatic response seen after infusion of high bile acid load. This beneficial effect was mainly attributed to an increased availability of preformed biliary phospholipid (18,19). At present, it is not known whether the increased biliary bile acid and lipids output is associated with enhanced expression of canalicular proteins involved in lipid and bile acid secretion.

In view of this major hepatoprotective action of dietary lecithin, we tested whether this diet can protect against TLCA-induced toxicity. To this aim we examined bile formation, biliary lipid output, bile acid distribution pattern and the release of membrane canalicular enzymes in bile. We also tested whether lecithin could influence the impairment of vesicular transport-induced by TLCA. In addition, the effect of the lecithin diet on the expression of membrane Pgp, before and after the TLCA infusion was evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Semipurified soybean lecithin, albumin, tauro lithocholic acid sodium salt, horseradish peroxidase and 3-hydroxysteroid dehydrogenase were obtained from Sigma (St-Louis, MO). Sodium salt of [C¹⁴] Taurocholic acid was purchased from NEN Life Sciences Products (Boston, MA). NCS solubilizer was purchased from Amersham (Arlington Heights, IL).

Animals and diets

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, St. Constant, Quebec, Canada) weighing 170-200 g were randomly separated into two groups: a group fed a 16% polyunsaturated triacylglycerol-enriched diet (containing sunflower-seed oil) referred to as control diet or a group fed a 20% semipurified soybean lecithin diet. The detailed diet composition

has been published elsewhere (17). Animals had free access to food and water and were kept a temperature between 21-23°C and in humidity-controlled room (45-50°C) with a constant 12 hour light-dark cycle.

Experimental procedures

After feeding the experimental diets, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (48 mg/kg body weight intraperitoneally). A PE-10 cannula was inserted into the common bile duct, and a PE-50 catheter was inserted into the right internal jugular vein. The body temperature was kept at 37°C with a heating lamp.

In the first series of experiments, the bile was collected on ice for 60 min in 30 min aliquots, followed by the i.v. infusion of 2 ml of 3,5% albumin in 0,45% NaCl solution. The infusion was for 30 min, bile samples being collected on ice every 15 min to assess basal bile formation. This was followed by the infusion of TLCA, which was dissolved in albumin-saline solution and given in doses of 0.05 and 0.1 μmol/min/100g body weight, for a period of 30 min each. Bile samples were collected at selected time intervals and stored for further analysis. Bile flow was determined gravimetrically, assuming a density of 1 g/ml. After the last bile collection, animals were killed by exsanguination and the livers were removed, weighed, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use for isolation of membranes.

In the second series of experiments, the bile duct was also cannulated and rats received albumin and TLCA infusion by the jugular vein, as was the case of the first series. Rats were injected with radioabeled taurocholic acid (TCA) C14 (0.25 μCi) 90 min after the beginning of bile collection, (at the same time that TLCA infusion). Blood and bile samples were collected at time intervals and the livers were removed at the end of the experiment.

In the third series of experiments, rats were infused with TLCA as described in first series. However, the infusion of TLCA was stopped 15 min after the second rate of infusion and horseradish peroxidase (HRP)(0.5 mg/100 g body weight) dissolved in 0.3 ml of 0.9% of NaCL was injected directly into the portal vein. Then, bile was collected during 80 min in fitting-sampling periods.

Liver cell membrane preparation

Liver cell membrane fractions enriched in canalicular complexes were prepared by discontinuous sucrose gradient ultracentrifugation according to procedures developed by our laboratory (20) with the addition of protease inhibitor cocktail. The relative purity of the membrane preparations was assessed by measuring the activities of canalicular markers enzymes (20). The relative specific activities (membrane/homogenate activity) of membrane marker enzymes, and the membrane protein recovery were similar in all groups.

Antibodies

Mouse monoclonal antibody C219 (Signet Laboratories Ind. Dedham, MA) was used to recognize all P-gp since mdr2 antibody was not available. C 219 recognizes mdr2 and the spgp. A rabbit polyclonal antibody against spgp was kindly provided by V.Ling of the British Columbia Cancer Research Center, Vancouver, BC.

Western Blot Analysis

Western blotting was carried out by standard techniques as published (21). The protein concentrations were determined with the Micro BCA protein assay reagent kit from Pierce. The canalicular proteins (15 μ g) (normalized for enrichment in the marker enzyme leucine aminopeptidase) were separated using SDS gel electrophoresis, subsequently blotted onto nitrocellulose membrane and probed with the C219 and spgp antibodies.

Analytical Procedures in Plasma, Liver and Bile

Protein concentrations were determined with the DC Protein Assay (Bio Rad) using bovine serum albumin as standard. Total bile salt was evaluated by using the enzyme 3-hydroxysteroid dehydrogenase (22). The bile acid distribution pattern was assessed by gas liquid chromatography, as previously described (23). Biliary cholesterol was measured by the cholesterol oxidase method using a commercial available kit (Boehringer Mannheim, Montreal, Canada). Phospholipids were quantified by the Bartlett technique after digestion in perchloric acid (24). Total radioactivity in bile,

plasma and liver homogenates was assessed by the addition of NCS solubilizer, followed by 15 ml of liquid scintillation cocktail. Horseradish peroxidase in bile samples was determined spectrophotometrically by measuring the rate of oxidation of 4-aminoantipyrine at 510nm (25). Alkaline phosphodiesterase-1 (PDE-1) activity in bile was assessed by the Brightwell and Tappel technique (26) and Alkaline phosphatase activity was measured according to the method of the "Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology" (27).

Statistical analysis

Data between groups were assessed by ANOVA for biliary secretion of HRP. Values between groups were compared using student's t-test. The results were expressed as mean values \pm SE and *p* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

RESULTS

Effects of lecithin feeding on bile flow, biliary lipid secretion and bile acid composition.

Bile formation and biliary lipid secretion

Figure 1 and 2 show the effect of infusion of TLCA on bile flow and total biliary bile acid, phospholipid and cholesterol secretion rates in both control and lecithin fed groups. Values for basal group (prior to TLCA injection) are not shown but confirmed previous results obtained under the same experimental conditions (18). Briefly, the output in bile of total bile acids, phospholipid and cholesterol increased by 160%, 140%, and 205% respectively in the experimental group compared to values in the control group.

After administration of TLCA to control group rats, bile flow declined progressively after 30 minutes and at 60 minutes, the flow was reduced by 57% compared to basal values. By contrast, in lecithin group, the flow was maintained during the first 45 minutes and at the end of the infusion, it was reduced by 24% and it was significantly different from that in controls. Total bile acid secretion was also reduced after TLCA but to a lesser extent than the bile flow. Biliary bile acid output was significantly higher

in rats fed lecithin than in rats fed control diet. Phospholipid and cholesterol secretion rates decreased significantly in animals fed control diet. However, feeding lecithin diet resulted in a slight decrease of phospholipid secretion (30 %) and the cholesterol biliary output remained unchanged after TLCA.

Biliary Bile acid composition

Analysis of bile acid composition was carried out to determine whether lecithin-rich diet would influence the secretion of LCA and of the more hydrophilic derivatives. Table 1 shows the actual secretory rates of different bile acids in animals injected with TLCA or with albumin in saline, the bile acid solvent. As expected, during albumin infusion, cholic acid and muricholic acids were the main bile acids secreted in bile. In the lecithin group, output of all bile acids increased, however, the increases for deoxycholic acid were greater than for the other bile acids. After the infusion of TLCA, a significant amount of LCA was secreted in bile, as showed in table 2. The output was greater in the lecithin fed rats than in controls, particularly after the second period of infusion of the toxic bile acid. Rats in lecithin group excreted about 62% of the injected bile acid while rats in control group only excreted 7% of the TLCA infused. The excretion of hyodeoxycholic acid, a metabolite of TLCA, was increased in all groups, but to a higher extent after lecithin feeding. It is of interest that in group fed lecithin, the cholic acid secretion rate in rats injected with TLCA was significantly higher than in groups given the bile acid solvent. Thus, we conducted a study with labeled TCA to examine the bile acid kinetics in both TLCA and solvent treated rats.

Labeled taurocholic acid kinetics

Figure 3 shows the recovered radioactivity 60 minutes after a pulse injection of labeled TCA in rats infused with TLCA. Most of the radioactivity was secreted in bile and the cumulative secretion in the lecithin group was significantly higher than in the control group. The radioactivity in liver was lower in lecithin group but differences did not prove to be statistically significantly different. Blood radioactivity at the end of infusion was similar in both groups. Figure 4 illustrates that the blood decay of radiolabeled TCA was faster in the lecithin group mainly in the first 10 minutes after the injection.

Output of biliary plasma membrane enzymes

Figure 5 illustrates the effect of infusion of TLCA on output of alkaline phosphatase and phosphodiesterase-1 when compared with enzyme output in basal conditions (before TLCA). In group fed control diet, a transient but not statistically significant increase in alkaline phosphatase excretion was noted after infusion of the toxic bile acid, which was followed by a significant decrease. By contrast in lecithin fed group the enzyme output was not affected. Phosphodiesterase-1 excretion in bile rose markedly in the control group during the first period of TLCA infusion and lecithin feeding completely abolished such increase. Table 3 shows the relationship between enzyme and bile acid secretion (total bile acids and LCA in groups infused with TLCA). In basal period and after TLCA, alkaline phosphatase excretion per nanomole of total bile acid was virtually similar in control and lecithin fed groups. On the other hand, enzyme output per nmole LCA secreted increased after TLCA and this was significantly inhibited by lecithin feeding. The phosphodiesterase-1 excretion was increased significantly whether expressed per total bile acid or per LCA secreted.

Excretion of HRP in bile

The biliary excretion of HRP during basal period and after TLCA infusion is illustrated in figure 6. The biliary secretion of HRP in lecithin group was similar to that of control group during the basal period. After TLCA infusion, the secretion of biliary HRP was decreased significantly in control group (55%) compared with the period without TLCA infusion. By contrast, HRP excretion was maintained in lecithin fed group. Also, in rats fed lecithin-enriched diet, the secretion of HRP was significantly higher than in control group. The significant changes were observed within 30-35 minutes, corresponding to the second peak of biliary HRP excretion which represent the transcellular vesicular transport of biliary HRP (9).

P-glycoproteins in canalicular membranes

The levels of P-glycoproteins in canalicular membranes is illustrated in a representative Western blot in Figure 7. Prior to TLCA injection, the protein expression of C219 and

spgp did not seem to be altered by lecithin-feeding. However, after TLCA treatment there was a decrease of protein expression in membranes of rats fed control diet. Lecithin seems to up-regulate expression of C219.

DISCUSSION

The present study aimed to investigate the possible protection by dietary soybean lecithin of TLCA-induced cholestasis and whether the diet could influence vesicular transport and membrane integrity. Results indicate that rats fed lecithin-rich diet were protected against TLCA-induced cholestasis.

It is well established that after the infusion of TLCA in rats, its accumulation in the liver activates biotransformation such as hydroxylation of LCA to less toxic bile acids producing chenodeoxycholic acid, hyodeoxycholic acid and a series of muricholic acids. Hydroxylation seems to play a major role in the recovery or in the prevention of TLCA induced cholestasis (28). Under the present conditions, an increase secretion of hyodeoxycholic acid was noted (Table 1), but it only contributed for 11 and 4% of total bile acid in control and lecithin diet respectively. Secretion of both muricholic acid and chenodeoxycholic acid, two principal LCA-metabolites, was not significantly increased in either diet groups. As expected, LCA was secreted in significant amounts by 30 minutes after TLCA and, during the last period of infusion, 72 % of injected LCA was excreted in bile in group fed the lecithin diet compared to less than 10% for rats fed control diet. Thus, the hydroxylation of TLCA to less toxic bile acids does not seem to play a significant role in the prevention by lecithin of LCA-induced cholestasis. Rather, these results indicate that in the lecithin-fed rats the hepatocyte has a better capacity to excrete the toxic bile acid which could be mediated by enhanced cellular transport and secretion through the canalicular membrane and/or release into the canalicular lumen. Interestingly, in lecithin-fed rats not only LCA excretion increased, but also that of cholic acid, the main endogenous bile acid. The study with labeled cholic acid injected with TLCA showed that less radioactivity was recovered in blood and more in bile of rats fed lecithin diet compared with control diet. Previous work

suggested that dietary lecithin may stimulate uptake of high density lipoproteins (HDL) by the liver (29). Since bile acids are transported in blood bound to albumin and also to HDL, it may be that uptake of bile acid bound to HDL could be achieved more rapidly by the liver in rats fed lecithin, and then directed for excretion in bile.

Many recent studies have examined transporters functions at both the sinusoidal and canalicular sites of the hepatocyte during intra and extrahepatic cholestasis (31,31) but no study has been carried out specifically with TLCA. The present study is of interest since many of the changes with the various cholestatic models are likely modulated by the effects of bile acids which accumulate in the hepatocyte. The canalicular secretion of monovalent bile acids is mediated by spgp or bile salt export pump and in TLCA cholestasis the expression of the protein was decreased in parallel with lower endogenous and exogenous bile acid secretion. Also, C219 reactivity was decreased which suggests that not only spgp but the mdr2 transporter may be down-regulated and account partly for the lower lipid secretion. Lecithin-treated rats expressed C219 and spgp proteins at levels comparable to those of controls and this was associated with increased bile formation and lipid excretion in bile. Thus, it may be suggested that transporters down-regulation mediates part of the TLCA-induced cholestasis. The mechanism by which TLCA affects the proteins expression is not known but may be attributed to direct effect at the membrane level where the toxic bile acid accumulates or at an intracellular site of protein transferring to the membrane. The current study examined C219 and spgp expression but it is possible that TLCA affects function of other canalicular and sinusoidal transporters. Recent work demonstrated that Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide (ntcp) expressed in the sinusoidal membrane and Mrp2 protein, expressed in the canalicular site, are down-regulated in different models of cholestasis (32,33).

As shown in the present study and in agreement with previous work (18) TLCA decreased phospholipid and cholesterol secretion in bile while lecithin feeding maintained lipid secretion at high levels. It is of interest that the secretion of cholesterol was particularly increased during the infusion of TLCA. Since high LCA excretion also occurred in parallel to cholesterol it is possible that the toxic bile acid is incorporated

into cellular structures transferring cholesterol to the bile, thus diminishing the potential LCA cellular toxicity.

It is clearly established that cholesterol and phospholipids destined for biliary excretion are transported from the smooth endoplasmic reticulum to the canalicular membrane by a microtubule-dependent vesicular mechanism (34,35). This pathway can be modulated by bile acids, dependently of size and composition of bile salt pool (36). Marinelli et al (9) demonstrated that TLCA inhibited the transcellular vesicular pathway, corresponding to the transcytotic way to the exogenous protein HRP entry into bile. Our results also showed a decrease of biliary output of HRP in control group during TLCA infusion, particularly during the second peak of HRP secretion. Dietary lecithin maintained biliary secretion of HRP at a level comparable to that of basal period suggesting that an improvement of vesicular transport system may explain, at least partially, the high biliary phospholipid and cholesterol secretion levels during the TLCA infusion. The transcellular transport of organic anions, including bile salts, is thought to include both the binding to small cytosolic binding proteins and a vesicle-mediated processes, the latter particularly during high substrate loads (37,38). Under our experimental conditions, about 12,5 umoles of TLCA were infused during the 60 minutes of bile acid infusion and about 70 % of this amount was excreted in lecithin group compared to less than 10 % in control group. Thus, we suggest that dietary lecithin could enhance biliary excretion of LCA via an improved vesicular transport system.

LCA is a very hydrophobic bile acid which accounted for almost half of the excreted bile acid at the end of the TLCA infusion and has an important solubilizing effect on membranes. The ratio of enzyme/LCA secretory rate as expressed by ALP and PDE-1 excretion per nanomole of LCA showed a decrease of 77% in lecithin group compared to control. These results indicated that, despite the increase in secretory rate of bile acids, the canalicular membrane enzymes in rats fed lecithin diet were not solubilized by TLCA. It has been proposed that biliary cholesterol and phospholipids are primarily secreted in unilamellar lipid complexes into the canalicular lumen (39,40) and this may

represent a protective barrier of cell surfaces in different tissues. Puglielli et al (41) observed that native biliary lamellar material reduced bile acid-induced cell damage. Interestingly, diets enriched in diosgenin (a plant sterol) which increase the biliary cholesterol secretion (42) without significantly affecting bile acid output, can offer protection against TLCA- induced cholestasis. In our study, the high biliary cholesterol and phospholipids secretion rate in rats fed lecithin rich diet may be associated with the presence of unilamellar and multilamellar vesicles which could protect hepatocytes and bile canalicular membranes against TLCA-induced damage. But, additional investigations to directly visualize such structures in fresh bile are needed to confirm such hypothesis.

In summary, dietary lecithin can protect against TLCA-induced cholestasis primarily by enhancing secretion of the toxic bile acid. We suggest that the capacity of dietary lecithin to stimulate lipid, particularly cholesterol biliary secretion could be related to the decreased accumulation of TLCA in liver and its higher output in bile. Since, vesicular transport is enhanced in TLCA-treated rats fed the lecithin diet, it could be hypothesized that TLCA is directed to the bile via its incorporation in cholesterol rich vesicles.

ACKNOWLEDGMENT

These studies were supported by grants from the Medical Research Council of Canada. The authors thank Maurice Audet and Grace Gavino for valuable technical assistance.

REFERENCES

1. Yousef I.M, Bouchard G, Tuchweber B, Plaa G.L. Mechanisms involved in bile acid-induced cholestasis. *Drug Metabolism Reviews* 997;29:167-181.
2. Roy CC, Tuchweber B, Weber AM, Yousef IM. Update on bile formation and on mechanism of bile acid-induced cholestasis. In: Shaffer E, Thompson AA, eds. *Advances in Gastroenterology*. Plenum Press, New York, 1989: 41-67.
3. Yousef I.M, Lewittes M, Tuchweber B, Roy CC, Weber A. Lithocholic acid-cholesterol interactions in rat liver plasma membrane fractions. *Biochim Biophys Acta* 1984;796:345-353.
4. Accatino L, Figueroa C, Pizarro M, Solis N. Enhanced biliary excretion of canalicular membrane enzymes in estrogen-induced and obstructive cholestasis, and effects of different bile acids in the isolated perfused rat liver. *J. Hepatol.* 1995;22:658-670.
5. Accatino L, Pizarro M, Solis N, Figueroa C. Cholestasis is associated with a marked increase of bile acid-mediated release of canalicular membrane enzymes into bile. *Gastroenterology* 1994;106:855A.
6. Arrese M, Pizarro M, Solis N, Koenig C, Accatino L. Enhanced biliary excretion of canalicular membrane enzymes in ethynylestradiol-induced cholestasis: effects of ursodeoxycholic acid administration. *Biochem. Pharmacol.* 1995;50(8):1223-1232.
7. Barnwell SG, Godfrey PP, Lowe PJ, Coleman R. Biliary protein output by isolated rat livers. *Biochem. J.* 1983;210:549-554.
8. Barnwell SG, Lowe PJ, 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.
9. Marinelli R.A, Roma M.G, Pelligrino J.M, Rodrigue'z Garay E.A. Tauroolithocholate-induced inhibition of biliary lipid and protein excretion in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1992;1125:44-48.
10. Silverman JA, Schrenk D. Expression of the multidrug resistance genes in the liver. *FASEB J* 1997;11:308-313.
11. Meijer DFK, Smit JW, Muller M. Hepatobiliary elimination of cationic drugs: the role of P-glycoprotein and other ATP-dependent transporters. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;25:159-200.

12. Oude Elferink RPJ, Ottenhoff R, van Wijland MJ, Smit JJM, Schinkel AH, Groen AK. Regulation of biliary lipid secretion by mdr2 P-glycoprotein in the mouse. *J Clin Invest* 1995;95:31-38.
13. Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CAAM, Ottenhoff R, van der Lugt NMT, van Roon MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993;75:451-462.
14. Childs S, Yeh RL, Georges E, Ling V. Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer Res.* 1995;55:2029-2034.
15. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J. Biol. Chem.* 1998;273:10046-10050.
16. Gerloff T, Stiegler B, Hagenbuch B, Landmann L Meier PJ. The sister P-glycoprotein of rat liver mediates ATP-dependent taurocholate transport. *Hepatology* 26:358A, 1997
17. Rioux F, Perea A, Yousef I.M, Levy E, Malli L, Carrillo M, Tuchweber B. Short term feeding of diet enriched in phospholipids increase bile formation and bile acid transport maximum in rats. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1214:193-202.
18. LeBlanc M.J. Gavino V, Perea A, Yousef IM, Levy E, Tuchweber B. The role of dietary choline in the beneficial effects of lecithin on the secretion of biliary lipids in rats. *Biochim Biophys Acta* 1998;1393:223-234.
19. Barnwell SG, Tuchweber B, Yousef IM. Biliary lipid secretion in the rat during infusion of increasing doses of unconjugated bile acids. *Biochem. Biophys. Acta.* 922:221-233, 1987.
20. Yousef IM, Barnwell SG, Gratton F, and Tuchweber B. *Am J Physiol* 1987;252:
21. Hooiveld GJEJ, Vos TA, Scheffer GL, van Goor H, Koning H, Bloks V, Loot AE, Meijer DKF, Jansen PLM, Kuipers F, Muller M. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) induce hepatic expression of the phospholipid translocase mdr2 in rats. *Gastroenterology* 1999;117:678-687.
22. Talalay, P. Enzymatic analysis of steroid hormones. *Methods Biochem. Anal.* 1960;8:119-143

23. Yousef I.M, Fisher M.M, Myher J.J. Superior gas-liquid chromatography of methyl cholanoate acetate on cyanopropylphenylsiloxane liquid phases. *Anal. Biochem* 1976;75:538-544.
24. Bartlett GR, Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 1959;234:466-468.
25. Worthington Biochemical corporation. Enzymes and related biochemicals. In: Worthington NJ. Worthington manual, eds. Biochemical Life Sciences Division. 1978:145-146.
26. Brightwell R, Tappel AL. Subcellular distributions and properties of rat liver phosphodiesterases. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968;124:325- 332.
27. Committee on Enzymes of the Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology, 1974.
28. Alvaro D, Angelico M, Cantafora A, Di Base A, De Santis A Bracci F, Minervini G, Ginanni Corradini S, Attili AF and Copacaccia L. 1986 *Biochem. Med. Meta. Biol.* 36:125-135.
29. Polichetti E, Diaconescu N, Malli L, Portugal H, Pauli AM, Tuchweber B, Yousef IM, Chanussot F. Cholesterol-lowering effect of soyabean lecithin in normalipidaemic rats by stimulation of biliary lipid secretion. *Brit. J. Nut.* 1996;75:471-481.
30. Moseley RH, Wang W, Takeda H, Lown K, Shick L, Ananthanarayanan M, Suchy FJ. Effect of endotoxin on bile acid transport in rat liver: a potential model for sepsis-associated cholestasis. *Am J Physiol* 1996;271:G137-G146.
31. Vos TA, Hooiveld GJEJ, Koning H, Childs S, Meijer DKF, Moshage H, Jansen PLM, Müller M. Up-regulation of the multidrug resistance genes, *mrp1* and *mdr1b*, and down-regulation of the organic anion transporter, *mrp2*, and the bile salt transporter, *spgp*, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 1998;28:1637-1644.
32. Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman M. Schuele S. Nundy S, Soroka CL. Stolz A. Suchy FJ. Boyer JL. Down regulation of expression and function of the rat liver NA^+ -bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1996;110:190-210.
33. Trauner M, Arrese M, Soroka CJ, Ananthanarayanan M, Koeppl TA, Schlosser SF, Suchy FJ, Keppler D and Boyer JL. The rat canalicular conjugate export pump (*Mrp2*) is down regulated in intrahepatic and obstructive cholestasis *Gastroenterology* 1997;113:255-264.

34. Marzolo M.P, Rigotti A, Nervi F. Secretion of biliary lipids from the hepatocyte. *Hepatology* 1990;12:134S-142S.
35. Barnwell S.G, Lowe P.J, Coleman R. The effects of colchicine on secretion into bile of bile salts, phospholipids, cholesterol and plasma membrane enzymes: bile salts are secreted unaccompanied by phospholipids and cholesterol. *Biochem. J.* 1984;220:723-731.
36. Bilhartz LE, Dietschy M. Bile salt hydrophobicity influences cholesterol recruitment from rat liver in vivo when cholesterol synthesis and lipoprotein uptake are constant. *Gastroenterology* 1988;95:771-779.
37. Crawford JM., Berken CA., Gollan JL., Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of bile salts and biliary lipid : implication for intracellular vesicular transport *J lip Res.* 1988;29:144-156.
38. Crawford JM., Strahs DCJ., Crawford AR., Barnes S. Role of bile acid hydrophobicity in the secretion of microtubule dependent bile salt secretion *J Lip. Res* 1994;35:1738-1748.
39. Coleman R, Rahman K. Lipid flow in bile formation. *Biochim Biophys Acta* 1992;1125:113-133.
40. Schmitz G, Muller G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J. Lip. Res.* 1991;32:1539-1570.
41. Puglielli L, Amigo L, Arrese M, Nunez L, Rigotti A, Garrido J, Gonzalez S, Mingrone G, Greco SV, Accatino L, Nervi F. Protective role of biliary cholesterol and phospholipid lamellae against bile acid-induced cell damage. *Gastroenterology* 1994;107:244-254.
42. Thewles A, Parslow RA, Coleman R. Effect of diosgenin on biliary cholesterol transport in the rat. *Biochem J.* 1993;291:793-798.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.

Effect of lecithin diet on bile flow and bile acid secretion rate during the infusion of TLCA. Values are means \pm SEM of 7-9 rats per group. Bile was collected for 90 min to deplete bile acid pool. The results are expressed as a percentage of basal value.

^a : $P < 0.05$ when compared to basal value

^b : $P < 0.05$ when compared to control group.

Figure 2.

Effect of lecithin diet on phospholipid and cholesterol secretion rate during the infusion of TLCA. Values are means \pm SEM of 7-9 rats per group. Bile was collected for 90 min to deplete bile acid pool. The results are expressed as a percentage of basal value.

^a : $P < 0.05$ when compared to basal value

^b : $P < 0.05$ when compared to control group.

Figure 3.

Distribution of injected radio labeled materials in blood, liver and bile after 60 min of TLCA infusion.

The data are the means \pm SEM of 10 animals per group.

* : $P < 0.05$ when compared to control group.

Figure 4

Time course of disappearance of TCA C-14 from blood during the TLCA infusion.

Values represent the mean \pm SD of 6 animals per group.

Figure 5.

Biliary secretion of alkaline phosphatase (ALP) and phosphodiesterase-1 (PDE-1) during the infusion of TLCA.

The results are expressed as a percentage of basal value.

Values represent the mean \pm SEM.

a : $P < 0.05$ when compared to basal value

b : $P < 0.05$ when compared to control group.

Figure 6.

Biliary output of HRP after an intraportal vein injection (0.5 mg/100 g body weight) in rats infused with TLCA or TLCA carrier (albumin). Values represent the mean \pm SEM of 3-4 animals per group.

a : $P < 0.05$ when compared to basal period.

b : $P < 0.05$ when compared to control group.

Figure 7.

Western blot analysis of spgp (bile salt export pump) and all p glycoproteins levels using a polyclonal antibody against spgp and the mouse monoclonal C219 antibody respectively. Lanes 1-4 represent blots of membranes from rats not receiving tauroolithocholate and fed control diet (lanes 1 and 2) or diets enriched in phospholipid (lanes 3 and 4). Lanes 5-8 represent blots from animals treated with tauroolithocholate and fed control diet (lanes 5 and 6) or lecithin rich- diet (lanes 7 and 8)

Table 1
Biliary secretion of bile acids after infusion of TLCA

Bile Acid Secretion rate	During albumin infusion			
	0-30 minutes		30-60 minutes	
	Control diet	Lecithin diet nmol/min/	Control diet	Lecithin diet
			100 g body weight	
Lithocholic acid	0.3 ± 0.2	1.7 ± 1.6	0.1 ± 0.1	2.4 ± 0.5 ^b
Chenodeoxycholic acid	1.7 ± 0.8	5.8 ± 3.0	0.7 ± 0.1	2.8 ± 1.8
Deoxycholic acid	1.9 ± 0.7	13.4 ± 7.0	4.6 ± 2.0	18.3 ± 6.7
Cholic acid	16.5 ± 7.8	31.5 ± 10.3	7.5 ± 1.6	17.4 ± 6.0
Urso & hyodeoxycholic acid	ND	ND	ND	ND
α-Muricholic acid	4.8 ± 1.8	9.8 ± 4.0	4.9 ± 0.6	4.6 ± 0.9
β-muricholic acid	6.0 ± 0.1	8.4 ± 4.0	1.4 ± 0.1	2.3 ± 1.0
	During TLCA infusion			
	0-30 minutes		30-60 minutes	
	Control diet	Lecithin diet nmol/min/	Control diet	Lecithin diet
			100g body weight	
Lithocholic acid	22.8 ± 3.6 ^a	34.6 ± 4.5 ^a	6.9 ± 0.4 ^a	52.1 ± 12.6 ^a
Chenodeoxycholic acid	2.7 ± 0.9	12.3 ± 2.8 ^b	0.7 ± 0.3	5.3 ± 0.9 ^b
Deoxycholic acid	1.0 ± 0.3	7.3 ± 2.0 ^b	1.8 ± 1.3	6.9 ± 1.9 ^b
Cholic acid	17.8 ± 1.2	49.9 ± 9.1 ^b	3.1 ± 0.6	38.2 ± 9.5 ^{ab}
Urso & hyodeoxycholic acid	5.1 ± 1.2 ^a	8.7 ± 3.6 ^a	2.3 ± 0.6 ^a	8.6 ± 1.6 ^{ab}
α-Muricholic acid	4.1 ± 2.3	7.9 ± 2.7	1.5 ± 0.9	3.8 ± 0.9
β-muricholic acid	2.1 ± 2.0 ^a	9.8 ± 3.3 ^b	3.1 ± 1.2	4.4 ± 0.7

Results are means ± SEM from four animals per group. TLCA infusion between 0-30 min refers to a infusion of 0.05 µmol/min/100 g body weight of TLCA while 30-60 min refers to a infusion of 0.1 µmol/min/100 g body weight of TLCA. Albumin infusion refers to basal period. ND; not detectable.

^a $P < 0.05$ compared to albumin infusion for the same diet

^b $P < 0.05$ compared to control diet at the same period

Table 2
 Percentage of LCA excreted in bile
 following the infusion of TLCA

period	Control diet	Lecithin diet
During the first TLCA infusion dose	45.61 ± 7.17	71.84 ± 11.50
During the 2nd TLCA infusion dose	6.88 ± 0.44	61.53 ± 10.71 a

first dose: 0.05 µmol of TLCA, second dose: 0.1 µmol of TLCA

TLCA; taurolithocholic acid, LCA; lithocholic acid

a: P < 0.05 compared to Control diet

Table 3
Relationship between biliary secretory rates of canalicular enzymes and LCA secretory rates in control and lecithin enriched diets at basal period and during TLCA infusion.

Parameter	30 minutes after TLCA infusion		60 minutes after TLCA infusion	
	Control diet	Lecithin diet	Control diet	Lecithin diet
ALT/LCA secretory rate UI/nmolbile acid	1.14±0.43	1.25±0.24	2.39±0.45	0.55±0.07 ^{ab}
PDE/LCA secretory rate nmol/nmol bile acid	0.43±0.03	0.67±0.29	1.41±0.28 ^b	0.33±0.11 ^a

Values are means ± SE; n=4-8 animals per group. ALP; alkaline phosphatase, PDE1; phosphodiesterase 1, TLCA; tauro lithocholic acid, LCA; lithocholic acid.

a $P < 0.05$ compared to the control group

b $P < 0.05$ compared to second period, for the same group.

Figure 1 : Effect of lecithin diet on bile flow and bile acid secretion rate during the infusion of TLCA

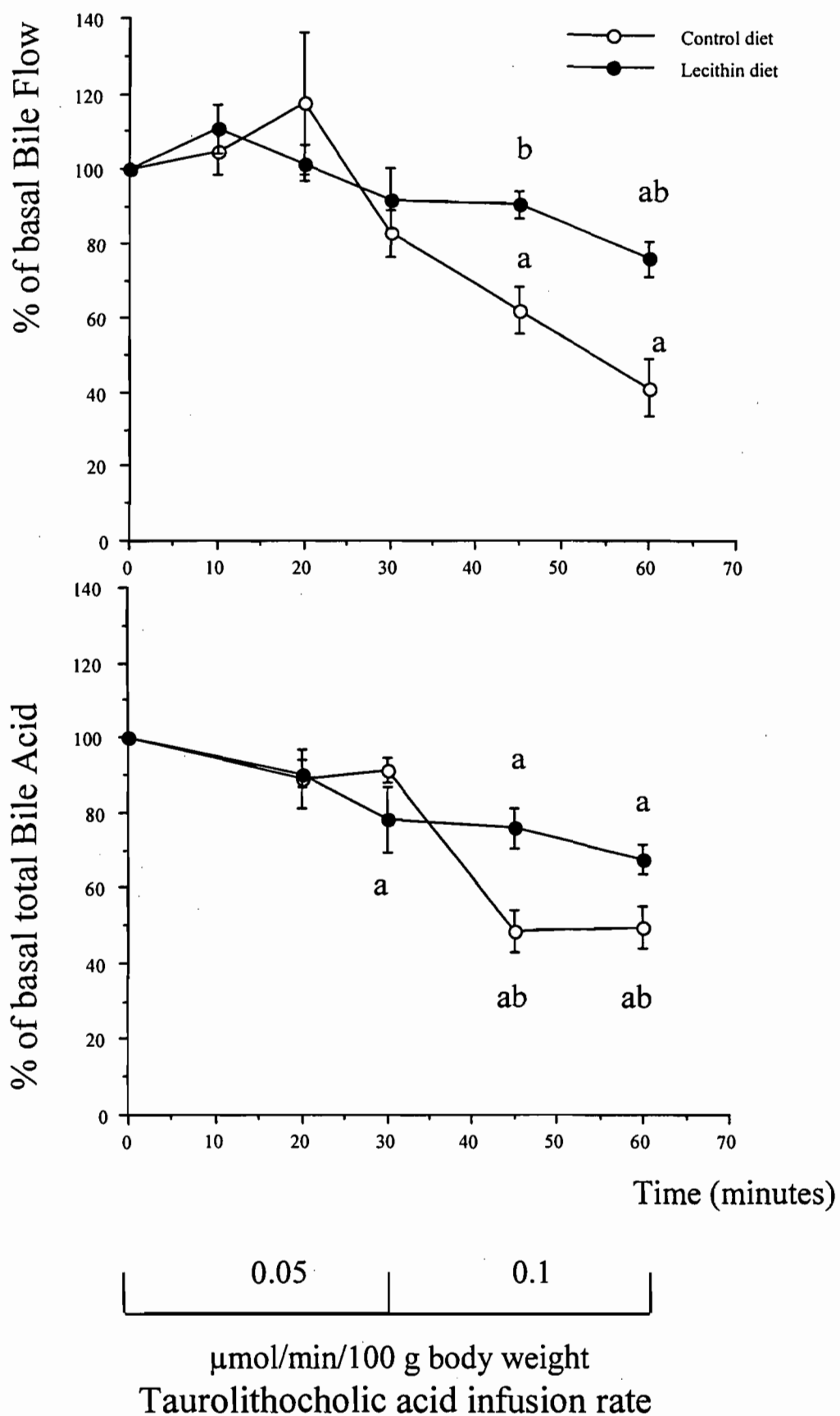


Figure 2: Effect of lecithin diet on phospholipid and cholesterol secretion rate during the infusion of TLCA

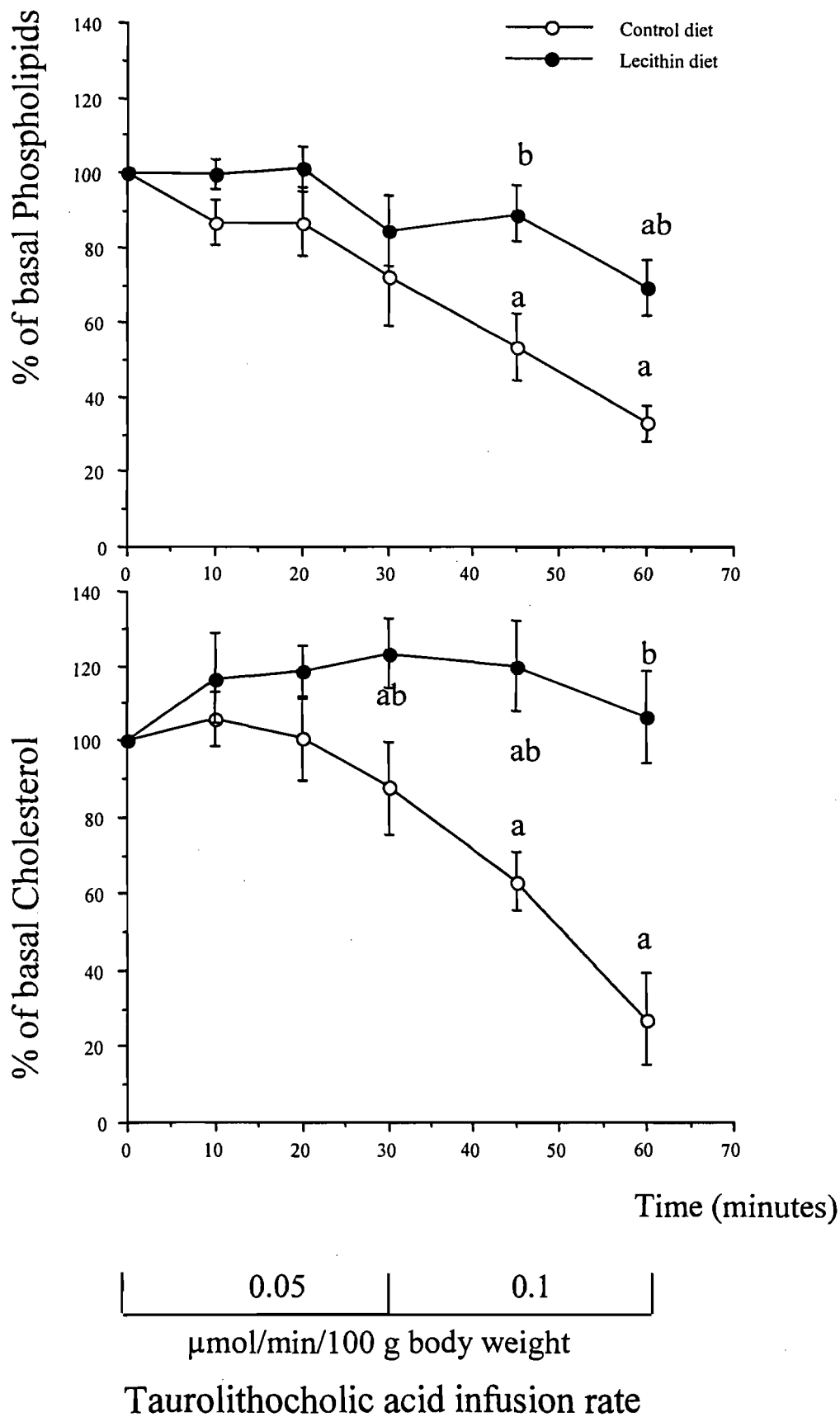
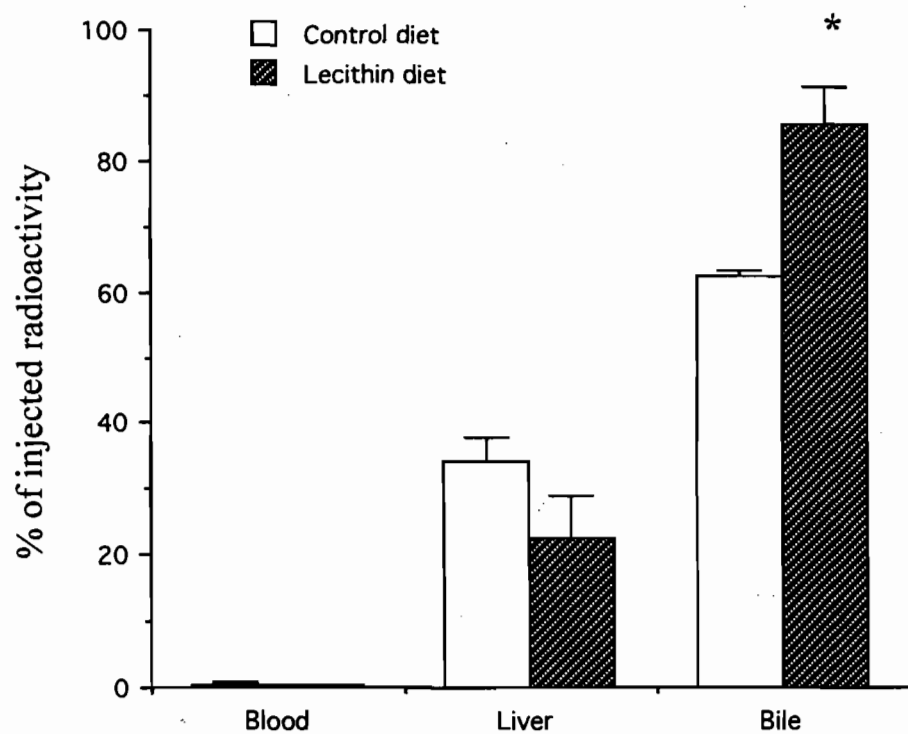


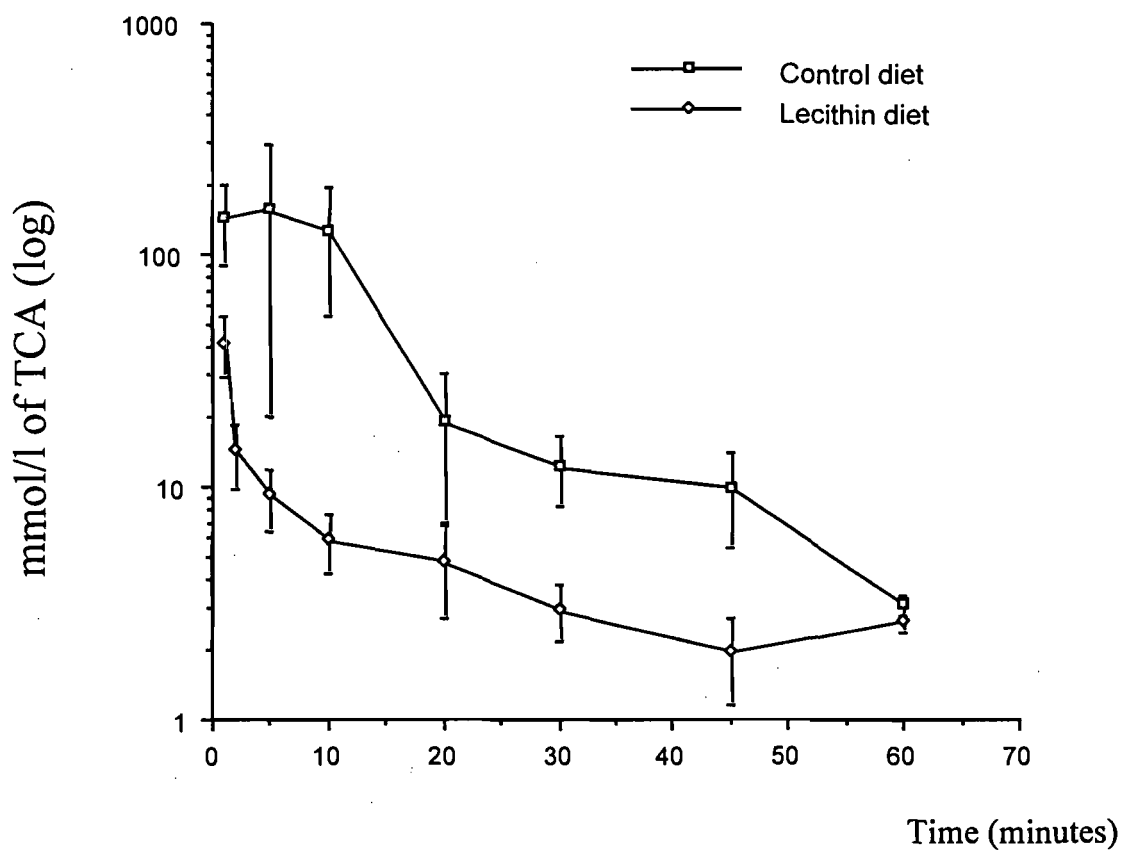
Figure 3: Distribution of injected radio labeled materials derived from TCA in blood, liver and bile



The data are the means \pm SEM of 10 animals per group.

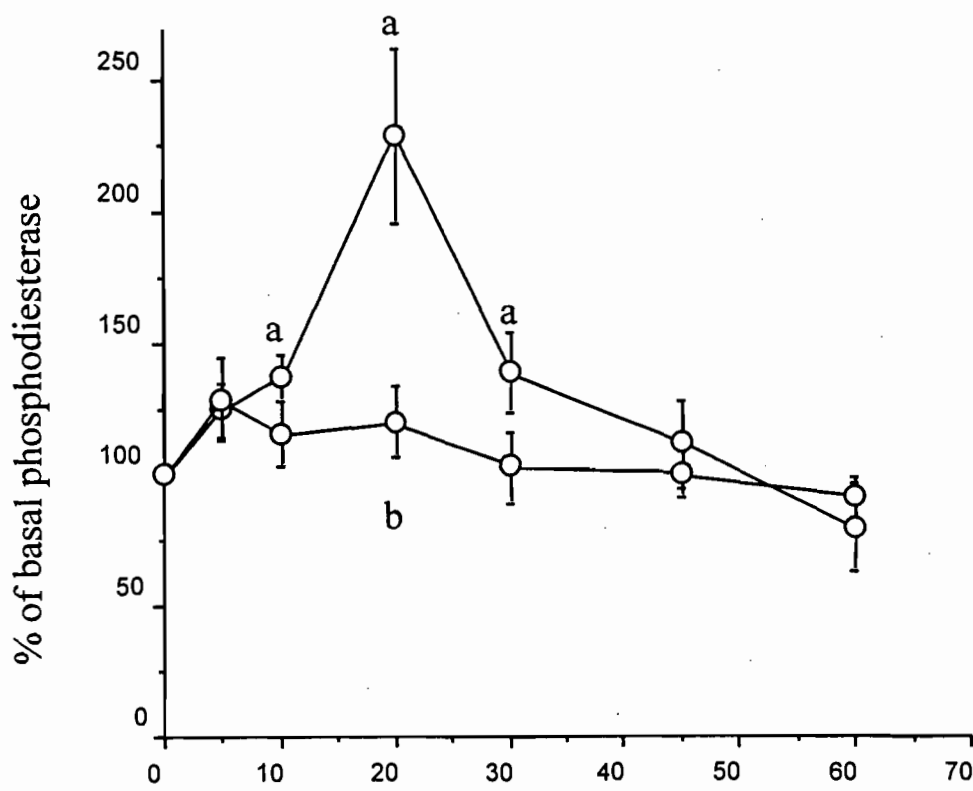
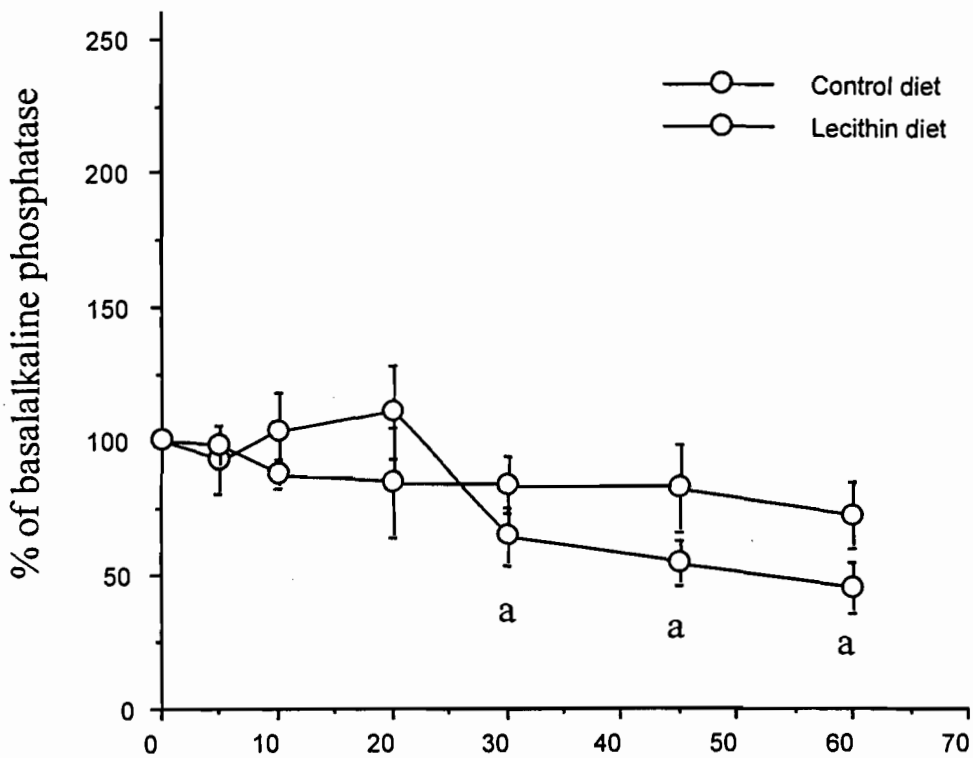
* : $P < 0.05$ when compared to control group.

Figure 4: Time course of disappearance of TCA C14 from blood



Values represent the mean \pm SD of 6 animals per group.

Figure 5: Biliary secretion of alkaline phosphatase
And phosphodiesterase-1

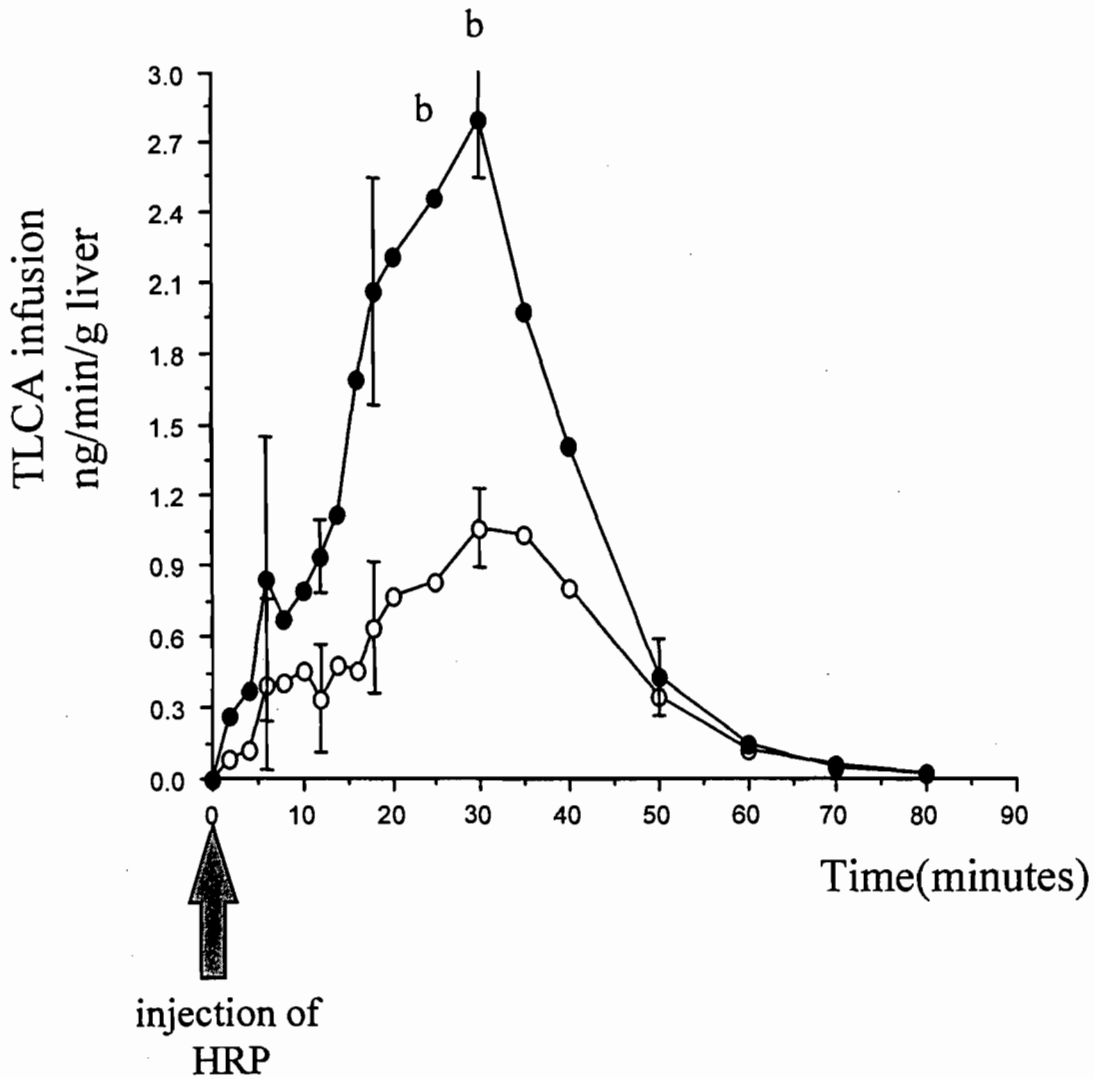
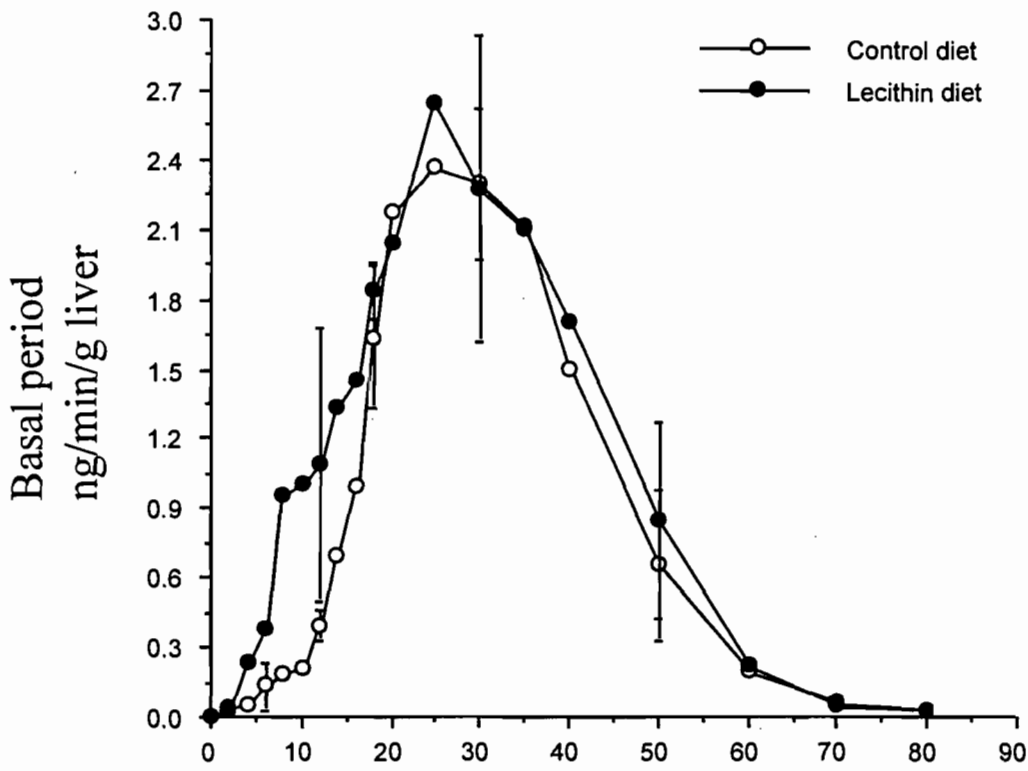


Time (minutes)

0.05
0.1

$\mu\text{mol}/\text{min}/100 \text{ g body weight}$
 Tauro lithocholic acid infusion rate

Figure 6: Biliary output of HRP after an intraportal vein injection



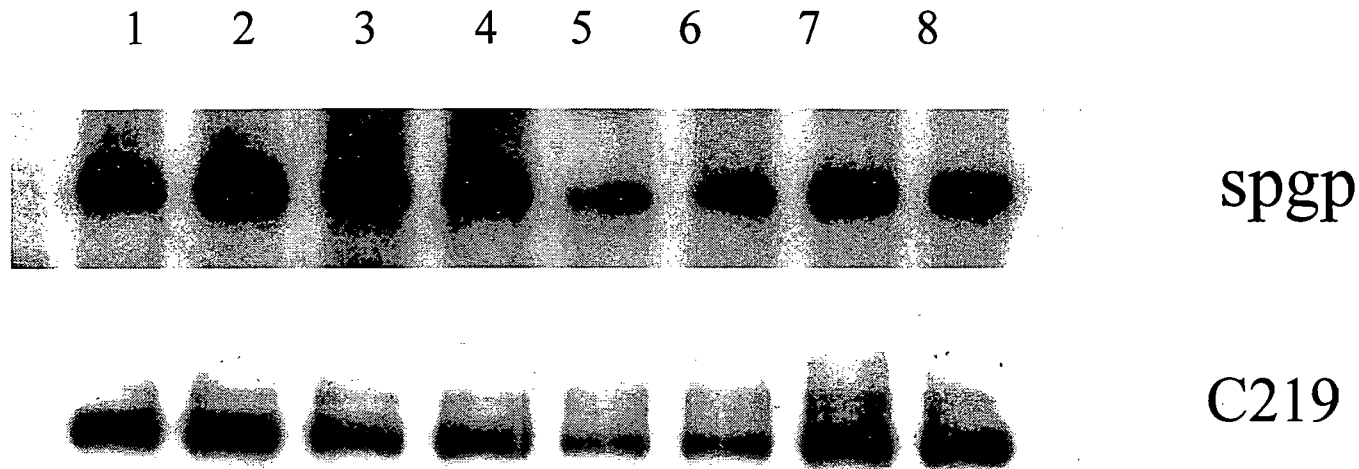


Figure 7

Western blot analysis of spgp (bile salt export pump) and all p glycoproteins levels using a polyclonal antibody against spgp and the mouse monoclonal C219 antibody respectively. Lanes 1-4 represent blots of membranes from rats not receiving taurochenodeoxycholate and fed control diet (lanes 1 and 2) or diets enriched in phospholipid (lanes 3 and 4). Lanes 5-8 represent blots from animals treated with taurochenodeoxycholate and fed control diet (lanes 5 and 6) or lecithin rich-diet (lanes 7 and 8).

CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE

La sécrétion biliaire est un processus qui permet, d'une part, d'assurer la digestion et l'absorption des graisses présentes dans la lumière intestinale et, d'autre part, d'éliminer le cholestérol endogène de l'organisme. Une perturbation dans ce processus sécrétoire biliaire peut entraîner une cholestase hépatique et conséquemment causer de graves lésions au niveau du foie (Yousef *et al.* 1998, Bahar et Stolz 1999, Kullak-Ublick *et al.* 2000).

Par ailleurs, les phospholipides biliaires, présents majoritairement sous forme de PC, comptent parmi les principaux constituants lipidiques de la bile. Lorsqu'ils sont sécrétés dans la lumière canaliculaire, ces molécules semblent s'assembler sous forme de vésicules et de micelles, ce qui leur permet d'assurer la solubilisation du cholestérol présent dans le canalicule (Crawford 1996). De plus, ces vésicules lipidiques protégeraient la membrane canaliculaire contre l'effet cytotoxique des AB (Small et Carey 1978, Puglielli *et al.* 1994). L'apport suffisant de phospholipides vers la membrane canaliculaire semble donc s'avérer une étape primordiale dans le processus de sécrétion de la bile et des lipides biliaires. Dans ce sens, le pool hépatique de phospholipides destiné à la sécrétion biliaire contribue grandement à cet apport vers la membrane. À preuve, lorsque ce pool de phospholipides est épuisé, par exemple lors d'une infusion croissante d'AB causant la cholestase, les fonctions sécrétoires de l'hépatocyte sont altérées (Yousef *et al.* 1998).

Une étude effectuée dans nos laboratoires a démontré chez le rat qu'une diète enrichie en lécithine de soya stimule la sécrétion de la bile, de même que la sécrétion des lipides biliaires, notamment celle du cholestérol (Rioux *et al.* 1994). Considérant que l'axe hépatobiliaire contribue au maintien de l'homéostasie du cholestérol, nous avons donc étudié l'effet des phospholipides alimentaires sur la sécrétion de lipides biliaires, hépatiques et plasmatiques. Un des principaux phospholipides constituant cette diète est la PC qui, lors de son absorption, est transformée en lysophosphatidylcholine, acides gras et en choline. Cette dernière participe à la synthèse *de novo* de la PC et pourrait

contribuer à l'augmentation du contenu en PC hépatique. Il nous a donc semblé opportun d'étudier le rôle de la choline alimentaire dans l'effet bénéfique de la lécithine sur la sécrétion des lipides biliaires.

Au cours de cette étude, l'enrichissement en phospholipides dans la diète est de 20%, et celui de la choline de 4%, la durée du traitement alimentaire étant de deux semaines. Les trois diètes ont un apport équivalent en triglycérides, soit de 16%. Cet apport en lipides pour les diètes contrôle et enrichie en choline provient de la margarine de marque **becel^{md}**, tandis qu'elle provient de granules de lécithine de soya pour la diète enrichie en phospholipides. Cette dernière contient jusqu'à 4.4% de divers phospholipides, les phospholipides majoritaires étant les PC. L'apport en PC peut varier de 2 à 3.5% d'un approvisionnement à l'autre, procurant le même pourcentage d'enrichissement en choline liée aux PC. La teneur en choline sous forme libre de la diète enrichie en choline est de 4% pour s'assurer d'une biodisponibilité suffisante de la choline libre destinée vers la voie de synthèse des PC. Le régime contrôle contient 4% de plus de glucides afin de compenser pour l'enrichissement de 4% en phospholipides et choline des deux autres diètes expérimentales. Cet apport supplémentaire en glucide dans la diète contrôle ne s'avère cependant pas suffisant pour affecter les lipides hépatiques, en particulier les triglycérides. La valeur énergétique des diètes est de 19.64 KJoules/gramme, 19.75 KJoules/gramme et de 20.30 KJoules/g pour le régime contrôle, enrichie en choline et en phospholipides respectivement.

Dans ce projet, un premier volet nous fait part d'observations concernant l'effet de ces traitements alimentaires sur les lipides du plasma, du foie et de la bile, cette étude étant réalisée sur des animaux qui étaient préalablement nourris à volonté. Un deuxième volet s'attardait davantage sur l'avenue mécaniste en examinant les effets de ces diètes sur le profil lipoprotéique ainsi que la mesure de l'activité des enzymes régulatrices du cholestérol hépatique. Dans ce contexte, les animaux étaient à jeun depuis la veille lors du sacrifice. Enfin, un troisième volet portait sur le potentiel hépatoprotecteur des phospholipides alimentaires dans la cholestase induite par l'ATLC. L'AB était administré à des doses croissantes dans le but d'évaluer l'effet d'une telle diète sur le

transport vésiculaire et la sécrétion biliaire des lipides et protéines membranaires dans un contexte cholestatique. De plus, l'expression des protéines de la membrane canaliculaire assurant le transport des lipides biliaires, telles que les P-glycoprotéines mdr2 et spgp, était mesurée.

Le poids corporel moyen est comparable d'un groupe à l'autre, soit de 242 ± 11 grammes lors la première étude, de 280 ± 13 grammes à la deuxième étude et de 310 ± 12 grammes lors de la troisième étude. Également, la consommation alimentaire ne présente pas de différence significative entre les groupes, la moyenne quotidienne étant de 15 grammes, 19 grammes et 20 grammes lors de la première, deuxième et troisième étude respectivement. Pendant les heures précédant le sacrifice, les animaux consomment une quantité comparable de nourriture, sensiblement la même que les moyennes de consommation quotidienne mentionnées ci-haut.

5.1 Modifications biliaires suite aux traitements alimentaires

Les résultats concernant ce projet de recherche démontrent clairement que les phospholipides alimentaires stimulent la sécrétion de la bile et des lipides biliaires (tableau 3, art. I). Cette stimulation est particulièrement importante en ce qui concerne la sécrétion du cholestérol biliaire, confirmant les résultats précédemment publiés par Rioux *et al.* (1994).

Cette augmentation considérable du cholestérol dans la bile (près de deux fois plus que le groupe contrôle) amène à s'interroger quant aux possibilités que la bile devienne sursaturée en cholestérol. Un tel événement peut entraîner la précipitation du cholestérol et contribuer à l'apparition de lithiases biliaires. Toutefois, dans le cas présent, la sécrétion accrue de cholestérol est accompagnée d'une augmentation d'AB et de phospholipides, toutes deux étant capables de solubiliser le cholestérol en excès (Cohen et Carey 1991).

La diète supplémentée en choline stimule la sécrétion du flux sans toutefois influencer de façon significative la sécrétion des lipides biliaires (tableau 3, art. I). Robins et Armstrong (1976) se sont également intéressés à l'effet d'une supplémentation en choline par la diète sur la sécrétion des lipides biliaires. En effet, une diète contenant jusqu'à 5% de choline causait une augmentation de la sécrétion des phospholipides et du cholestérol biliaires sans toutefois augmenter celle des AB. Les auteurs attribuaient alors cette augmentation des phospholipides à une plus grande synthèse de la PC, vérifiée par la mesure de l'incorporation du P^{32} dans la PC biliaire (Robins et Armstrong 1976). Dans cette présente étude, le taux de sécrétion des phospholipides est augmenté comparé au groupe contrôle mais ce changement n'est pas statistiquement significatif. Toutefois, des changements observés dans le contenu lipidique du foie supportent une modulation de la synthèse de la PC, comme proposé par Robins et Armstrong. Notons toutefois que plusieurs conditions expérimentales ne sont pas comparables entre notre étude et celle de Robins et collaborateurs. En effet, la durée du traitement diététique était de trois semaines dans le cas de l'étude menée par l'équipe de Robins, et l'apport en choline variait de 0, 0.5 ou 5% selon les trois groupes expérimentaux spécifiques à cette étude (Robins et Armstrong 1976).

L'augmentation de la sécrétion des AB induits par la diète supplémentée en phospholipides s'accompagne d'une plus grande proportion d'acide deoxycholique, un AB secondaire et relativement hydrophobe (tableau 4, art. I). À ce sujet, il a été démontré que la sécrétion des lipides dans la bile est en corrélation avec le degré d'hydrophobicité des AB, c'est-à-dire que l'AB plus hydrophobe (possédant une basse concentration micellaire critique (CMC)) provoque une plus grande sécrétion lipidique par molécule que ne le fait les AB plus hydrophiles (Bilhartz et Dietschy 1988, Heuman 1989, Coleman et Rahman 1992). Par surcroît, l'acide biliaire possédant deux hydroxyles comme l'acide deoxycholique s'avère être plus efficace que les AB trihydroxylés (Coleman et Rahman 1992). Certains AB trihydroxylés sont moins hydrophobes car le groupe 3 alpha-hydroxy est axial est diminuerait l'hydrophobicité des côtés beta en augmentant le CMC (Hofmann 1994). Alors, la nature des AB

sécrétés sous l'influence des phospholipides diététiques pourrait contribuer à la stimulation de la sécrétion des phospholipides et du cholestérol vers la bile.

Par ailleurs, la diète enrichie en choline favorise plutôt la sécrétion d'AB plus hydrophiles, tels que l'acide ursodeoxycholique et les acides muricholiques aux dépens de l'acide cholique (tableau 4, art. I). Ces AB hydrophiles ont des propriétés moins détergentes sur la membrane et leur capacité à influencer la sécrétion lipidique est par conséquent moins importante. Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, que la choline alimentaire ne stimule pas la sécrétion des lipides dans la bile.

5.2 Modifications plasmatiques suite aux traitements alimentaires

Lorsque des changements sont observés au niveau des lipides hépatiques et biliaires, il est très probable que les lipides dans la circulation périphérique soient modifiés également. En effet, le profil des lipides plasmatiques totaux indiquent des différences significatives entre les trois régimes alimentaires. Au cours du premier volet de ce projet de recherche, la mesure du contenu en différents lipides plasmatiques s'effectue sur des animaux qui ont un libre accès à la nourriture jusqu'au moment du sacrifice. Les résultats indiquent qu'après deux semaines de traitement alimentaire, la diète enrichie en phospholipides diminue le cholestérol plasmatique total, ce résultat étant attribué principalement à une diminution du cholestérol des HDL (figure 1, art. I). Ces résultats vont dans le même sens que ceux observés par Polichetti et collaborateurs (1996), auteurs d'une recherche qui se déroulait dans des conditions très comparables aux nôtres. Plusieurs études menées sur des rats et autres espèces animales ont également démontré un effet hypocholestérolémiant suite à l'ingestion de phospholipides alimentaires (Jimenez *et al.* 1990, Wilson *et al.* 1998). Certains auteurs ont attribué cette baisse du cholestérol plasmatique à une excrétion accrue du cholestérol dans les fécès (O'Mullane et Hawthorne 1982). Dans notre cas, cependant, la mesure du cholestérol fécal ne révèle aucune différence entre les diètes, les résultats étant de 4.48 ± 1.03 et 4.54 ± 0.68 mg/jour de cholestérol pour le groupe contrôle et le groupe lécithine respectivement. Par ailleurs, des chercheurs ont récemment identifié

un récepteur scavenger B1 (SR-B1) localisé au foie et assurant le transfert bi-directionnel du cholestérol libre entre la HDL et la cellule (Ji *et al.* 1997). Ces auteurs ont également démontré que le récepteur SR-B1 stimule la capture hépatique du cholestérol libre des HDL et favorise le transport de cette lipoprotéine vers la bile (Ji *et al.* 1999). D'autre part, il a été rapporté que les acides gras polyinsaturés régulent à la hausse l'expression du récepteur SR-B1 (Spady *et al.* 1999). En ce qui concerne notre étude, l'enrichissement absolu en phospholipides est de 4% dans le groupe expérimental, avec un profil en acides gras majoritairement composé d'acides gras polyinsaturés 18:2. En regard à la stimulation de la sécrétion du cholestérol biliaire, les phospholipides alimentaires pourraient augmenter l'expression du récepteur SR-B1.

Par ailleurs, l'effet hypocholestérolémiant induit par les phospholipides alimentaires n'est pas reproduit par la diète enrichie en choline. En effet, aucun changement significatif au niveau du plasma n'a été observé suite à cette diète (figure 1, art. I). Par conséquent, cette composante de la phosphatidylcholine ne semble pas être responsable des changements observés chez le groupe nourri avec les phospholipides en ce qui concerne les lipides plasmatiques.

Une deuxième série d'expérience est effectuée dans des conditions similaires à la série mentionnée ci-haut à l'exception que les animaux sont mis à jeun 12 heures avant le sacrifice. Ces conditions induisent des changements importants quant au contenu des lipides plasmatiques comparés aux résultats chez les animaux nourris à volonté. En effet, le cholestérol total, ainsi que sa forme libre et estérifiée, sont significativement augmentés par la diète enrichie en phospholipides (figure 2, art. II). Le jeûne provoque donc chez ce groupe une mobilisation importante des lipides circulants. Ces résultats peuvent suggérer qu'au niveau postprandial, les phospholipides alimentaires favorisent le transport inverse du cholestérol en dirigeant vers le foie le cholestérol localisé dans les régions périphériques. Ce phénomène se traduit par une diminution du cholestérol plasmatique. Lorsque l'animal est à l'état à jeun, le foie doit répondre aux besoins de la périphérie. Il libère dans le sang des lipoprotéines riches en cholestérol qui ont pour effet d'augmenter le niveau de cholestérol plasmatiques. On observe également une

diminution des phospholipides plasmatiques (figure 2, art. II), résultats concomitants avec ceux obtenus par Polichetti *et al.* (1996). Cependant, d'un point de vue physiologique, cette diminution ne semble pas suffisamment importante pour modifier le profil global des lipoprotéines.

Des travaux antérieurs ont démontré que les changements de la cholestérolémie pouvaient être attribués au contenu en acides gras polyinsaturés provenant de la diète (Shepherd *et al.* 1980). De ce fait, un enrichissement alimentaire en acides gras polyinsaturés diminue le cholestérol plasmatique (Levy et Herzberg 1995, Tuchweber *et al.* 1996). Dans notre cas, le profil des acides gras polyinsaturés de chacun des régimes alimentaires était comparable, avec une prédominance pour l'acide palmitique et l'acide linoléique. Par conséquent, le contenu en acides gras polyinsaturés ne serait pas responsable de la diminution du cholestérol causée par la diète enrichie en phospholipides.

5.3 Modifications hépatiques suite aux traitements alimentaires

5.3.1 Contenu des lipides hépatiques

L'enrichissement de phospholipides dans la diète a pour effet de modifier le contenu des lipides hépatiques, tel qu'un abaissement des lipides totaux, des triglycérides, de l'ester de cholestérol ainsi que du cholestérol total et libre (tableau 2, art. I et tableau 2, art. II). Ces observations, en parallèle avec celles constatées dans la bile, sont une indication d'une plus grande mobilisation des lipides hépatiques destinés vers la sécrétion biliaire. Les changements significatifs concernant le contenu en cholestérol au niveau du foie laissent présager une modulation par la diète de l'activité des enzymes clefs régulant l'homéostasie du cholestérol hépatique.

Comme mentionné précédemment, la diète enrichie en choline cause une augmentation du contenu en phospholipides hépatiques. Selon Robins et Armstrong (1976), cette augmentation provient de la nouvelle synthèse de PC, démontrée dans ce cas par la

mesure de l'incorporation du P³². Cependant, contrairement au groupe enrichi en phospholipides alimentaires, l'augmentation des phospholipides hépatiques ne se traduit pas par une augmentation significative de leur sécrétion dans la bile. Ces résultats supportent ceux de d'autres études qui démontrent que les PC nouvellement synthétisées contribuent que de façon marginale (moins de 10%) au pool de PC biliaires.

5.3.2 Modifications du contenu lipidique des membranes canaliculaires suite aux traitements alimentaires

La mesure du contenu en cholestérol et phospholipides des membranes canaliculaires ne révèle aucune modification significative, que se soit chez les groupes d'animaux supplémentés en phospholipides, ou en choline comparés avec le groupe contrôle. En parallèle, la fluidité des membranes canaliculaires n'est pas altérée par aucun des traitements alimentaires (tableau 6, art. I). Donc, l'augmentation du flux biliaire observée chez les groupes supplémentés en phospholipides ou en choline ne serait pas causée par une plus grande fluidité membranaire.

5.3.3 Modifications morphologiques des hépatocytes suite aux traitements alimentaires

Au cours de cette étude, nous nous sommes également attardés à l'aspect morphologique de l'hépatocyte, tel qu'évalué par l'analyse histologique et par microscopie électronique. Les résultats ne démontrent aucune altération quant à la structure des hépatocytes, mis à part l'accumulation de gouttelettes lipidiques qui indiquent la présence d'un foie gras (figure 2, art. I). Toutefois, la diète enrichie en phospholipides diminue de façon marquée la présence de ces gouttelettes de lipides. Par ailleurs, le groupe nourri avec la diète enrichie en choline diminue l'accumulation de gouttelettes lipidiques mais de façon plus modérée que le groupe lécithine. Les deux diètes sont donc bénéfiques car elles empêchent ou atténuent l'accumulation de lipides dans le foie.

5.4 Effets des traitements alimentaires durant l'infusion de l'acide taurocholique

5.4.1 Effet sur la sécrétion biliaire et le transport maximal des acides biliaires et autres lipides

Il est bien connu que l'augmentation de la sécrétion des AB s'accompagne d'une augmentation parallèle des autres lipides biliaires, tel que les phospholipides et le cholestérol (Verkade *et al.* 1995, Yousef *et al.* 1990). Ceci est clairement démontré chez l'animal par l'infusion des AB en doses croissantes qui provoque une augmentation de la sécrétion des lipides biliaires jusqu'à atteindre son maximum de sécrétion. Ce phénomène, connu comme le TSm, est suivi par un déclin de la sécrétion de la bile et défini comme la cholestase (Cohen *et al.* 1992).

Au cours de notre étude, l'ATC a été infusé en dose croissante, provoquant chez les deux diètes expérimentales une augmentation du TSm des AB lorsque comparés au groupe contrôle (figure 3, art. I). L'augmentation du TSm des AB a entraîné une augmentation simultanée du TSm des phospholipides chez les animaux supplémentés en phospholipides et en choline, tandis que celui du cholestérol était augmenté seulement par la diète supplémentée en phospholipides (figure 4, art. I). La cholestase induite par l'infusion de l'ATC chez le groupe contrôle est inhibée chez les groupes nourris avec les diètes enrichies en phospholipides et en choline. Ces résultats, consistants avec ceux obtenus par Rioux *et al.* (1994), indiquent que le foie des sujets expérimentaux a une plus grande capacité à transporter et à sécréter les AB. Dans ces conditions de stimulation accrue, l'augmentation du taux de sécrétion des phospholipides qui accompagne celui des AB suggère un accroissement du pool hépatique préformé de phospholipides pour satisfaire à cette demande. D'ailleurs, la sécrétion totale de phospholipides biliaires pendant la période du TSm des AB était nettement supérieure dans les groupes enrichis en phospholipides et choline en comparaison au groupe contrôle.

5.4.2 Effet sur la composition lipidique des membranes hépatiques

Aucune modification significative a été notée dans le contenu en cholestérol et phospholipides des membranes microsomales et canaliculaires suivant l'infusion de l'ATC (tableau 6, art. I). Alors, malgré l'augmentation marquée de la sécrétion des AB et des autres lipides pendant l'infusion, la composition lipidique des membranes de l'hépatocyte n'était pas altérée. L'accroissement du pool hépatique des phospholipides pourrait contribuer au maintien de la membrane en approvisionnant adéquatement celle-ci en phospholipides destinés à la sécrétion biliaire. Ainsi, ce ravitaillement permettrait de protéger l'intégrité de la membrane contre l'effet détergent des AB et, par le fait même, améliorer le transport de ces derniers.

Plusieurs transporteurs protéiques actifs, impliqués dans le transport cytoplasmique et la sécrétion des lipides vers le canalicule ont été identifiés depuis la dernière décennie. Puisque la sécrétion maximale des AB est augmentée chez les deux diètes expérimentales, entraînant une augmentation de la sécrétion des phospholipides et du cholestérol, il est possible que les phospholipides et la choline alimentaires puissent modifier l'activité de ces transporteurs. Il est d'ailleurs démontré que les AB peuvent moduler l'activité des transporteurs protéiques. En effet, le transport cytoplasmique de la PC lié à un marqueur fluorescent est augmenté en présence de l'ATC, suggérant que ce dernier module l'activité du PC-TP (Cohen *et al.* 1994). De plus, les AB peuvent être d'importants régulateurs des PC de la bile en modulant l'activité transcriptionnelle du *mdr2* (Gupta *et al.* 2000, Frijters *et al.* 1997). Les AB plus hydrophobes comme les acides taurocholiques et taurodeoxycholiques stimulent davantage la protéine de transport lorsque comparés aux AB plus hydrophiles (Gupta *et al.* 2000).

En ce qui nous concerne, dans un contexte de transport accru causé par l'infusion de l'ATC, la mobilisation accrue des lipides, incluant les phospholipides et les AB, vers la bile pourrait être médiatée par une plus grande activité des protéines de translocation, notamment la P-glycoprotéine *mdr2*.

5.4.3 Effet sur le profil en acides gras de la PC biliaire

L'analyse des différents types de phospholipides biliaires permet de constater que plus de 90% des phospholipides de la bile sont composés majoritairement des acides palmitique et linoléique respectivement à la position 1 et 2 du glycérol. Tout comme la composition lipidique des membranes, l'analyse des différentes classes de phospholipides de même que le profil des acides gras de la PC dans la bile ne révèlent aucune différence entre les groupes étudiés, que ce soit avant ou après la période d'infusion de l'ATC (tableau 5, art. I). Ces résultats ne sont pas surprenants puisque généralement, les classes de phospholipides biliaires et leur profil en acides gras respectent une configuration bien spécifique. Dans certains cas, cependant, il est possible de modifier le profil des acides gras des phospholipides biliaires. Comme exemple, une modification de la composition en acides gras de la diète se traduisant par une augmentation du ratio acides gras oméga 3/oméga 6, peut modifier le profil d'acides gras de la PC biliaire (Lévy et Herzberg 1995).

5.5 Effets des phospholipides alimentaires sur l'homéostasie du cholestérol hépatique

L'homéostasie du cholestérol désigne l'équilibre du cholestérol hépatique entre la lipoprotéinogénèse et le métabolisme des lipides biliaires (Cooper 1985, Marzolo *et al.* 1990, Dietschy *et al.* 1993), ce dernier permettant l'élimination du cholestérol endogène (Turley et Dietschy 1988). Les observations constatées au cours du premier volet de ce projet de recherche nous révèlent que les phospholipides alimentaires stimulent la sécrétion des lipides biliaires et modifient le profil des lipides totaux au niveau hépatique et plasmatique. Ces changements (diminution significative du cholestérol hépatique estérifié) concernent particulièrement le métabolisme du cholestérol hépatique. Toutefois, ces résultats suggèrent fortement que cette intervention nutritionnelle influence l'activité des enzymes clefs de la régulation du métabolisme du cholestérol dans le foie. Par conséquent, nous nous attardons, au cours de ce deuxième volet, sur l'activité enzymatique de ces enzymes régulatrices ainsi que sur l'étude du

profil des lipoprotéines. Cette étude est menée dans des conditions où les animaux sont à jeûn 12 heures avant le sacrifice.

5.5.1 Avenues mécanistes

5.5.1.1 Effets sur les enzymes régulatrices du cholestérol hépatique

Le cholestérol hépatique est régulé principalement par trois enzymes microsomiales; l'HMG-CoA réductase, le cholestérol 7 α -hydroxylase et la ACAT. Les résultats de notre étude démontrent une forte diminution de l'activité enzymatique de l'ACAT par la diète enrichie en phospholipides, chutant à près de 75% lorsque comparée au contrôle (figure 4, art. II). Cette enzyme, responsable de l'estérification du cholestérol hépatique, joue un rôle central dans la direction du cholestérol à l'intérieur de l'hépatocyte. La ACAT aurait un effet sur la compartimentation du cholestérol dans l'hépatocyte qui serait dirigée vers la sécrétion biliaire, la voie sécrétoire des lipoprotéines ou entreposée sous forme d'ester de cholestérol (Erickson et van Zuiden 1995). Par ailleurs, cette compartimentation par la ACAT s'ajusterait selon la demande provenant des trois voies métaboliques du cholestérol (Stone *et al.* 1985, Van Zuiden *et al.* 1987, Erickson et Van Zuiden 1995). C'est pourquoi nous proposons que les changements importants dans l'activité de cette enzyme ne résulte pas de l'action directe des phospholipides alimentaires mais plutôt d'un réajustement rapide de l'ACAT dans le but de satisfaire certains besoins, par exemple la grande demande de cholestérol libre destiné à la sécrétion biliaire. Par ailleurs, il est proposé que les AB influencent l'activité de l'ACAT, de même que la sécrétion du cholestérol lié aux lipoprotéines et l'entreposage du cholestérol dans l'hépatocyte (Post *et al.* 1999). Considérant que les phospholipides de la diète augmentent la sécrétion des AB, ces derniers pourraient moduler l'activité de cette enzyme. Cette baisse marquée de l'activité de la ACAT est associée avec une diminution du contenu hépatique de l'ester de cholestérol ainsi que des VLDL plasmatiques.

La diète enrichie en phospholipides augmente de 30% l'activité enzymatique de la HMG-CoA réductase et de 12% celle du cholestérol 7alpha-hydroxylase (figure 4, art. II). Malgré que ces changements ne soient pas significatifs, ils représentent une stimulation substantielle de la nouvelle synthèse de cholestérol libre et d'AB, qui seront par la suite dirigés vers la bile. Par ailleurs, les AB hydrophobes peuvent réguler négativement l'activité de la cholestérol 7alpha-hydroxylase (Heuman *et al.* 1989, Stravitz *et al.* 1993). Il est donc possible que chez le groupe expérimental, l'augmentation de la sécrétion des AB, constitués majoritairement des AB hydrophobes (l'acide cholique et deoxycholique), régule à la baisse l'activité de la cholestérol 7alpha-hydroxylase.

5.5.1.2 Effets sur la composition lipidique des membranes microsomales

On observe chez les animaux nourris avec la diète enrichie en phospholipides une diminution du contenu en cholestérol (30%) des membranes microsomales et, par conséquent, une diminution du ratio cholestérol/phospholipides (tableau 3, art. II). De plus, la mesure de la polarisation fluorescente des membranes microsomales indique une augmentation significative de la fluidité membranaire (tableau 3, art. II). Par ailleurs, il est suggéré que l'environnement lipidique membranaire, déterminé par la matrice phospholipidique et sa composition en acides gras, ainsi que le contenu en cholestérol, peuvent influencer l'activité de certaines enzymes (Castuma et Brenner 1986, Lutz *et al.* 1998). C'est particulièrement le cas avec la HMG-CoA réductase ayant comme site d'ancrage le réticulum endoplasmique, et qui serait sensible aux variations de la fluidité membranaire (Liscum *et al.* 1983). En effet, une augmentation de la rigidité membranaire peut conduire à une diminution de l'activité de cette enzyme (Liscum *et al.* 1983). Également, l'activité de la ACAT pourrait être influencée par des altérations de la fluidité, notamment par des modifications au niveau de la composition en acides gras des phospholipides des microsomes (Chautan *et al.* 1989, Pal et Davis 1991). Dans un contexte peroxydatif où la fluidité membranaire est altérée, c'est-à-dire moins fluide, l'activité des enzymes microsomales telles que l'HMG-CoA réductase, l'ACAT et la cholestérol 7alpha-hydroxylase est modifiée (Brunet *et al.* 1999 et 2000).

5.5.1.3 Effets sur le pool hépatique d'acides biliaires

Ce travail révèle que le pool d'AB est deux fois plus grand chez les rats nourris avec la diète enrichie en phospholipides (figure 1, art. II), signifiant que la disponibilité des AB, qui sont majoritairement composés d'AB hydrophobes, est plus importante chez ce groupe expérimental. Xu *et al.* (2000) ont constaté que le pool d'AB était directement relié à l'activité du transporteur ASBT, situé dans l'iléum intestinal, et qu'une diminution de la réabsorption intestinale des AB (cycle entérohépatique) entraîne une baisse du pool. Dans la présente étude, l'activité du transporteur intestinal ASBT n'a pas été déterminée mais sa hausse potentielle pourrait contribuer à l'augmentation du pool d'AB observée chez le groupe nourri avec les phospholipides alimentaires. Par ailleurs, la circulation entérohépatique des AB exerce des effets régulatoires importants sur plusieurs fonctions biliaires, hépatiques et intestinales et cette régulation serait dépendante des propriétés physico-chimiques et hydrophobiques du pool recirculant (Carulli *et al.* 2000). Dans ce travail, les AB hydrophobes qui sont majoritaires peuvent influencer grandement la sécrétion des phospholipides et cholestérol biliaires, ainsi que réguler l'activité des enzymes impliquées dans l'homéostasie du cholestérol, telles que l'HMG-CoA réductase et, comme mentionné ci-haut, la cholestérol 7 α -hydroxylase.

5.5.1.4 Effets sur les protéines de translocation des lipides biliaires de la membrane canaliculaire

L'expression de différentes P-glycoprotéines hépatiques a été mesurée suite au traitement alimentaire. Aucune différence significative n'a été décélée entre la diète enrichie en phospholipides et la diète contrôle quant à la quantification des P-glycoprotéines de la membrane canaliculaire, incluant la mdr2 et la spgp (figures 5 et 6, art. II). L'expression de ces protéines de translocation n'est donc pas modifiée malgré une stimulation de la sécrétion des lipides biliaires dans la lumière canaliculaire, incluant les phospholipides et les AB. Malgré la grande disponibilité des molécules de PC et d'AB à la surface du feuillet interne de la membrane canaliculaire, les résultats

suggèrent que le seuil de capacité maximale des P-glycoprotéines à transloquer la PC et les AB n'est pas atteint. Il y aurait donc suffisamment de P-glycoprotéines mdr2 et spgp pour satisfaire les besoins de transport de ces lipides.

5.5.1.5 Effets sur le profil lipoprotéique

Alors que la diète supplémentée en phospholipides a provoqué une importante modification dans l'activité de la ACAT, le profil lipoprotéique était lui aussi altéré, particulièrement en ce qui concerne la nette diminution des VLDL (53%) (figure 3, art. II). Cette baisse était accompagnée d'une modification dans la composition des VLDL, soit d'une diminution des triglycérides, résultant en une réduction de la taille des VLDL (tableau 1, art. II). Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la baisse de cette classe de lipoprotéines. D'abord, une modification dans la synthèse des lipides au niveau du foie peut compromettre la formation des VLDL en empêchant l'assemblage des lipides (Sakata *et al.* 1993, Verkade *et al.* 1993). En ce sens, notre étude démontre une diminution du contenu en triglycérides, suggérant que la synthèse des triglycérides est diminuée. Ide et collaborateurs (1992, 1992b et 1994) ont d'ailleurs démontré que les phospholipides alimentaires originant du soya diminuent le contenu hépatique en triglycérides par une inhibition de la synthèse des triglycérides hépatiques (diminution de l'activité enzymatique impliquée dans la synthèse d'acides gras et des glycérolipides). Par ailleurs, le cholestérol total et sa forme libre et estérifiée sont également abaissés, pouvant modifier la sécrétion des VLDL. De plus, la hausse des AB peut être impliquée dans la baisse des VLDL via leur action sur la ACAT (Heuman *et al.* 1989, Stravitz *et al.* 1993).

Un autre facteur pouvant être responsable de la baisse des VLDL plasmatiques est l'activité de la LPL, une enzyme responsable de l'hydrolyse des molécules de TG constituant les lipoprotéines circulantes. Cette enzyme est associée au côté luminal des capillaires et des artères et son action produit des acides gras libres. La LPL est donc impliquée dans la cascade de la conversion des VLDL en LDL (Goldberg 1996). Dans notre étude, l'analyse du profil lipoprotéique indique une élévation significative des

LDL plasmatiques chez le groupe nourris avec la diète enrichie en phospholipides (figure 3, art. II), suggérant une augmentation de l'activité de la LPL sur le catabolisme des VLDL.

5.6 Effets des phospholipides alimentaires contre la cholestase induite par l'acide tauroolithocholique

Comme il a été mentionné auparavant, la diète enrichie en phospholipides a démontré des effets bénéfiques en inhibant la cholestase induite par l'infusion de l'ATC. L'infusion de cet AB induit d'abord une cholérèse dépendante des AB. En parallèle, on observe une augmentation du transport des phospholipides et du cholestérol vers la bile, produisant une stimulation du flux biliaire. L'augmentation constante de la concentration de l'AB conduirait à une solubilisation des lipides membranaires du canalicule, ce phénomène étant exacerbé par la déplétion du pool de phospholipides biliaires. Par conséquent, la sécrétion canaliculaire est diminuée marquant la période cholestatique (Yousef *et al.* 1998). Contrairement à la cholestase induite par l'ATC, celle causée par l'ATLC ne semble pas régie par les mêmes mécanismes d'action. Les AB monohydroxylés comme l'ALC et son conjugué l'ATLC sont connus comme des agents cholestatiques puissants, et plusieurs études menées chez les animaux en témoignent (Kakis et Yousef 1978, Gratton *et al.* 1987, Yousef *et al.* 1998). L'ATLC agirait au niveau de la membrane canaliculaire en modifiant sa composition par l'insertion de molécules d'ALC et des molécules de cholestérol. Ainsi, la membrane canaliculaire devient plus rigide, causant une diminution du flux biliaire, donc la cholestase (Yousef *et al.* 1998). Étant donné l'action bénéfique des phospholipides alimentaires dans la cholestase induite par l'infusion de l'ATC, il est intéressant de vérifier si cette diète protège contre l'action cholestatique de l'ATLC.

5.6.1 Modifications du flux et des lipides biliaires

Comme prévu, l'infusion de l'ATLC induit une diminution rapide de près de 50% du flux biliaire ainsi que la sécrétion des AB et des phospholipides tandis que le cholestérol

est diminué de près de 80% chez le groupe contrôle (figures 1 et 2, art. III). La supplémentation en phospholipides alimentaires améliore de façon remarquable la sécrétion de la bile et des lipides biliaires. En effet, le flux biliaire et la sécrétion de l'AB et des phospholipides de la bile sont maintenus à leur taux de base (précédant la période d'infusion) et ne s'abaissent que légèrement durant les 15 dernières minutes de l'infusion, tandis que la sécrétion du cholestérol est maintenue jusqu'à la fin (figures 1 et 2, art. III). La supplémentation en phospholipides assure donc une protection hépatobiliaire remarquable contre l'agent cholestatique. À cet effet, l'excrétion biliaire de l'ALC s'élève à plus de 60% chez les animaux nourris avec la diète enrichie en phospholipides, comparativement à 7% chez le contrôle (tableau 2, art. III). Ce résultat indique donc que chez le groupe expérimental, l'hépatocyte excrète plus efficacement dans la bile l'ATLC, comparativement au groupe contrôle.

Avant d'être excrété, l'ALC peut subir l'hydroxylation pour être métabolisé en acides beta muricholique et chenodeoxycholique, des AB moins toxiques. Cette hydroxylation constitue par conséquent un mécanisme de protection contre la cholestase (Zimniak *et al.* 1989, Yousef *et al.* 1998). Dans notre cas, cependant, la sécrétion biliaire des métabolites de l'ALC comme l'acide muricholique n'est pas augmentée (tableau 1, art. III). L'effet bénéfique des phospholipides alimentaires n'est donc pas attribuable à une augmentation de l'excrétion des métabolites de l'ALC mais plutôt à une plus grande capacité de la part de l'hépatocyte à excréter l'AB toxique sous sa forme initiale. En somme, ces résultats suggèrent une stimulation à la fois du transport de l'ALC à travers l'hépatocyte ainsi que de son excrétion dans le canalicule.

Il est intéressant de noter que l'excrétion biliaire de l'acide cholique, un AB endogène, est également augmentée, comme le démontre l'étude effectuée avec l'acide cholique marqué. En effet, les résultats indiquent qu'une quantité plus élevée de radioactivité se retrouve dans la bile et moins dans le sang chez le groupe supplémenté avec les phospholipides (figure 3, art. III). Puisque les AB peuvent être transportés dans le sang liés à l'albumine mais aussi aux HDL, les AB liés aux HDL pourraient être captés plus

efficacement par le foie sous l'action des phospholipides alimentaires et être dirigés vers l'excrétion biliaire.

5.6.2 Avenues mécanistes

Un des mécanismes proposés pour expliquer la cholestase induite par l'ATLC est l'augmentation du contenu en cholestérol et en ALC dans la membrane canaliculaire. Cette altération membranaire résulte en la libération de ses composés protéiques, telles que certaines protéines de la membrane (Yousef *et al.* 1984, Accatino *et al.* 1994, Arrese *et al.* 1995), et la diminution du flux biliaire qui s'en suit est accompagnée par une diminution de la sécrétion des phospholipides et du cholestérol dans la bile. Jusqu'à maintenant, très peu d'études se sont attardées aux mécanismes impliqués dans cette baisse des lipides biliaires.

5.6.2.1 Modifications du système de transport vésiculaire

Plusieurs études montrent que le transport vésiculaire est une des voies empruntées par les phospholipides et le cholestérol pour atteindre la membrane canaliculaire (Crawford 1996). L'équipe de Marinelli (1992) a pour sa part étudié l'effet de l'ATLC sur l'excrétion des lipides et des protéines dans la bile, plus précisément l'effet de l'AB cholestatique sur la voie vésiculaire. Pour ce faire, la HRP a été utilisée comme marqueur de la voie vésiculaire transcellulaire, cette dernière correspondant au transport transcytotique de la HRP. Suite à l'administration du HRP par voie intraportale, deux phases sont observées. D'abord, la phase précoce (après 5 minutes) qui correspond à la diffusion paracellulaire et la phase prolongée (après 20 à 25 minutes) qui correspond au transport vésiculaire dépendant des microtubules (Hardison *et al.* 1989, Beuers *et al.* 1993). Des recherches ont permis de constater que l'ATLC diminue l'excrétion de la HRP dans la bile, signifiant par le fait même une diminution de la voie vésiculaire. Cet effet de l'ATLC contribue probablement à l'inhibition de la sécrétion des lipides biliaires (Marinelli *et al.* 1992). En ce qui a trait à la présente étude, il y a également une diminution de l'excrétion de la HRP biliaire durant l'infusion de l'ATLC chez le

groupe contrôle (figure 6, art. III). La diminution est particulièrement significative pendant la seconde pointe, identifiée comme la phase prolongée et qui correspond au transport vésiculaire dépendant des microtubules (Hayakawa *et al.* 1990, Beuers *et al.* 1993). Toutefois, le groupe nourri avec la diète supplémentée en phospholipides maintient la sécrétion biliaire de la HRP à un niveau équivalent à celui de la période pré-infusion (figure 6, art. III). Ces résultats suggèrent donc que ce traitement alimentaire prévient l'altération de la voie vésiculaire causée par l'ATLC. Puisque l'excrétion du ATLC se produit en parallèle avec celle du cholestérol, il est possible que l'AB toxique soit incorporé à l'intérieur des structures cellulaires responsables du transfert du cholestérol vers la bile. Ainsi, cette diète favoriserait la sécrétion des lipides dans la bile via le transport vésiculaire tout en permettant de diminuer la toxicité potentielle de l'ATLC.

5.6.2.2 Modifications du fonctionnement de la membrane canaliculaire

Par leur action détergente, les AB peuvent promouvoir l'excrétion biliaire des constituants membranaires, notamment les protéines liées à la membrane canaliculaire (Barnwell *et al.* 1983b, Barnwell *et al.* 1984). Par exemple, il est démontré que la sécrétion de la phosphatase alcaline, une protéine intrinsèque de la membrane canaliculaire, est dépendante de la sécrétion des AB (Wielandt *et al.* 1993). De plus, dans un contexte cholestatique, on observe une augmentation marquée de la sécrétion biliaire de cette protéine. Cette augmentation serait reliée à une plus grande excrétion des AB, démontrée par une plus grande sécrétion d'enzyme par mmol d'AB. Ceci suggère que les protéines membranaires seraient plus sensibles à l'effet détergent des AB en période cholestatique (Wielandt *et al.* 1993, Accatino *et al.* 1995). En effet, chez le groupe contrôle, l'excrétion biliaire de la phosphodiesterase-1 (PDE-1), une protéine membranaire, était significativement augmentée durant l'infusion de l'ATLC lorsque comparée à la période pré-cholestatique (figure 5, art. III). Toutefois, le groupe nourri avec les phospholipides alimentaires a maintenu une excrétion des protéines membranaires constante et comparable à celle de la période de base. Aussi, le ratio des enzymes/sécrétion de l'ALC a diminué de près de 77% chez le groupe supplémenté en

phospholipides (tableau 3, art. III). Ces observations indiquent que malgré l'augmentation du taux de sécrétion de l'ATLC, cette diète protège la membrane contre une solubilisation des enzymes de la membrane canaliculaire par cet AB.

5.6.2.3 Modifications de l'activité des transporteurs protéiques de la membrane canaliculaire

Les P-glycoprotéines agissant au niveau de la membrane canaliculaire, telles que la mdr2 et la spgp, font partie d'un système de transport qui est responsable de la translocation de la sécrétion canaliculaire des phospholipides et des AB respectivement. Récemment, des travaux ont été entrepris dans le but d'examiner ce système de transport durant la CIH (Vos *et al.* 1998, Kagawa *et al.* 1998). Cependant, aucune étude n'a été effectuée avec un modèle cholestatique induit par l'ATLC. La présente étude s'est donc attardée à la mesure du contenu membranaire des P-glycoprotéines, incluant la mdr2, à l'aide de l'anticorps C219, ainsi que la mesure de la spgp suite à l'infusion de l'ATLC. Ces paramètres sont particulièrement pertinents considérant que la sécrétion des lipides biliaires est maintenue chez le groupe nourri à l'aide de la diète enrichie en phospholipides et ce, malgré l'infusion de l'AB cholestatique. Le niveau protéique des P-glycoprotéines est diminué significativement pendant la période cholestatique chez le groupe contrôle, suggérant que les transporteurs mdr2 et spgp pourraient être régulés à la baisse et contribuer à la diminution de la sécrétion des lipides biliaires (figure 7, art. III). Par contre, le groupe supplémenté avec les phospholipides semble maintenir l'expression de l'ensemble de ces P-glycoprotéines. Ces résultats sont donc concomitants avec l'augmentation de la sécrétion des phospholipides au cours de l'infusion de l'ATLC. Concernant le transporteur spgp, son niveau protéique est diminué suite à l'infusion de l'agent cholestatique lorsque comparé à la période de base mais cette diminution semble moins importante chez le groupe enrichi en phospholipides comparé au groupe contrôle. Cette différence entre les deux groupes pourrait contribuer en partie à l'excrétion nettement supérieure de l'ATLC (8 fois plus élevée chez le groupe expérimental comparée au groupe contrôle). Par ailleurs, puisque le principal mécanisme d'action de l'ATLC consiste à augmenter le contenu en

cholestérol dans la membrane canaliculaire, altérant ainsi la structure membranaire, l'activité de la mdr2 et de la spgp pourrait en être modifiée. La diminution des lipides biliaires, associée à la faible excrétion de l'ALC chez le groupe contrôle, appuie cette hypothèse. Contrairement au groupe contrôle, la diète enrichie en phospholipides semble protéger la membrane contre une diminution de la fluidité membranaire en stimulant la sécrétion de l'ATLC et du cholestérol dans la bile. Cette modification de la membrane contribue certainement à la préservation des protéines telles que la mdr2 et, à moindre degré, à celle de la spgp chez le groupe enrichi en phospholipides.

6.0 CONCLUSION

L'ensemble des résultats rapportés dans ce travail révèlent qu'un enrichissement en phospholipides alimentaires procure des effets bénéfiques sur la fonction hépatobiliaire chez le rat. De plus, ce traitement diététique offre un effet hépatoprotecteur contre les effets de la cholestase induite par les AB.

La diète enrichie en phospholipides stimule la sécrétion des lipides biliaires, particulièrement celle du cholestérol, et augmente la capacité à transporter les AB, entraînant une augmentation simultanée du taux de sécrétion maximale des phospholipides et du cholestérol dans un contexte de cholérèse-cholestase induite par l'infusion de l'ATC en doses croissantes. De plus, ces changements au niveau de la bile se reflètent également dans le contenu lipidique du plasma et du foie. En effet, les phospholipides alimentaires induisent chez les animaux nourris un effet hypocholestérolémiant en diminuant le cholestérol des HDL, en plus de diminuer le contenu hépatique en lipides totaux, en triglycérides, de même qu'en cholestérol, particulièrement sa forme estérifiée.

Ces observations peuvent donc suggérer que l'homéostasie du cholestérol hépatique a été modifiée. En effet, la mesure de l'activité des enzymes clés impliquées dans le métabolisme du cholestérol hépatique indique que les phospholipides alimentaires induisent des changements significatifs à ce niveau. La baisse marquée de l'activité de l'ACAT suite au traitement diététique concorde avec la diminution de l'ester de cholestérol au niveau hépatique. La forte stimulation du cholestérol libre vers la bile conduirait l'ACAT à se réajuster en diminuant son activité. Il est démontré que cette enzyme peut réguler la sécrétion des VLDL. À cet égard, la sécrétion de cette lipoprotéine est remarquablement diminuée chez le groupe supplémenté en phospholipides et sa composition est abaissée en triglycérides. Alors, malgré un enrichissement de 16% en triglycérides dans la diète, les triglycérides ne s'accumulent pas au niveau du foie (comme c'est le cas pour le groupe contrôle) et ne sont pas dirigés vers les lipoprotéines. Plutôt, il semble que les acides gras provenant des triglycérides

soient dirigés vers les phospholipides (réacylation des PC). Ces événements pourraient contribuer à l'accroissement du pool des PC destinées à la sécrétion biliaire observée chez le groupe supplémenté en phospholipides alimentaires.

Par ailleurs, on estime que la PC liée aux lipoprotéines, plus spécifiquement aux HDL, contribueraient à plus de 40% des PC biliaires (Portal *et al.* 1993). De plus, lorsque l'on enrichit la diète en phospholipides, celle-ci semble augmenter la capture hépatique de la PC des HDL, ainsi que la sécrétion biliaire des phospholipides (Polichetti *et al.* 1996). Donc, la supplémentation de phospholipides par la diète induit une plus grande disponibilité de PC vers la membrane canaliculaire, protégeant celle-ci contre l'effet cytotoxique des AB et favorisant la solubilisation des molécules de cholestérol biliaire.

En effet, la stimulation de la sécrétion du cholestérol biliaire est remarquablement élevée par la diète enrichie en phospholipides. L'augmentation de 30% de l'activité de la HMG-CoA réductase révèle que le cholestérol nouvellement synthétisé contribue à l'apport accru en cholestérol biliaire. L'augmentation de la fluidité des membranes microsomales est probablement reliée à l'augmentation de l'expression de cette enzyme qui est ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique et sensible aux variations de la fluidité. Cependant, une contribution majeure du cholestérol destiné pour la sécrétion biliaire proviendrait de source extrahépatique, soit le cholestérol sous forme libre, lié aux HDL plasmatiques (Bravo et Cantafora 1990, Robins et Fasulo 1997). Dans la présente étude, la diminution du cholestérol des HDL plasmatiques et l'augmentation de la sécrétion biliaire du cholestérol suggèrent également une stimulation de la capture par le foie de cette classe de lipoprotéines. À cet effet, l'activité du récepteur SR-B1, qui stimule la capture hépatique du cholestérol libre des HDL et favorise le transport de cette lipoprotéine vers la bile, pourrait être augmentée par les phospholipides alimentaires. De plus, l'apport supplémentaire en acides gras polyinsaturés fournit par ce traitement diététique contribuerait à cette stimulation de l'expression du récepteur SR-B1 hépatique.

Parallèlement à l'augmentation de la sécrétion du cholestérol et des phospholipides biliaires, la sécrétion des AB est également augmentée par les phospholipides de la diète. L'accroissement de la disponibilité des AB (augmentation du pool) et leur nature plus hydrophobe contribuent fort probablement à cette stimulation de la sécrétion des lipides vers la bile. Une augmentation du pool d'AB étant associée à une régulation à la baisse de l'activité de la cholestérol 7 α -hydroxylase, les changements observés dans notre étude pourraient être responsables de l'augmentation plutôt faible (12%) de cette enzyme régulatrice.

L'action bénéfique des phospholipides alimentaires se manifeste non seulement dans les conditions de base, mais également lorsque le foie est exposé à une élévation importante des AB, menant à des conditions pathologiques. En effet, lorsque l'ATLC est infusé en doses croissantes, induisant une cholestase intrahépatique sévère chez le groupe contrôle, le groupe supplémenté en phospholipides démontre une inhibition de l'effet cholestatique de l'AB jusqu'à la 45^{ème} minute d'infusion. Pendant les 15 dernières minutes, le flux n'est que légèrement abaissé. Les phospholipides alimentaires ont donc réduit de façon marquée la diminution de sécrétion des lipides biliaires, notamment celle du cholestérol, causée par l'infusion de l'ATLC chez le groupe contrôle. On observe également une plus grande excrétion de l'AB toxique sous sa forme initiale chez le groupe nourrit avec les phospholipides, contrairement à une accumulation dans l'hépatocyte chez le groupe contrôle.

Ces résultats signifient que le transport de l'ATLC jusqu'au canalicule et sa sécrétion dans la lumière canaliculaire sont améliorés par les phospholipides alimentaires. D'une part, le transport vésiculaire dépendant des microtubules est maintenu durant la période cholestatique, contrairement à un abaissement chez le groupe contrôle. D'autre part, l'excrétion des protéines de la membrane canaliculaire reste stable durant l'infusion de l'ATLC. De plus, l'expression des P-glycoprotéines, incluant la mdr2 et de la spgp, semble être régulée à la hausse sous l'action des phospholipides alimentaires. Ces résultats indiquent donc que les fonctions sécrétoires de l'hépatocyte sont améliorées par ce traitement alimentaire.

Ainsi, les phospholipides alimentaires offrent une protection hépatique contre la cholestase induite par l'ATLC. La capacité de cette diète à excréter l'ATLC pourrait être associée à la stimulation de la sécrétion du cholestérol biliaire via le transport vésiculaire.

En résumé, cette étude démontre que les phospholipides alimentaires procurent des effets bénéfiques en stimulant la sécrétion de la bile et des lipides biliaires, particulièrement celle du cholestérol. D'autres recherches sont nécessaires afin de déterminer la contribution réelle de la molécule de PC en rapport aux effets bénéfiques constatés lors de cette étude. En effet, la PE est le deuxième phospholipide en importance dans la diète et des études antérieures montrent que ce phospholipide induit des changements au niveau des lipides hépatiques ainsi que sur la sécrétion des lipides biliaires (Imaizumi *et al.* 1983, Peled et Gilat 1994). D'autre part, les résultats concernant l'expression des gènes *spgp* et *mdr2* suivant l'infusion de l'AB cholestatique ATLC s'avèrent très intéressants. La poursuite des travaux dans ce domaine, c'est-à-dire de procéder à une évaluation densitométrique des gels afin de quantifier les protéines, et éventuellement d'étudier les réactions transcriptionnelles des gènes, permettraient de caractériser davantage les mécanismes impliqués dans les fonctions sécrétoires du canalicule de l'hépatocyte dans des conditions cholestatiques.

En ce qui concerne l'expression du gène *mdr2* qui est maintenu malgré l'infusion de l'AB toxique, les perspectives de recherche sur les phospholipides alimentaires quant à la protection potentielle contre des pathologies hépatiques telles que PFIC de type 3 s'avèrent très prometteuses. Ce type de cholestase, causée par une mutation du gène MDR3, induit un arrêt ou une diminution de la sécrétion des phospholipides dans la bile tandis que la sécrétion des AB reste stable, rendant la bile plus toxique. Des polymorphismes dans le gène MDR3 pourraient également prédisposées les femmes enceintes à ce type de cholestase par une susceptibilité augmentée due aux hormones sexuelles endogènes et leurs métabolites. Une régulation à la hausse des transporteurs protéiques de la membrane canaliculaire, tels que les P-glycoprotéines, pourrait être

induit par un enrichissement en phospholipides dans la diète. Ainsi, ce régime alimentaire pourrait atténuer les effets néfastes au niveau du foie et peut-être retarder la transplantation hépatique chez les personnes atteintes de la PFIC de type 3.

L'expression de certains transporteurs protéiques, tels que le SR-B1, s'inscrivent également parmi les perspectives de recherche d'intérêt qui pourraient être poursuivies avec ce type d'intervention nutritionnelle. En effet, ce transporteur semble être impliqué dans la capture hépatique du cholestérol libre lié aux HDL ainsi que dans le transport de cette lipoprotéine vers la sécrétion biliaire. Une régulation à la hausse de ce transporteur par les phospholipides alimentaires viendrait appuyer notre hypothèse qui propose que la mobilisation des lipides vers la bile, notamment le cholestérol, est grandement associée aux HDL. Cet afflux de lipides vers la bile serait responsable des effets hypocholestérolémiantes et hépatoprotecteurs observés chez les animaux nourris avec cette diète, et ce en période de base ou de cholestase.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J. Biol. Chem.* 274:17159-17163, 1999.
- Accatino L, Figueroa C, Pizarro M, Solis N. Enhanced biliary excretion of canalicular membrane enzymes in estrogen-induced and obstructive cholestasis, and effects of different bile acids in the isolated perfused rat liver. *J Hepatol.* 22:658-670, 1995.
- Accatino L, Pizarro M, Solis N, Figueroa C. Cholestasis is associated with a marked increase of bile acid-mediated release of canalicular membrane enzymes into bile. *Gastroenterol.* 106:855A, 1994.
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, et al. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518-520, 1996.
- Agellon LB, Torchia EC. Intracellular transport of bile acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1486:198-209, 1999.
- Agellon LB, Walkey CJ, Vance DE, Kuipers F, Verkade HJ. The unique acyl specificity of biliary phosphatidylcholines in mice is independent of their biosynthetic origin in the liver. *Hepatol.* 30:725-729, 1999.
- Albright CD, Lui R, Bethea TC et al. Choline deficiency induces apoptosis in SV40-immortalized CWSV-1 rat hepatocytes in culture. *FASEB J.* 10:510, 1996.
- Allen D, Kallen K. Transport of lipids to the plasma membrane in animal cells. *Prog. Lipid. Res.* 32:195-219, 1993.
- Alpini G, Glaser S, Robertson W, Rodgers R, Phinizy JL, Lasater J et al. Large but not small intrahepatic bile duct units are involved in secretion-regulated ductal bile secretion in normal rat liver. *Am. J. Physiol.* 272:G1064-G1074, 1997.
- Alpini G, Lenzi R, Zhai WR, Slott PA, Liu MH, Sarkozi L, Tavaloni N. Bile secretory function of intrahepatic biliary epithelium in the rat. *Am. J. Physiol.* 257:G124-G133, 1989.

- Alpini G, Phillips JO, LaRusso NF. The biology of biliary epithelia. Dans: The Liver biology and pathobiology. Third Edition; Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jackoby WB, Schachther DA and Shafritz DA. Eds. Raven Press, Ltd., New York, pp:623-645, 1994.
- Alvaro D, Alpini G, Jezequel AM, Bassoti C, Francis C, Fraioli F, et al. Role and mechanisms of acetylcholine in the regulation of cholangiocyte secretory functions. *J. Clin. Invest.* 100:1349-1362, 1997.
- Alvaro D, Angelico M, Cantafora A, Di Base A, De Santis A, Bracci F, Minervini G, Ginanni Corradini S, Attili AF and Copacaccia L. Biliary secretion of phosphatidylcholine and its molecular species in cholecystectomized t-tube patients: Effects of bile and hydrophilicity. *Biochem. Med. Meta. Biol.* 36:125-135, 1986.
- Alvaro D, Cantafora A, Attili AF, et al. Relationship between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B:551-554, 1986b
- Alvaro D, Benedetti A, Gigliozzi A, Bini A, Furfaro S, Bassotti C, La Rosa T, Jezequel AM, Copacaccia L. Effect of Brefeldin A on transcytotic vesicular pathway and bile secretion: a study on the isolated perfused rat liver and isolated rat hepatocyte couplets. *Hepatology.* 21:450-459, 1995.
- Anwer MS, Hegner D. Importance of solvent drag and diffusion in bile acid-dependent bile formation: ion substitution studies in isolated perfused rat liver. *Hepatology.* 2:580-586, 1982.
- Arrese M, Pizarro M, Solis N, Accatino L. Adaptive regulation of hepatic bile salt transport: role of bile salt hydrophobicity and microtubule-dependent vesicular pathway. *J. Hepatology.* 26:694-702, 1997.
- Arrese M, Pizarro M, Solis N, Koenig C, Accatino L. Enhanced biliary excretion of canalicular membrane enzymes in ethynylestradiol-induced cholestasis: Effects of ursodeoxycholic acid administration. *Biochem. Pharmacology.* 50:1223-1232, 1995.
- Bahar RJ, Stolz A. Bile acid transport. *Gastroenterology. Clin. North. Amer.* 28:27-58, 1999.
- Baiocchi L, LeSage G, Glaser S, Alpini G. Regulation of cholangiocyte bile secretion. *J. Hepatology.* 31:179-191, 1999.

- Balabaud C, Kron KA, Gumucio J. The assessment of the bile salt-nondependent fraction of canalicular bile water in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 89:393-399, 1977.
- Ballatori N, Truong AT. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J. Physiol.* 263:G617-G624, 1992.
- Ballatori N, Truong AT. Relation between biliary glutathion excretion and bile acid independent flow. *Am. J. Physiol.* 256:G22-G30, 1989.
- Barnwell SG, Lowe PJ, Coleman R. Effect of taurochenodeoxycholate or tauroursodeoxycholate upon biliary outputs of phospholipid and plasma membrane enzymes, and the extent of cell damage in isolated perfused rat livers. *Biochem. J.* 216:107-11, 1983.
- Barnwell SG, Godfrey PP, Lowe PJ, Coleman R. Biliary protein output by isolate perfused rat livers. Effects of bile salts. *Biochem. J.* 210:549-557, 1983b.
- Barnwell SG, Lowe PJ, Coleman R. The effects of colchicine on secretion into bile of bile salts, phospholipid, cholesterol and plasma membrane enzymes: Bile salts are secreted unaccompanied by phospholipids and cholesterol. *Biochem. J.* 220:723-731, 1984.
- Barnwell SG, Tuchweber B, Yousef IM. Biliary lipid secretion in the rat during infusion of increasing doses of unconjugated bile acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 922:221-233, 1987.
- Barnwell SG, Yousef IM, Tuchweber B. The effect of colchicine on the development of lithocholic acid-induced cholestasis. A study of the role of microtubules in intracellular cholesterol transport. *Biochem. J.* 236:345-350, 1986.
- Bartles JR, Feracci HM, Stieger B, Hubbard AL. Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: Comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J. Cell. Biol.* 105:1241-1251, 1987.
- Berr F, Meier PJ, Stieger B. Evidence for the presence of a phosphatidylcholine translocator in isolated rat liver canalicular plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 268:3976-3979, 1993.
- Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G et al. Inhibition of bile flow, hepatobiliary exocytosis, and mrp2-insertion into the canalicular membrane by taurolithocholic

acid is reversed by tauroursodeoxycholic acid in the perfused rat liver. *Hepatol.* 30:463A, 1999.

- Beuers U, Nathanson MH, Isales CM, Boyer JL. Tauroursodeoxycholic acid stimulates hepatocellular exocytosis and mobilizes extracellular Ca^{++} mechanisms defective in cholestasis. *J. Clin. Invest.* 92:2984-2993, 1993.
- Biagi PL, Bordoni A, Hrelia S, Celadon M, Turchetto E. The effect of dietary polyenylphosphatidylcholine on microsomal delta-6-desaturase activity, fatty acid composition and microviscosity in rat liver under oxidative stress. *J. Nutr Biochem.* 4:690-694, 1993.
- Bilhartz LE, Dietschy JM. Bile salt hydrophobicity influences cholesterol recruitment from rat liver in vivo when cholesterol synthesis and uptake are constant. *Gastroenterol.* 95:771-779, 1988.
- Billington D, Coleman R. Effects of bile salts on human erythrocytes. Plasma membrane vesiculation, phospholipid solubilization, and their possible relationships to bile secretion. *Biochim. Biophys. Acta.* 509:33-47, 1978.
- Bishop WR, Bell RM. Assembly of phospholipids intracellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Rev. Cell. Biol.* 4:579-610, 1988.
- Bjorkhem I, Skrede S, Buchmann MS, East C, Grundy S. Accumulation of 7alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one and cholesta-4,6-dien-3-one in patients with CTX. Effects with treatment with chenodeoxycholic acid. *Hepatol.* 7:226-271, 1987.
- Blaton V, Soetewey F, Vandamme D, Declercq B, Peeters H. Effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on human types II and IV hyperlipoproteinemias. *Artery* 2:309-325, 1976.
- Bonvicini F, Gautier A, Gardiol D, Borel GA. Cholesterol in acute cholestasis induced by tauroolithocholic acid. A Cytochemical study in transmission and scanning electron microscopy. *Lab. Invest.* 38:487-495, 1978.
- Borst P, Zelcer N, van Helvoort A. ABC transporters in lipid transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1486:128-144, 2000.
- Botham KM, Bravo E. The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models. *Prog. Lipid. Res.* 34:71-97, 1995.

- Bouchard G, Tuchweber B, Yousef IM. Bile salt independent flow during bile salt-induced choleresis and cholestasis in the rat: Role of biliary thiol secretion. *Liver* 20:27-37, 2000.
- Bouchard G, Yousef IM, Tuchweber B. Decreased biliary glutathione content is responsible for the decline in bile salt-independent flow induced by ethinyl estradiol in rats. *Toxicol. Lett.* 74:221-233, 1994.
- Boyer JL. New concepts of mechanisms of hepatic bile formation. *Physiol. Rev.* 60:303-326, 1980.
- Boyer JL, Graf J, Meier PJ. Hepatic transport systems regulating pH_i, cell volume, and bile secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 54:415-438, 1992.
- Bravo E, Botham KM, Mindham MA, Mayes PA, Marinelli T, Cantafora A. Evaluation in vivo of the differential uptake and processing of high-density lipoprotein unesterified cholesterol and cholesteryl ester in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1215:93-102, 1994.
- Bravo E, Cantafora A, Argiolas L. Hepatic uptake and metabolism of free cholesterol from different lipoprotein classes. An in vivo study in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1003:315-320, 1989.
- Bravo E, Cantafora A. Hepatic uptake and processing of free cholesterol from different lipoproteins with and without sodium taurocholate administration. An in vivo study in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1045:61-67, 1990.
- Bravo E, Ortu G, Cantafora A, Lambert MS, Avella M, Mayes PA, Botham KM. Comparison of the hepatic uptake and processing of cholesterol from chylomicrons of different fatty acid compositions in the rat in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.* 1258:328-336, 1995.
- Bremer J, Greenberg DM. *Biochim. Biophys. Acta.* 46:205-216, 1961.
- Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bandayan M, Lévy E. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatol.* 29:1809-1817, 1999.
- Brunet S, Thibault L, Lepage G, Seidman EG, Dubé N, Lévy E. Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free. Radic. Biol. Med.* 28:46-54, 2000.

- Buchman AL, Dubin M, Jenden D, Moukarzel A, Rock MH, Rice K, Gornbein J, Ament ME, Eckhart CD. Lecithin increases plasma free choline and decreases hepatic steatosis in long-term total parenteral nutrition patients. *Gastroenterol.* 102:1363-1370, 1992.
- Cali JJ, Russell DW. Characterization of human sterol 27-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 266:774-778, 1991.
- Canty DJ, Zeisel S. Lecithin and choline in human health and disease. *Nutr. Rev.* 52:327-339, 1994.
- Carey MC, Duane WC. Enterohepatic circulation. Dans: *The liver: Biology and pathobiology.* 3rd ed., Arias IM, Boyer JL, Fausto N, et al. Eds. Raven Press, New York, pp 719-67, 1994.
- Carey MC, Small DM. The physical chemistry of cholesterol solubility in bile. Relationship to gallstone formation and dissolution in man. *J. Clin. Invest.* 61:998-1026, 1978.
- Carulli N, Bertolotti M, Carubbi F, Concari M, Martella P, Carulli L, Loria P. Effect of bile salt pool composition on hepatic and biliary functions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14:S14-S18, 2000.
- Castuma CE, Brenner RR. Effect of dietary cholesterol in microsomal membrane composition, dynamics and kinetic properties of UDP-glucuronyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 855:231-242, 1986.
- Chang TY, Chang CC, Cheng D. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annual. Rev. Biochem.* 66:613-638, 1997.
- Chanussot F, Lafont H, Hauton J, Tuchweber B, Yousef IM. Studies on the origin of biliary phospholipid. Effect of dehydrocholic acid and cholic acid infusions on hepatic and biliary phospholipids. *Biochem. J.* 270:691-695, 1990.
- Chautan M, Termine E, Amirayan N, Leonardi J, Pauli AM, Portugal H, Lafont H. Compared effect of n-3 and n-6 dietary fatty acids on rat intestinal acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity. *Scand. J. Gastroenterol.* 24:632-640, 1989.
- Childs MT, Bowlin JA, Ogilvie JT, Hazzard wr, Albers JJ. The contrasting effects of a dietary soya lecithin product and corn oil on lipoprotein lipids in normolipidemic and familial hypercholesterolemic subjects. *Atherosclerosis* 38:217-228, 1981.

- Childs S, Yeh RL, Georges E, Ling V. Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer. Res.* 55:2029-2034, 1995.
- Clarke CF, Folgelman AM, Edwards PA. Diurnal rhythm of rat liver mRNAs encoding HMG-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 259:10439-10447, 1984.
- Clark SB, Clark VE, Small DM. Effects of lecithin ingestion on plasma and lymph lipoproteins of normo and hyperlipemic rats. *Am. J. Physiol.* 241:422-430, 1981.
- Clayton PT, Kalter DC, Atherton DJ, Besley GT, Broadhead DM. Peroxisomal enzyme deficiency in X-linked dominant Conradi-Hunermann syndrome. *J. Inherit. Metab. Dis.* 12:S358-S360, 1989.
- Clayton PT, Patel E, Lawson AM, Carrithers RA, Tanner MS, Standvik B, Egestab B, Sjovall J. 3 oxo-delta 4 bile acids in liver disease. *Lancet* 1:1283-1284, 1988.
- Cobb M, Turkki P, Linscheer W, Raheha K. Lecithin supplementation in healthy volunteers. Effect on cholesterol esterification and plasma, and bile lipids. *Nutr. Metab.* 24:228-237, 1980.
- Cohen DE. Hepatocellular transport and secretion of biliary phospholipids. *Semin. Liver. Dis.* 16:191-200, 1996.
- Cohen DM, Angelico M, Carey MC. Quasielastic light scattering evidence for vesicular secretion of biliary lipids. *Am. J. Physiol.* 257:G1-G8, 1989.
- Cohen DE, Carey MC. Physical chemistry of biliary lipids during bile formation. *Hepatology.* 12:143S-148S, 1990.
- Cohen DE, Carey MC. Acyl chain unsaturation modulates distribution of lecithin molecular species between mixed micelles and vesicles in model bile. Implications for particles structures and metastable cholesterol solubilities. *J. Lipid. Res.* 32:1291-1302, 1991.
- Cohen DE, Green RM. Cloning and characterization of a cDNA encoding the specific phosphatidylcholine transfer protein from bovine liver. *Gene* 163:327-328, 1995.
- Cohen DE, Leighton LS, Carey MC. Bile salt hydrophobicity controls biliary vesicle secretion rates and transformations in native bile. *Am. J. Physiol.* 263:G386-G395, 1992.

- Cohen DE, Leonard MR, Carey MC. In vitro evidence that phospholipid secretion into bile may be coordinated intracellularly by the combined actions of bile salts and the specific phosphatidylcholine transfer protein of liver. *Biochem.* 33:9975-9980, 1994.
- Cohen DE, Thurston GM, Chamberlin RA, Benedek GB, Carey MC. Laser light scattering evidence for a common wormlike growth structure of mixed micelles in bile salt- and straight-chain detergent-phosphatidylcholine aqueous systems: Relevance to the micellar structure of bile. *Biochem.* 37:14798-14814, 1998.
- Coleman R, Rahman K. Lipid flow in bile formation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1125:113-133, 1992.
- Combettes L, Berthon B, Claret M. Tauroolithocholate-induced Ca^{2+} release is inhibited by phorbol esters in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* 287:891-896, 1992.
- Cooper AD. Role of the liver in the degradation of lipoproteins. *Gastroenterol.* 88:192-205, 1985.
- Cornacchia L, Domdey H, Mossner J, Berr F. Expression of a non-MDR2-coded liver phosphatidylcholine membrane transport protein in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 231:277-282, 1997.
- Cornell R. Chemical cross-linking reveals a dimeric structure for CTP-phosphocholine cytidyltransferase. *J. Biol. Chem.* 264:9077-9082, 1989.
- Crawford JM. Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion. *Semin. Liver. Dis.* 16:169-189, 1996.
- Crawford JM, Berken CA, Gollan JL. Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of bile salts and biliary lipid: Implications for intracellular vesicular transport. *J. Lip. Res.* 29:144-156, 1988.
- Crawford JM, Möckel GM, Crawford AR et al. Imaging biliary lipid secretion in the rat: Ultrastructural evidence for vesiculation of the hepatocyte canalicular membrane. *J. Lipid Res.* 36:2147-2163, 1995.
- Crawford JM, Vinter DW, Gollan JL. Taurocholate induces pericanalicular localization of C6-NBD-ceramide in isolated hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 260:G119-G132, 1991.

- Cui Z, Bance JE, Chen MH, Voelker DR, Vance DE. Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. *J. Biol. Chem.* 268:16655-16663, 1993.
- Cui Z, Houweling M, Vance DE. A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 269:24531-24533, 1994.
- Cui Z, Vance DE. Expression of phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase-2 is markedly enhanced in long term choline-deficient rats. *J. Biol. Chem.* 271:2839-2843, 1996.
- Dahlstrom-King L, Plaa GL. Effect of inhibition of protein synthesis on cholestasis induced by tauro lithocholate, lithocholate and a manganese-bilirubin combination in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 38:2543-2549, 1989.
- DeLong CJ, Shen Y-J, Thomas MJ, Cui Z. Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP-choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *J. Biol. Chem.* 274:29683-29688, 1999.
- Devaux PF. Phospholipid translocation in the endoplasmic reticulum. *Sub-Cellul. Biochem.* 21:273-285, 1993..
- De Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:282-287, 1998.
- Dietschy JM, Spady DK. Regulation of low density lipoprotein levels in animals and men with particular emphasis in the role of the liver, Dans: Receptor-mediated uptake in the liver. pp:57-95, 1986.
- Dietschy JM, Turley SD, Spady DK: Role of the liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different abnormal species, including humans. *J. Lip. Res.* 34:1637-1659, 1993.
- Drevon CA, Engelhorn SC, Steinberg D. Secretion of very low density lipoproteins enriched in cholesteryl esters by cultured rat hepatocytes during stimulation of intracellular cholesterol esterification. *J. Lip. Res.* 21:1065-1071, 1980.

- Drew R, Priestley BG. Cholestatic properties of varied bile salts. *Experientia*. 35:809-811, 1979.
- El-Seaidy AZ, Mills CO, Elias E, Crawford JM. Lack of evidence for vesicle trafficking of fluorescent bile salts in rat hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol*. 272:G298-G309, 1997.
- Erickson SK, van Zuiden PEA. Effects of bile salts on rat hepatic acyl CoA:cholesterol acyltransferase. *Lipids* 30:911-915, 1995.
- Erlinger S. Bile flow. Dans: . *The liver: Biology and Pathobiology*. 2nd edition. Arias IM, Jacoby WB, Popper H, Schchter D, Shafritz DA. Eds Raven Press, New York, pp:643-770, 1994.
- Erlinger S. Do intracellular organelles have any role in transport of bile acids by hepatocytes? *J. Hepatol*. 24:88, 1996.
- Esterman AL, Baum H, Javitt NB, Darlington GJ. 26-hydroxycholesterol: Regulation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase activity in chinese hamster ovary cell culture. *J. Lipid. Res*. 24:1304-1309, 1983.
- Fluiter K, Sattler W, De Beer MC, Connell PM, van der Westhuyzen DR, van Berkel TJ. Scavenger receptor B1 mediates the selective uptake of oxidized cholesterol esters by rat liver. *J. Biol. Chem*. 274:8893-8899, 1999.
- Frijters CM, Ottenhoff R, van Wijland MJ, van Nieuwkerk C, Groen AK, Oude Elferink RP. Influence of bile salts on hepatic mdr2 P-glycoprotein expression. *Adv. Enzyme. Regul*. 36:351-363, 1996.
- Frijters CM, Ottenhoff R, van Wijland MJ, van Nieuwkerk C, Groen AK, Oude Elferink RP. Regulation of mdr2 P-glycoprotein expression by bile salts. *Biochem. J*. 321:389-395, 1997.
- Garrett RG, Grisham CM. Biosynthèse des lipides. Dans: *Biochimie*. Garrett RG, Grisham CM. De Boeck Université s.a., Bruxelles, pp: ,2000.
- Gerbes AL, Arendt RM, Paumgartner G. Atrial natriuretic factor. Possible implications in liver disease. *J. Hepatol*. 5:123-132, 1987.
- Gerloff T, Stiegler B, Hagenbuch B, Landmann L Meier PJ. The sister P-glycoprotein of rat liver mediates ATP-dependent taurocholate transport. *Hepatol*. 26:358A, 1997.

- Gerloff T, Stiegler B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Meier PJ. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J. Biol. Chem.* 273:10046-10050, 1998.
- Glickman RM, Savasin SM. Lipoprotein metabolism. Dans: *The liver: Biology and Pathology*, Third Edition. Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jackoby WB, Schachter DA and Shafritz DA. Eds. Raven Press, New York, pp:391-413, 1994.
- Glomset JA. Dans: *Blood lipids and lipoproteins*, pp:745-787, 1968.
- Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid. Res.* 37:693-707, 1996.
- Gratton F, Weber AM, Tuchwever B, Mozarain R, Roy CC, Yousef IM. Effect of chronic administration of tauroolithocholate on bile formation and liver ultrastructure in the rat. *Liver* 7:130-137, 1987.
- Gregory DH, Vlahcevic ZR, Schatzki P, Swell P. Mechanism of secretion of biliary lipids. I. Role of bile canalicular and microsomal membranes in the synthesis and transport of biliary lecithin and cholesterol. *J. Clin. Invest.* 55:105-114, 1975.
- Greten J, Raetzer H, Stiehl A, Schettler G. The effect of polyunsaturated phosphatidylcholine on plasma lipids and fecal sterol excretion. *Atherosclerosis* 36:81-88, 1980.
- Gupta S, Todd Stravitz R, Pandak WM, Müller M, Vlahcevic Z, Hylemon PB. Regulation of multidrug resistance 2 P-glycoprotein expression by bile salts in rats and in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatol.* 32:341-347, 2000.
- Gurantz D, Hofmann AF. Influence of bile acid structure on bile flow and biliary lipid secretion in the hamster. *Am. J. Physiol.* 247:G736-G748, 1984.
- Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M et al. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:10629, 1991.
- Halloran LG, Schwartz CC, Vlahcevic ZR, Nisman RM, Swell L. Evidence for high density lipoprotein-free cholesterol as the primary precursor for bile acid synthesis in man. *Surgery* 84:1-7, 1978.

- Hamilton RL. Apolipoprotein-B-containing plasma lipoproteins in health and in disease. *TCM*. 3:131-139, 1994.
- Hampton RY. Genetic analysis of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase regulated degradation. *Curr. Opin. Lipid*. 9:93-97, 1998.
- Hardison WGM, Apter JT. Micellar theory of biliary cholesterol excretion. *Am. J. Physiol*. 222:61-67, 1972.
- Hardison WGM, Lowe PJ, Snanahan M. Effect of molecular charge on para- and transcellular access of horseradish peroxidase into rat bile. *Hepatol*. 9:866-871, 1989.
- Hayakawa T, Ng OC, Ma A, Boyer JL. Taurocholate stimulates transcytotic vesicular pathways labeled by horseradish peroxidase in the isolated perfused rat liver. *Gastroenterol*. 99:216-228, 1990.
- Hedenborg G, Norman A, Ritzen A. Lipoprotein-bound bile acids in serum from healthy men, postprandially and during fasting. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*. 48:241-245, 1988.
- Heuman DM. Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. *J. Lipid. Res*. 30:719-730, 1989.
- Heuman DM, Hylemon PB, Vlahcevic ZR. Regulation of bile acid synthesis: III. Correlation between biliary bile salt hydrophobicity index and the activities of enzymes regulation cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *J. Lipid Res*. 30:1161-1171, 1989.
- Higgins CF. Flip-flop: The transmembrane translocation of lipids. *Cell* 79:393-395, 1994.
- Higgins JP, Flicker L. Lecithin for dementia and cognitive impairment. *Cochrane. Database Syst. Rev*. CD001015 (2), 2000.
- Hoeg JM, Demosky SJ jr, Edge SB, Gregg RE, Osborne J jr, Brewer HB jr. Characterization of a human hepatic receptor for HDL. *Arteriosclerosis* 5:228-235, 1985.
- Hofmann AF. Bile Acid. Dans: *The liver: Biology and Pathobiology*. 2nd edition. Arias IM, Jacoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA. Eds Raven Press, New York, pp:677-718, 1994.
- Holzinger F, Scheingart CD, Ton-Nu HT, Cerre C, Steinbach JH, Yeh HZ, Hofmann AF. Transport of fluorescent bile acids by the isolated

- perfused rat liver: Kinetics, sequestration and mobilization. *Hepatol.* 28:510-520, 1998.
- Hubbard AL, Stieger B, Bartles JR. Biogenesis of endogenous plasma membrane proteins in epithelial cells. *Annu. Rev. Physiol.* 51:755-770, 1989.
 - Ide T, Hirabayashi S, Kano S, Sugano M. Soybean phospholipid-dependent reduction in triacylglycerol concentration and synthesis in the liver of fasted-refed rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1124:163-170, 1992.
 - Ide T, Murata M, Moriuchi M. Microsomal triacylglycerol synthesis and diacylglycerol concentration in the liver of rats fed with soybean and egg yolk phospholipids. *Biosci. Biothech. Biochem.* 56:732-735, 1992b.
 - Ide T, Murata M. Depressions by dietary phospholipids of soybean and egg yolk origins of hepatic triacylglycerol and fatty acid synthesis in fasted-refed rats. *Ann. Nutr. Metab.* 38:340-348, 1994.
 - Imaizumi K, Mawatari K, Murata M, Ikeda I, Sugano M. The contrasting effect of dietary phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine on serum lipoproteins and liver lipids in rats. *J. Nutr.* 113:2403-2411, 1983.
 - Imaizumi K, Murata M, Sugano M. Effect of dietary polyunsaturated phospholipid on the chemical composition of serum lipoproteins in rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 28:281-294, 1982.
 - Ishidate K, Iida K, Tadokoro K, Nadazawa Y. Evidence for the existence of multiple forms of choline (ethanolamine) kinase in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 833:1-8, 1985.
 - Ishii M, Vroman BT, LaRusso NF. Isolation and morphological characterization of bile duct epithelial cells from normal rat liver. *Gastroenterol.* 97:1236-1247, 1989.
 - Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y. Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am. J. Physiol.* 272:G16-G22, 1997.
 - Iwata T, Kimura Y, Tsutsumi K, Furukawa Y, Kimura S. The effect of various phospholipids on plasma lipoproteins and liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39:63-71, 1993.

- Jasen PL, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Muller M, et al. Hepatocanicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterol.* 117:1370-1379, 1999.
- Jasen PL. Primary biliary cirrhosis. Overview. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11:583-586, 1999.
- Jasen PL, Müller M. The molecular genetics of familial intrahepatic cholestasis. *Gut* 47:1-5, 2000.
- Ji Y, Wang N, Ramakrishnan R, Sehatek E, Huszar D, Breslow JL, Tall AR. Hepatic scavenger receptor B1 promotes rapid clearance of high density lipoprotein free cholesterol and its transport into bile. *J. Biol. Chem.* 274:33398-33402, 1999.
- Ji Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. Scavenger receptor B1 promotes HDL-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272:20982-20995, 1997.
- Jimenez MA, Scarino ML, Vignolini F, Mengheri E. Evidence that polyunsaturated lecithin induces a reduction in plasma cholesterol level and favorable changes in lipoprotein composition in hypercholesterolemic rats. *J. Nutr.* 120:659-667, 1990.
- Johnson LW, Hughes ME, Zilversmit DB. Use of phosphatidylcholine exchange protein of measure inside-outside transposition in phosphatidylcholine liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 375:176-185, 1975.
- Kagawa T, Watanabe N, Sato M, Nakama A, Nishizaki Y, Hosoi K, Takashimizu S, Uchiyama J, Kimura M, Matsuzaki S. Differential expression of multidrug resistance (mdr) and canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) genes following extrahepatic biliary obstructive in rats. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 44:443-452, 1998.
- Kakis G, Yousef IM. Pathogenesis of lithocholate and taurolithocholate induced intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterol.* 75:595-607, 1978.
- Kakyō M, Unno M, Tokui T, Nakagōni R, Nishio T, Iwasati H, et al. Molecular characterization and functional regulation of a novel rat liver-specific organic anion transporter rLst-1. *Gastroenterol.* 117:770-775, 1999.

- Kalmar GB, Kay RJ, Lachance A, Aebersold R, Cornell RB. Cloning and expression of rat liver CTP:phosphocholine cytidyltransferase: an amphiphatic protein that controls phosphatidylcholine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6029-6033, 1990.
- Kawamoto T, Akino T, Nakamura M, Mori M. Metabolism of individual molecular species of phosphatidylcholine in the liver subcellular membranes and bile. Origin of bile phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta.* 619:35-47, 1980.
- Kennedy EP, Weiss SB. *J. Biol. Chem.* 222:193-215, 1956.
- Kent C. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Prog. Lipid. Res.* 29:87-105, 1990.
- Kent C. CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1348:79-90, 1997.
- Kesaniemi YA, Grundy SM. Effects of dietary polyenylphosphaditylcholine on metabolism of cholesterol and triglycerides in hypertriglyceridemic patients. *Am. J. Clin. Nutr.* 43:98-107, 1986.
- Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1461:377-394, 1999.
- Kozarsky KF, Donahee MH, Rigotti A, Iqbal SN, Edeman ER, Krieger M. Overexpression of the HDL receptor SR-B1 alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature* 387:414-417, 1997.
- Kramer W, Nicol SB, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Fasold H. Characterization and chemical modification of the Na⁺-dependent bile acid transport system in brush border membrane vesicles from rabbit ileum. *Biochim. Biophys. Acta.* 1111:93-102, 1992.
- Kuhn WF, Gewirtz DA. Stimulation of taurocholate and glycocholate efflux from the rat hepatocyte by arginine vasopressin. *Am. J. Physiol.* 254:G732-G740, 1988.
- Kuipers F, Hardonk MJ, Vonk RJ, van der Meer R. Bile secretion of sulfated glycolithocholic acid is required for its cholestatic action in rats. *Am. J. Physiol.* 262:G267-G273, 1992.

- Kullak-Ublick GA, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport. *J. Hepatol.* 32(suppl):3-18, 2000.
- Lake JR, Licko V, van Dyke RW, Scharschmidt BF. Biliary secretion of fluid-phase markers by the isolated perfused rat liver. *J. Clin. Invest.* 76:676-684, 1985.
- Lazaridis KN, Pham L, Tietz P, Marinelli RA, deGroen PC, Levine Dawson PA, LaRusso NF. Rat cholangiocytes absorb bile acids at their apical domain by the ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J. Clin. Invest.* 100:2714-2721, 1997.
- Lazaridis KN, Tietz P, Wu T, Kip S, Dawson PA, LaRusso NF. Alternative splicing of the rat sodium/bile acid transporter changes its cellular localization and transport properties. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97:11092-11097, 2000.
- Lechowski R, Bielecki W, Sawosz E, Kawiec M, Klocinski W. The effect of lecithin supplementation on the biochemical profile and morphological changes in the liver of rats fed different animal fats. *Vet. Res. Commun.* 23:1-14, 1999.
- Leonard AN, Cohen DE. In vitro evidence that sterol carrier protein 2 may provide a scavenger pathway for phosphatidylcholine secretion into bile. *Hepatol.* 22:295A, 1995.
- Levy R, Herzberg GR. Effects of dietary fish oil and corn oil on bile flow and composition in rats. *Nutr. Res.* 15:85-98, 1995.
- Li YC, Wang DP, Chiang JYL. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver: cloning sequencing and regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase cDNA. *J. Biol. Chem.* 265:12012-12019, 1990.
- Lieber CS, DeCarli LM, Mak KM, Kim CI, Leo MA. Attenuation of alcohol-induced hepatic fibrosis by polyunsaturated lecithin. *Hepatol.* 12:1390-1398, 1990.
- Lieber CS, Robins SJ, Li J, DeCarli LM, Mak KM, Fasulo JM, Leo MA. Phosphatidylcholine protects against fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Gastroenterol.* 106:152-159, 1994.
- Liscum L, Faust JR. Compartmentation of cholesterol within the cell. *Curr. Opin. Lipidol.* 5:221-226, 1994.

- Lutz M, Bonilla S, Concha J, Alvarado J, Barraza P. Effect of dietary oils, cholesterol and antioxidant vitamin supplementation on liver microsomal fluidity and xenobiotic-metabolizing enzymes in rats. *Ann. Nutr. Metab.* 42:350-359, 1998.
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: Apolipoprotein structure and function. *J. Lipid. Res.* 25:1277-1294, 1984.
- Marinelli R.A, Roma M.G, Pelligrino J.M, Rodriguez Garay E.A. Tauroolithocholate-induced inhibition of biliary lipid and protein excretion in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 1125:44-48, 1992.
- Marrero I, Sanchez-Bueno A, Cobbold P, Dixon CJ. Tauroolithocholate and tauroolithocholate-3-sulphate exert different effects on cytosolic free Ca^{2+} concentration in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 300:383-386, 1994.
- Marsh J. Apoproteins of the lipoproteins in a nonrecirculating perfusate of rat liver. *J. Lipid. Res.* 17:85-90, 1976.
- Martin KO, Reiss AB, Lathe R, Javitt NB. 7 α -hydroxylation of 27-hydroxycholesterol : Biologic role in the regulation of cholesterol synthesis. *J. Lipid. Res.* 37:1053-1058, 1997.
- Marzolo MP, Rigotti A, Nervi F: Secretion of biliary lipids from the hepatocyte. *Hepatol.* 12:134S-142S, 1990.
- Mazer NA, Carey MC. Mathematical model of biliary lipid secretion: A quantitative analysis of physiological and biochemical data from man and other species. *J. Lipid. Res.* 25:932-953, 1984.
- Meier PJ. Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am. J. Physiol.* 269:G801, 1995.
- Mi LJ, Mak KM, Lieber CS. Attenuation of alcohol-induced apoptosis of hepatocytes in rats livers by polyenylphosphatidylcholine. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24:207-212, 2000.
- Miller NE, LaVille A, Crook D. Direct evidence that reverse cholesterol transport is mediated by high density lipoprotein in the rabbit. *Nature* 314:109-11, 1985.
- Mills CO, Milkiewicz P, Molloy DP, Baxter DJ, Elias E. Synthesis, physical and biological properties of lithocholyl-lysyl-fluorescein: A

- fluorescent monohydroxy bile salt analogue with cholestatic properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1336:485-496, 1997.
- Möckel GM, Gorti S, Tandon RK, et al. Microscope laser light-scattering of vesicles within canaliculi of rat hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 269:G73-G84, 1995.
 - Mourelle M, Guarner F, Malagelada JR. Polyunsaturated phosphatidylcholine prevents stricture formation in a rat model on colitis. *Gastroenterol.* 110:1093-1097, 1996.
 - Muller M, Jansen PL. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am. J. Physiol.* 272:G1285-1303, 1997.
 - Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology.* 14:551-566, 1991.
 - Navder KP, Baraona E, Lieber CS. Polyenylphosphatidylcholine attenuates alcohol-induced fatty liver and hyperlipemia in rats. *J. Nutr.* 127:1800-1806, 1997.
 - Ness GC, Keller RK, Pendleton LC. Feed-back regulation of hepatic HMG-CoA reductase activity by dietary cholesterol is not due altered mRNA levels. *J. Biol. Chem.* 266:14854-14857, 1991.
 - Nguyen LB, Shefer S, Salen G, Chiang JY, Patel M. Cholesterol 7 alpha-hydroxylase activities from human and rat liver are modulated in vitro posttranslationally by phosphorylation/dephosphorylation. *Hepatology.* 24:1468-1474, 1996.
 - Oelberg DG, Dubinsky WP, Adcock EW, Lester R. Calcium binding by lithocholic acid derivatives. *Am. J. Physiol.* 247:112-115, 1984.
 - Ogishima T, Deguchi S, Okuda K. Purification and characterization of cholesterol 7alpha-hydroxylase from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 262:7646-7650, 1987.
 - O'Mullane JE, Hawthorne JN. A Comparison of the effects of feeding linoleic acid-rich lecithin or corn oil on cholesterol absorption and metabolism in the rat. *Atherosclerosis.* 45:81-90, 1982.
 - Ostrow JD. Metabolism of bile salts in cholestasis in humans. Dans: *Hepatic transport and bile secretion: Physiology and pathophysiology.* Tavaloni N, Berk PD. Eds Raven Press, New York, pp: 673-712, 1993.

- Oude Elferink RPJ, Groen AK. The mechanism of biliary lipid secretion and its defects. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 28:59-74, 1999.
- Oude Elferink RPJ, Ottenhoff R, van Wijland MJ, Smit JJM, Schinkel AH, Groen AK. Regulation of biliary lipid secretion by mdr2 P-glycoprotein in the mouse. *J. Clin. Invest.* 95:31-38, 1995.
- Oude Elferink RPJ, Tytgat GNJ, Groen AK. The role of mdr2 P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport. *FASEB. J.* 11:19-28, 1997.
- Pakula R, Konikoff FM, Rubin M, Ringel Y, Peled Y, Tietz A, Gilat T. The effects of dietary phospholipids enriched with phosphatidylethanolamine on bile and red cell membrane lipids in humans. *Lipids* 31:295-303, 1996.
- Pal S, Davis PJ. Effects of different types of polyunsaturated fatty acids on cholesterol esterification in human fibroblasts. *Biochem. Int.* 25:281-288, 1991.
- Palmer KR, Gurantz D, Hofmann AF, Clayton LM, Hagey LR, Cecchetti S. Hypercholeresis induced by norchenodeoxycholate in biliary fistula rodent. *Am. J. Physiol.* 252:G219-G228, 1987.
- Paulusma C, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CTM, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RPJ. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science.* 271:1126-1127, 1996.
- Paulusma C, Kool M, BosmaPJ, et al. A mutation on the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 25:1539-1542, 1997.
- Paulusma C, Oude Elferink RPJ. The canalicular multispecific organic anion transporter and conjugated hyperbilirubinemia in rat and man. *J. Mol. Med.* 75:420-428, 1997.
- Peled Y, Gilat T. Effect of dietary phospholipids and their constituents on bile composition in rats and hamsters. *Hepatology.* 19:708-713, 1994.
- Polichetti E, Diaconescu N, Lechene de la Port P, Malli L, Portigal H, Pauli AM, Lafont H, Tuchweber B, Yousef IM, Chanussot F. Cholesterol-lowering effect of soyabean lecithin in normolipidaemic

- rats by stimulation of biliary lipid secretion. *Brit. J. Nutr.* 75:471-481, 1996.
- Portal I, Clerc T, Sbarra V, Portugal H, Pauli AM, Lafont H, Tuchweber B, Yousef IM, Chanussot F. Importance of high-density lipoprotein-phosphatidylcholine in secretion of phospholipid and cholesterol in bile. *Am. J. Physiol.* 264:G1052-G1056, 1993.
 - Porter TJ, Kent C. Purification and characterization of choline/ethanolamine kinase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 265:414-422, 1990.
 - Post SM, Zoetewij JP, Bos MHA, De Wit ECM, Havinca R, Kuipers F, Princen HMG. Acyl-coenzyme A:Cholesterol acyltransferase inhibitor, Avasimibe, stimulates bile acid synthesis and cholesterol 7 α -hydroxylase in cultured rat hepatocytes and in vivo in the rat. *Hepatology*. 30:491-500, 1999.
 - Puglielli L, Amigo L, Arrese M, Nunez L, Rigotti A, Garrido J, Gonzalez S, Mingrone G, Greco AV, Accatino L, Nervi F. Protective role of biliary cholesterol and phospholipid lamellae against bile acid-induced cell damage. *Gastroenterol.* 107:244-254, 1994.
 - Puglielli L, Rigotti A, Amigo L, et al. Evidence for the involvement of sterol carrier protein (SCP-2) in a rapid, microtubul-, and Golgi-independent transport of newly-synthesized cholesterol to bile. *Gastroenterol.* 108:A1150, 1995.
 - Puglielli L, Rigotti A, Amigo L, Nunez L, Greco AV, Santos MJ, Nervi F. Modulation of intrahepatic cholesterol trafficking: evidence by in vivo antisense treatment for the involvement of sterol carrier protein-2 in newly synthesized cholesterol transport into rat bile. *Biochem. J.* 317:681-687, 1996.
 - Putnam RW. Polarity of cell membranes. Dans: *Cell physiology Source Book*. Eds Academic Press, San Diego, pp:212-230, 1995.
 - Radomska A, Treat S, Little J. Bile acid metabolism and the pathophysiology of cholestasis. *Semin. Liver. Dis.* 13:219-234, 1993.
 - Redman CM, Banerjee D, Howell K, Palade GE. Colchicine inhibition of plasma protein release from rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.* 66:42-59, 1975.
 - Reichen J, Simon FR. Cholestasis. Dans: *The liver: Biology and Pathobiology*. 2nd edition. Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB,

- Schachter DH, Shafritz DA. Eds Raven Press, New York, pp:110-124, 1994.
- Renston RH, Maloney DG, Jones AL, Hradek GT, Wong KY, Goldfine ID. Bile secretory apparatus: evidence for a vesicular transport mechanism for proteins in the rat, using horseradish peroxidase and [¹²⁵I]insuline. *Gastroenterol.* 78:1373-1388, 1980.
 - Rioux F, Péréa A, Yousef IM, Lévy E, Malli L, Carrillo MC, Tuchweber B. Short-term feeding of a diet enriched in phospholipids increases bile formation and the bile acid transport maximum in rats. *Biochim. Biophys. Acta.* 1214:193-202, 1994.
 - Robin SJ, Amrstrong MJ. Biliary lecithin secretion. II. Effect of dietary choline and biliary lecithin synthesis. *Gastroenterol.* 70:397-402, 1976.
 - Robins SJ, Brunengraber H. Origin of biliary cholesterol and lecithin in the rat: Contribution of new synthesis and preformed hepatic stores. *J. Lipid. Res.* 23:604-608, 1985.
 - Robins SJ, Fasulo JM, Salen G, Patton GM. Preferential sterol transport from HDL to bile. *Hepatology.* 22:240A, 1995.
 - Robins SJ, Fasulo JM. HDL, but not other lipoproteins, provide a vehicle for sterol transport to bile. *J. Clin. Invest.* 99:380-384, 1997.
 - Roda A, Cappelleri G, Aldini R, Roda E, Barbara L. Quantitative aspects of the interaction of bile acids with human serum albumin. *J. Lip. Res.* 23:490-495, 1982.
 - Rou P, McMaster PD. Physiological causes for the varied character of stasis bile. *J. Exp. Med.* 34:75-95, 1921.
 - Roy CC, Tuchweber B, Weber AM, Yousef IM. Update on bile formation and on mechanism of bile acid-induced cholestasis. Dans: *Modern concepts in gastroenterology.* Vol.2. Shaffer E, Thomson ABR. Eds Plenum Press, New York, p:41-67, 1989.
 - Ruetz S, Gros P. Phosphatidylcholine translocase: A physiological role for the mdr2 gene. *Cell* 77:1071-1081, 1994.
 - Ruetz S, Gros P. Enhancement of Mdr-2-mediated phosphatidylcholine translocation by the bile salt taurocholate. Implications for hepatic bile formation. *J. Biol. Chem.* 270:25388-25395, 1995.

- Sakata N, Wu XJ, Dixon JL, Ginsberg HN. Proteolysis and lipid facilitated translocation are distinct but competitive processes that regulate secretion of apolipoprotein B in Hep G2 cells. *J. Biol. Chem.* 268:22967-22970, 1993.
- Samochowiec L, Kadlubowska D, Rozewicka L. Investigations in experimental atherosclerosis. Part 1. The effect of phosphatidylcholine on experimental atherosclerosis in white rats. *Atherosclerosis* 23:305-317, 1976.
- Sanghera JS, Vance DE. CTP:phosphocholine cytidyltransferase is a substrate for cAMP-dependent protein kinase in vitro. *J. Biol. Chem.* 264:1215-1223, 1989.
- Schmitz G, Muller G. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J. Lipid. Res.* 32:1539-1570, 1991.
- Schwartz CC, Berman M, Vlahcevic ZR, Halloran LG, Gregory DH, Swell L. Multicompartmental analysis of cholesterol metabolism in man. Characterization of the hepatic bile acid and biliary cholesterol precursor sites. *J. Clin. Invest.* 61:408-423, 1978.
- Schwartz CC, Halloran LG, Vlahcevic ZR, Gregory DH, Swell L. Preferential utilization of free cholesterol from high density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man. *Science* 200:62-64, 1978b.
- Schwartz CC, Vlahcevic ZR, Halloran LG, Gregory DH, Meek JB, Swell L. Evidence for the existence of definitive hepatic cholesterol precursor compartments for bile acids and biliary cholesterol in man. *Gastroenterol.* 69:1379-1389, 1975.
- Schwartz CC, Vlahcevic ZR, Berman M, Meadows LG, Nisman RM, Swell L. Central role of high density lipoprotein in plasma free cholesterol metabolism. *J. Clin. Invest.* 70:105-116, 1982.
- Schwarz M, Lund EG, Lathe R, Björkhem I, Russell DW. Identification and characterization of a mouse oxysterol 7 α -hydroxycholesterol cDNA. *J. Biol. Chem.* 272:23995-24001, 1997.
- Schwarz M, Lund EG, Russell DW. Two 7 α -hydroxylase enzymes in bile acid biosynthesis. *Curr. Opin. Lipidol.* 9:113-118, 1998.

- Sellinger M, Boyer JL. Physiology of bile secretion and cholestasis. Dans: Progress in liver disease, vol IX. Popper H, Schaffner F. Eds Grune & Graton Ltd, Orlando, pp:849-855, 1990.
- Sheng Z, Otani H, Brown MS, Goldstein JL. Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 hamster liver. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:935-938, 1995.
- Shepherd J, Stewart JM, Clark JG, Carr K. Sequential changes in plasma lipoproteins and body fat composition during polyunsaturated fat feeding in man. Br. J. Nutr. 44:265-271, 1980.
- Shin OH, Mar MH, Albright CD, et al. Methyl-group donors cannot prevent apoptotic death of rat hepatocytes induced by choline-deficiency. J Cell. Biochem. 64:196, 1997.
- Shneider BL, Dawson PA, Christie DM, Hardikar W, Wong WH, Sucky FJ. Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. J. Clin. Invest. 95:745-754, 1995.
- Simons LA. The effects of oral lecithin and clofibrate on cholesterol metabolism. Artery 4:167-182, 1978.
- Small DM. The formation of gallstones. Adv. Intern. Med. 16:234-264, 1970.
- Small DM. The physical chemistry of lipids. From alkanes to phospholipids. Eds Plenum Press, New York, pp: , 1986.
- Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, van der Valk MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. Cell 75:451-462, 1993.
- Smith AJ, Timmermans-Hereijgers JL, Roelofsen B, Wirtz KW, van Blitterswijk WJ, Smit JJ, Schinkel AH, Borst P. The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. FEBS. Lett. 354:263-266, 1994.
- Solari R, Schaerer E, Tallichet C, Braiterman LT, Hubbard AL, Kraehenbuhl JP. Cellular localization of the cleavage event of the

polymeric immunoglobulin receptor and fate of its anchoring domain in the rat hepatocyte. *Biochem. J.* 257:759-768, 1989.

- Spady DK, Kearney DM, Hobbs HH. Polyunsaturated fatty acids up-regulate hepatic scavenger receptor B1 expression and HDL-cholesteryl ester uptake in the hamster. *J. Lipid. Res.* 40:1384-1394, 1999.
- Spector AA, Mathur SN, Kaduce TL. Role of acylcoenzyme A: cholesterol o-acyltransferase in cholesterol metabolism. *Prog. Lip. Res.* 18:531-533, 1979.
- Stange EF. Principles of cholesterol and bile acid metabolism in the liver and small intestine. *Biochem. Soc. Trans.* 15:189-192, 1986.
- Stieger B, O'Neill B, Meier PJ. ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles. *Biochem. J.* 284:67-74, 1992.
- Stolz A, Sugiyama Y, Kuhlenkamp J et al. Identification and purification of a 36 kDa bile acid binder in human hepatic cytosol. *FEBS. Lett.* 177:31-35, 1984.
- Stolz A, Takikawa H, Ookhtens M, Kaplowitz N. The role of cytoplasmic proteins in hepatic bile acid transport. *Ann. Rev. Physiol.* 51:161-176, 1989.
- Stolz A, Takikawa H, Sugiyama Y, et al. 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase physiologic significance. *J. Clin. Invest.* 79:427, 1987.
- Stone BG, Erickson SK, Craig WY, Cooper AD. Regulation of rat biliary cholesterol secretion by agents that alter intrahepatic cholesterol metabolism. *J. Clin. Invest.* 76:1773-1781, 1985.
- Storch J, Schachter D. A dietary regimen alters hepatocyte plasma membrane lipid fluidity and ameliorates ethinyl estradiol cholestasis in the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 798:137-140, 1984.
- Strange RC. Hepatic bile flow. *Physiol. Rev.* 64:1055-1103, 1984.
- Strasberg SM, Petrunka CN, Ilson RG. The contribution of the extrahepatic bile ducts to bile formation. Comparison with the guinea pig. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 54:757-763, 1976.

- Strautnieks SS, Kagalqalla AF, Tanner MS, Knisely AS, Bull L, Freimer N, et al. Identification of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis PFIC2 on chromosome 2q24. *Am. J. Hum. Genet.* 61:630-633, 1997.
- Stravitz RT, Hylemon PB, Heuman DM. Transcriptional regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase by mRNA by conjugated bile acids in primary cultures or rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 268:13987-13993, 1993.
- Steinberg D. A docking receptor for HDL cholesterol esters. *Science.* 271:460-461, 1996.
- Suchy FJ, Sippel CJ, Anathanarayanan M. Bile acid transport across the hepatocyte canalicular membrane. *FASEB J.* 11:199-205, 1997.
- Svec F. Glucocorticoid receptor regulation. *Life Sci.* 36:2359-2366, 1985.
- Takikawa H, Sugiyama Y, Fernandez Checa JC, et al. Evidence that interference with binding to hepatic cytosol binders can inhibit bile acid excretion in rats. *Hepatology.* 23:1642-1649, 1996.
- Ter Welle HF, van Grent CM, Dekker W, Willebrands AF. The effect of soya lecithin on serum lipid values in type II hyperlipoproteinemia. *Acta. Med. Scand.* 195:267-271, 1974.
- Tijburg LBM, Grelen MJH, van Golde LGM. Regulation of the biosynthesis of triacylglycerol, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in the liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 1004:1-9, 1989.
- Tsuji H, König J, Rost D, et al. Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterol.* 117:653-660, 1999.
- Tuchweber B, Gabbiani G. Phalloidin-induced hyperplasia of actin filaments in rat hepatocytes. Dans: *The liver: Quantitative aspects of function and structure.* Preisig R, Bircher J, Paumgartner G. Edition Cantor, Aulendorf, pp:84-90, 1976.
- Tuchweber B, Weber AM, Roy CC, Yousef IM. Mechanisms of experimental induced intrahepatic cholestasis. Dans: *Progress in liver disease.* Popper M, Schaffner F. Eds Grune and Stratto, Orlando, p:164-178, 1986.

- Tuchweber B, Yousef IM, Ferland G, Perea A. Nutrition and bile formation. *Nutr. Res.* 16:1041-1080, 1996.
- Turley SD, Dietschy JM. The contribution of newly synthesized cholesterol to biliary cholesterol in the rat. *J. Biol. Chem.* 256:2438-2446, 1981.
- Turley SD, Dietschy JM: The metabolism and excretion of cholesterol by the liver. Dans: *The liver: biology and pathology.* Arias IM, Jacoby H, Popper D, Schachter D, Schafritz DA. Eds Raven Press, New York, pp:617-641, 1988.
- Ulloa N, Garrido J, Vervi F. Ultracentrifugal isolation of vesicular carriers of biliary cholesterol in native human and rat bile. *Hepatology.* 7:235-244, 1987.
- van Dyke RW, Stephens JE, Scharschmidt BF. Effects of ion substitution on bile acid-dependent and -independent bile formation by rat liver. *J. Clin. Invest.* 70:505-517, 1982.
- van Helvoort A, De Brouwer A, Ottenhof R, Brouwers JFHM, Wijnholds J, Beijnen JH, Rijneveld A, van der Poll T, van der Valk MA, Majoor D, Voorhout W, Wirtz KWA, Oude Elferink RP, Borst P. Mice without phosphatidylcholine transfer protein have no defects in secretion of phosphatidylcholine into bile or into the lung air-spaces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:11501-11506, 1999.
- van Meer G, Simons K. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J.* 5:1455-1464, 1986.
- van Nieuwkerk CM, Oude Elferink RP, Groen AK, Ottenhoff R, Tytgat GN, Dingemans KP, van den Bergk Weerman MA, Offerhaus GJA. Effects of ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted *mdr2* P-glycoprotein gene. *Gastroenterol.* 111:165-171, 1996.
- van Zuiden PE, Cooper AD, Erickson SK. Effects of lipoprotein composition on acyl coenzyme A:Cholesterol acyltransferase in vivo and in the perfused liver and on hepatic cholesterol secretion. *J. Lipid. Res.* 28:930-940, 1987.
- Vance DE. (ed.) *Phosphatidylcholine metabolism.* CRC Press, Boca Raton, Floride, pp.225-239, 1989.

- Vance DE, Trip EM, Paddon HB. An increase on cytoplasmic CTP accelerates the reaction catalyzed by CTP:phosphocholine cytidyltransferase in poliovirus-infected HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 255:1064-1069, 1980.
- Vance DE, Walkey CJ, Cui Z. Phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase from liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 1348:142-150, 1997.
- Vance JE, Vance DE. Does rat liver Golgi have the capacity to synthesize phospholipid for lipoproteins secretion? *J. Biol. Chem.* 263:5898-5909, 1988.
- Vendemiale G, Palmieri V, Palasciano G, Altomare E. Effect of glutathione administration on hepatic biliary and plasmatic glutathione levels in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 29:1034-1038, 1994.
- Verkade HJ, Fast DG, Rusinol AE, Scraba DG, Vance DE. Impaired biosynthesis of phosphatidylcholine causes a decrease in the number of very low density lipoprotein particles in the Golgi but not in the endoplasmic reticulum of rat liver. *J. Biol. Chem.* 268:24990-24996, 1993.
- Verkade HJ, Vonk RJ, Kuipers F. New insights into the mechanism of bile acid-induced biliary lipid secretion. *Hepatology.* 21:1174-1189, 1995.
- Vlahcevic RZ, Heuman DM, Hylemon PB. Regulation of bile acid synthesis. *Hepatology.* 13:590-600, 1991.
- von Dippe P, Amoui M, Stellwagen RH, Levy. The functional expression of sodium-dependent bile acid transport in Madin-Darby canine kidney cells transfected with the cDNA for microsomal epoxide hydrolase. *J. Biol. Chem.* 271:18176-18180, 1996.
- Vos TA, Hooiveld GT, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H, Jansen PL, Muller M. Up regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mrp1b and down-regulation of the organic anion transporter, mrp2, and the bile salt transporter, Spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology.* 28:1637-1644, 1998.
- Vu DD, Tuchweber B, Plaa GI, Yousef IM. Pathogenesis of lithocholate-induced intrahepatic cholestasis: Role of glucuronidation and hydroxylation of lithocholate. *Biochim. Biophys. Acta.* 1126:53-59, 1992.

- Vu DD, Tuchweber B, Raymond P, Yousef IM. Tight junction permeability and liver plasma membrane fluidity in lithocholate-induced cholestasis. *Exp. Mol. Pathol.* 57:47-61, 1992b.
- Wang R, Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, Helgason CD, Ackerley C, Phillips J, Ling V. Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98:2011-2016, 2001.
- Weinman SA, Graf J, Boyer JL. Voltage-driven, taurocholate-dependent secretion in isolated hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 256:G826-G832, 1989.
- Weinman SA, Graf J, Veith C, Boyer JL. Electroneutral uptake and electrogenic secretion of a fluorescent bile salt by rat hepatocyte couplets. *Am J. Physiol.* 264:G220-G230, 1993
- Wheeler HD, Mancusi-Ungaro PL. Role of bile ducts during secretion choleresis in dogs. *Am. J. Physiol.* 210:1153-1159, 1966
- Wielandt AM, Pizarro M, Solis M, Accatino L. Postcholestatic alkaline phosphatase activity after relief of bile duct obstruction in the rat. *Hepatology.* 18:179-187, 1993.
- Wilson TA, Meservey CM, Nicolosi RJ. Soy lecithin reduces plasma lipoprotein cholesterol and early atherogenesis in hypercholesterolemic monkeys and hamsters beyond linoleate. *Atherosclerosis* 140:147-153, 1998.
- Wirtz KWA. Phospholipid transfer proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60:73-99, 1991.
- Wirtz KWA, Zilversmit DB. Exchange of phospholipids between liver mitochondria and microsomes in vitro. *J. Biol. Chem.* 243:3596-3602, 1968.
- Wu AL, Windmueller HG. Relative contributions by liver and intestine to individual apolipoproteins in the rat. *J. Biol Chem.* 254:7316-7322, 1979.
- Xu G, Shneider BL, Shefer S, Nguyen LB, Batta AK, Tint GS, Arrese M, Thevananther S, Ma L, Stengelin S, Kramer W, Greenblatt D, Pcolinsky M, Salen G. Ileal bile acid transport regulates bile acid pool, synthesis, and plasma cholesterol levels differently in cholesterol-fed rats and rabbits. *J. Lip. Res.* 41:298-304, 2000.

- Yang L. Long term culture and characteristics of normal rat liver bile duct epithelial cells. *Gastroenterol.* 104:840-842, 1993.
- Yoon YB, Hagey LR, Hofman AF, Gurantz D, Michelotti EL, Steinbach JH. Effect of side-chain shortening on the physiological properties of bile acid: Hepatic transport and effect on biliary secretion of 23-nor-ursodeoxycholate in rodents. *Gastroenterol.* 90:837-852, 1986.
- 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.* 252:684-691, 1987.
- Yousef IM, Bloxham DL, Phillips MJ, Fisher MM. Liver cell plasma membrane lipids and the origin of biliary phospholipid. *Can. J. Biochem.* 53:989-997, 1975.
- Yousef IM, Bouchard G, Tuchweber B, Plaa GL. Mechanisms involved in bile acid-induced cholestasis. Dans: *Toxicology of the Liver*, 2nd ed. Plaa GL, Hewitt Wr. Eds. Taylor and Francis, Washington, pp:347-381, 1998.
- Yousef IM, Fisher MM. In vitro effect of free bile acids on the bile canalicular membrane phospholipids in the rat. *Can. J. Biochem.* 54:1040-1046, 1976.
- Yousef IM, Levittes M, Tuchweber B, Roy CC, Weber A. Lithocholic acid-cholesterol interactions in the rat liver plasma membrane fractions. *Biochim. Biophys. Acta.* 796:345-354, 1984.
- Yousef IM, Mignault D, Tuchweber B. Effect of complete sulfation of bile acids on bile formation: role of conjugation and number of sulfate groups. *Hepatol.* 15:438-445, 1992.
- Yousef IM, Mignault D, Weber AM, Tuchweber B. Influence of dehydrocholic acid on the secretion of bile acids and biliary lipids in rats. *Digestion* 45:40-51, 1990.
- Yousef IM, Tuchweber B. Effects of lithocholic acid on cholesterol synthesis and transport in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 796:336-344, 1984.
- Yousef IM, Tuchweber B, Vonk RK, Masse D, Audet M, Roy CC. Lithochate cholestasis: Sulfated glycolithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterol.* 80:233-241, 1981.

- Yousef IM, Tuchweber B, Weber A. Prevention of lithocholate-induced cholestasis by cycloheximide an inhibitor of protein synthesis. *Life Sci.* 33:103-110, 1983.
- Zeisel SH. Vitamin-like molecules. In *Modern Nutrition in health and disease*. Shils ME, Young VR. Eds, 7th ed. Philadelphia, Lee and Farber. pp:440, 1988.
- Zeisel SH. Nutriment, signal transduction and carcinogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 369:175-183, 1995.
- Zeisel SH. Choline: An essential nutrient for humans. *Nutrition.* 16:669-671, 2000.
- Zimniak P, Holsztynsla EJ, Lester R, Waxmn DJ, Radomska A. Detoxification of lithocholic acid. Elucidation of the pathways of oxidative metabolism in rat liver microsomes. *J. Lipid. Res.* 30:907-918, 1989.
- Zoltowska M, Delvin E, Paradis K, Seidman E, Lévy E. Bile duct cells: a novel model for the study of lipid metabolism and bile acid production. *Am. J. Physiol.* 276:G407-G414, 1999.

