

PROPRIETES SOLUBILISANTES ET STRUCTURE DES SOLUTIONS AQUEUSES DE SELS BILIAIRES DIHYDROXYLES

J. C. MONTET

Unité de recherches de pathologie digestive INSERM U31 46, Boulevard de la Gaye, 13009 Marseille, France

et

C. MERIENNE

Laboratoire de RMN, Batiment 220, Université de Paris-Sud. F 91405 Orsay, France

et

G. BRAM*

Groupe de recherche No. 12, CNRS, 2-8 rue Henri Dunant, F 94320 Thiais, France

(Received in France 29 September 1981)

Abstract—The solubilizing properties of aqueous solutions of isomeric bile salts, deoxycholate, chenodeoxycholate and ursodeoxycholate for naphthalene and cholesterol have been studied. For both molecules, ursodeoxycholate micelles have the poorest detergent power. Binding of naphthalene to micelles modifies the chemical shifts of the angular methyl groups of the bile salts as determined by ¹H NMR. A greater perturbation of the C₁₉ methyl signal relative to that of the C₁₈ methyl signal is observed with deoxycholate and chenodeoxycholate but not with ursodeoxycholate. These results suggest a distinct micellar structure for ursodeoxycholate.

Résumé—Les propriétés solubilisantes des solutions aqueuses des sels biliaires isomères, désoxycholate, chénodésoxycholate et ursodésoxycholate à l'égard du cholestérol et du naphthalène ont été étudiées. Il a été mis en évidence que les micelles d'ursodésoxycholate possédaient un pouvoir détergent très inférieur à celui des autres sels. La liaison du naphthalène aux micelles, étudiée par RMN du proton, modifie les déplacements chimiques des méthyles angulaires des sels biliaires. Une plus grande perturbation du signal du méthyle C₁₉ par rapport à celui du méthyle C₁₈ est observée en présence de désoxycholate et de chénodésoxycholate mais pas en présence d'ursodésoxycholate. Ces résultats suggèrent pour l'ursodésoxycholate une structure micellaire particulière.

Les sels biliaires interviennent dans des processus physiologiques importants: solubilisation du cholestérol et des phospholipides dans la bile, émulsification (en présence de lécithine) des lipides alimentaires, transport micellaire des produits de l'hydrolyse pancréatique vers la muqueuse intestinale.

Deux acides biliaires, les acides chenodesoxycholique et ursodesoxycholique présentent un grand intérêt en thérapeutique comme agents dissolvants des calculs biliaires cholestéroliques.^{1,2} Le rôle de "détergents biologiques" des sels biliaires est interprété³ par la formation d'agrégats possédant, en solution aqueuse, des propriétés tensio-actives et solubilisantes analogues à celles des micelles classiques. Cependant il a pu être montré⁴⁻⁶ que le processus d'agrégation est différent et plus complexe dans le cas des sels biliaires. En fait, alors que les tensio-actifs classiques sont caractérisés par une chaîne hydrophobe terminée par une tête polaire hydrophile, les sels biliaires présentent une structure stéroïdique avec une jonction *cis* des cycles A et B, une fonction carboxylate en 24 (cette fonction est conjuguée avec la glycine ou la taurine dans le foie) et une à trois fonctions hydroxyles en position 3,7 et/ou 12. Cela conduit à l'existence d'une face hydrophobe et d'une face hydrophile. Le modèle généralement accepté pour l'agrégation

en solution aqueuse des sels biliaires a été proposé par Small³ et fait intervenir une association dos à dos des faces hydrophobes; les "micelles primaires" ainsi formées, contenant jusqu'à 10 molécules peuvent ensuite s'associer entre elles par liaison hydrogène ("micelles secondaires"). Récemment, Mazer *et al.*⁷ ont montré que la formation des micelles secondaires était également sous la dépendance d'interactions hydrophobes répulsives entre le solvant et la surface de la micelle primaire.

Les sels de sodium des acides biliaires dihydroxylés isomères, desoxycholique (3 α , 12 α OH), chenodesoxycholique (3 α , 7 α OH) et ursodesoxycholique (3 α , 7 β OH) ne diffèrent que par la position et la stéréochimie des groupements OH (Fig. 1). Les propriétés des solutions aqueuses de ces sels isomères sont cependant très différentes, et en particulier, leurs pouvoirs solubilisants distincts à l'égard des lipides leur permettent de jouer un rôle spécifique des la régulation de l'absorption intestinale du cholestérol.^{8,9} Nous avons voulu examiner si ces divers pouvoirs solubilisants pouvaient être reliés à une différence de structure micellaire des sels biliaires isomères en solution. Pour cela nous avons d'une part mesuré la solubilité du cholestérol et du naphthalène dans les solutions de ces trois sels biliaires, d'autre part, nous avons examiné la perturbation des déplacements chimiques des protons des méthyles en C₁₈ et C₁₉ des squelettes stéroïdes par la dissolution de quantités croissantes de naphthalène selon une méthodologie proposée par Menger *et coll.*¹⁰

*Adresse actuelle: Laboratoire de Reactions Selectives sur Supports, Université de Paris-Sud. Bat. 410. F 91405 Orsay, France.

RESULTATS ET DISCUSSION

Solubilisation à l'équilibre du naphthalène et du cholestérol dans des solutions aqueuses de sels biliaires

Le Tableau 1 montre que: les trois sels biliaires ont un pouvoir solubilisant distinct; DCNa est un détergent légèrement plus actif que CDCNa mais très nettement plus efficace que UDCNa. Chaque espèce des sel biliaire dissout plus de naphthalène que de cholestérol. Les différences de comportement observées entre les sels biliaires sont beaucoup plus accusées en présence de cholestérol qu'en présence de naphthalène. Cette étude de solubilisation par les sels biliaires confirme les résultats obtenus avec d'autres molécules insolubles dans l'eau.¹¹ Il apparait que, dans la série des sels biliaires dihydroxylés étudiée, la position en 7 ou en 12 du groupement hydroxyle n'affecte pas beaucoup les propriétés solubilisantes dans la mesure où ces hydroxyles sont en position axiale; par contre l'orientation équatoriale des l'hydroxyle porté par le carbone 7 réduit considérablement les capacités solubilisantes. Les molécules de CDCNa et de DCNa présentent une face polaire distincte

d'une face hydrophobe, tandis qu'avec UDCNa, cette bipolarité nette est rompue à cause de la proximité du groupement 7β OH et des méthyles C_{18} et C_{19} .

Etude de la solubilisation du naphthalène par résonance magnétique nucléaire

Les résultats obtenus (Fig. 2) pour les solutions de naphthalène dans le DCNa et le CDCNa correspondent bien à ceux décrits par Menger et coll.¹⁰ pour des solutions 0.2 M d'acide glycodesoxycholique à pH = 8.00. Les résonances des protons des méthyles en C_{18} et C_{19} sont déplacées vers les champs forts lorsque croit la concentration de naphthalène dissoute et cet effet est beaucoup plus marqué pour les protons du méthyle en C_{19} que pour ceux du méthyle en C_{18} . Après Menger¹⁰ nous interprétons ce résultat comme indiquant:

—Que le naphthalène dissous est incorporé à l'intérieur de l'agrégat micellaire.

—Que le site d'incorporation du naphthalène est situé près de la jonction des cycles A et B (plus grande perturbation du méthyle en C_{19}). Le DCNa et le CDCNa

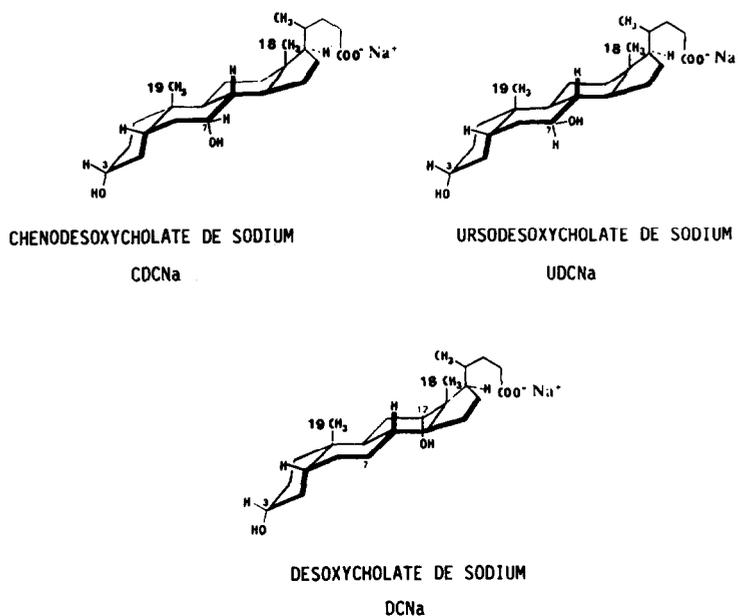


Fig. 1. Configuration spatiale des sels biliaires dihydroxylés: CDCNa ($3\alpha,7\alpha$ OH), UDCNa ($3\alpha,7\beta$ OH), DCNa ($3\alpha,12\alpha$ OH).

Tableau 1. Solubilité à l'équilibre du naphthalène et du cholestérol dans des solutions de sels biliaires

Sel biliaire	Naphthalène		Cholestérol	
	solubilité mM	rapport molaire SB ^x /1 naphthalène	solubilité mM	rapport molaire SB/1 cholestérol
UDCNa	3,70	54	0,50	396
CDCNa	14,50	13,8	9,55	21
DCNa	15,50	12,5	11,32	17,7

SB^x : Sel Biliaire

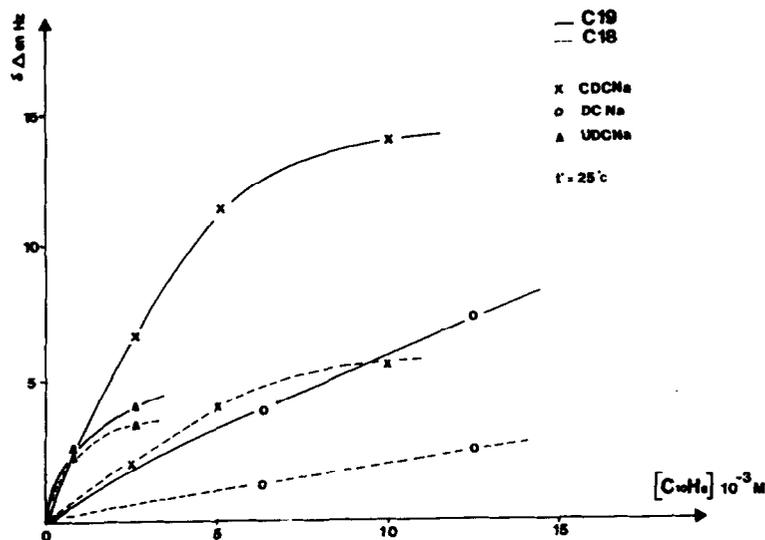


Fig. 2. Variation des déplacements chimiques des protons des méthyles C_{18} et C_{19} des sels biliaires en fonction de la concentration en naphthalène.

semblent donc bien former en solution aqueuse des agrégats micellaires dans lesquels le motif primaire correspond à une association des molécules par interactions hydrophobes, le "cœur" hydrophobe de la "micelle primaire" ainsi formée, intéressant la jonction des cycles A et B des molécules de DCNa ou de CDCNa.

Le comportement de UDCNa est très différent. Dans la limite relativement faible de solubilité du naphthalène on constate qu'il y a perturbation sensible mais très peu différente des déplacements chimiques des protons des méthyles en C_{18} et C_{19} . Ceci peut suggérer, soit que UDCNa ne forme pas d'agrégats micellaires en solution aqueuse,¹² soit que la structure des ces agrégats est distincte de celle du DCNa et du CDCNa. Des travaux récents^{13,14} viennent de montrer que UDCNa s'associe effectivement en solution aqueuse mais par ailleurs l'examen des modèles moléculaires indique clairement que le 7 OH équatorial de UDCNa est plus orienté vers la face hydrophobe du stéroïde, ce qui pourrait conduire à un "empaquetage" micellaire spécifique à cette molécule. Il faut cependant noter que les caractéristiques physiques micellaires: concentration micellaire critique et nombre d'agrégation sont semblables pour les espèces UDCNa et CDCNa.^{13,14} Les mauvaises propriétés solubilisantes de UDCNa à l'égard du naphthalène et du cholestérol, comparées à celles de DCNa et CDCNa semblent donc pouvoir s'interpréter raisonnablement et simplement par la formation d'agrégats de structure différente de celle correspondant au DCNa et au CDCNa. Un point important qui reste à étudier est la structure précise des micelles mixtes sel biliaire-cholestérol. Le cholestérol est-il, comme le naphthalène ou le pyrène,¹⁵ dissous dans le cœur hydrophobe des micelles de DCNa ou de CDCNa, ou bien y-a-t-il interactions hydrophobes avec les surfaces des ces mêmes micelles primaires?¹⁴

PARTIE EXPERIMENTALE

Matières premières

Les sels de sodium des acides desoxycholique et chenodesoxycholique sont des produits Calbiochem grade A

(99% et 97%). L'acide ursodesoxycholique (99%) est un don des établissements Roussel-Uclaf. Le cholestérol est un produit Sigma. La naphthalène, Na_2CO_3 , $NaHCO_3$ et $Na_2B_4O_7$ sont des produits Merk. NaOD 1 N et D_2O (99.8%) sont des produits du CEA (service des molécules marquées).

Mesures de solubilité

Solubilisation du naphthalène. A des solutions aqueuses 200 mM en sel biliaire, pH = 9.5, 0.05 M Na^+ on ajoute des cristaux de naphthalène finement broyés. Les tubes sont bouchés puis agités dans un bain-marie à 25° pendant 6 jours. La solubilité à l'équilibre est généralement atteinte dès le 3ème jour. Les mélanges biphasiques sont alors rapidement filtrés sur membrane de cellulose de porosité 5 μm ou sur laine de verre. La concentration du naphthalène dissous est mesurée à 276 nm au spectrophotomètre Jobin-Yvon. Le coefficient d'absorption molaire du naphthalène a été trouvé égal à 5.06×10^3 litre $mol^{-1} cm^{-1}$, une valeur tout à fait comparable à celle trouvée par Mukerjee.⁵

Solubilisation du cholestérol. On utilise une méthode de coprécipitation,⁹ en présence d'un léger excès de cholestérol. Les conditions de concentration en sel biliaire, de pH et de force ionique sont identiques à celles utilisées pour la solubilisation du naphthalène. Les mélanges sel biliaire-cholestérol sont agités pendant 8 jours à 25°. La solubilité à l'équilibre est atteinte aux environs du 5ème jour. Ce laps de temps est nécessaire car il existe au départ une légère sursaturation due à la forme anhydre plus soluble, puis transformation en forme monohydrate comme noté par Igimi et Carey.¹⁶ Les mélanges sont alors filtrés sur membrane de porosité 0.45 μm Sartorius. Le cholestérol est dosé dans le filtrat isotrope, par une méthode enzymatique mettant en jeu la cholestérol oxydase.¹⁷

Etude RMN

Cette étude a été réalisée sur un spectromètre à haut champ CAMECA fonctionnant à 250 MHz pour le 1H . Les spectres sont référencés par rapport à la raie du TMS contenu dans un tube capillaire coaxial au tube porte échantillon. Les solutions utilisées sont faites dans un tampon deutéré borate pH = 9.5, $Na^+ = 0.05 M$, préparé d'après Bates.¹⁸ Les solutions de sels biliaires sont 0.2 M et ont été obtenues par dissolution directe des sels dans le cas de DCNa et de CDCNa, et par dissolution dans le tampon des quantités convenables d'acide ursodesoxycholique et de NaOD pour UDCNa. On ajoute un excès de naphthalène finement broyé à chacune de ces solutions et on agite ces mélanges pendant 4 jours de façon intermittente. Après refroidissement on filtre et on obtient ainsi pour chaque sel biliaire une

solution mère pour laquelle on peut mesurer la quantité de naphthalène dissoute, les protons en 3, 7 ou 12 du sel biliaire servant d'étalon interne. Les dosages de ces mêmes solutions par la méthode spectrométrique U.V. Décrite plus haut, ont donné des résultats semblables. On peut ensuite, à partir de ces solutions mères, préparer des solutions plus diluées en naphthalène par dilution avec les solutions initiales 0.2 M en sels biliaires. Il est ainsi possible d'étudier les variations des déplacements chimiques des protons caractéristiques, tels que les CH₃ en C₁₈ et C₁₉ pour chaque sel biliaire, en fonction de la concentration en naphthalène. L'attribution des résonances des CH₃ en C₁₈ et C₁₉ se fait sans ambiguïté.^{10,19,20}

Remerciements—Nous remercions les établissements Roussel Uclaf pour le don généreux d'acide ursodesoxycholique. Nous sommes reconnaissants aux Profs. J. Surzur et A. Gaudemer pour avoir initié ce travail et pour l'intérêt qu'ils y ont porté.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹I. Makino, K. Shinozaki, K. Yoshika et S. Nakagawa, *Jap. J. Gastroenterol.* **72**, 690 (1975).
- ²J. L. Thistle et A. F. Hofmann, *New England J. Med.* **289**, 655 (1973).
- ³D. M. Small, *The Bile Acids*, Vol. 1, p. 249. Plenum Press, New York (1971).
- ⁴B. Lindman, N. Kamenka et B. Brun, *J. Colloid Interface Sci.* **56**, 328 (1976).
- ⁵P. Mukerjee et R. Cardinal, *J. Pharm. Sci.* **65**, 882 (1976).
- ⁶R. Zana, J. Lang, J. H. Yiv, A. Djavanbakt et C. Abad, *Micellisation, Solubilisation, Microémulsions*, Vol. 1, p. 291. Plenum Press, New York (1977).
- ⁷N. A. Mazer, M. C. Carey, R. F. Kwasnick et G. B. Benedek, *Biochemistry* **18**, 3064 (1979).
- ⁸J. C. Montet, M. O. Reynier, A. M. Montet et A. Gerolami, *Biochim. Biophys. Acta* **575**, 289 (1979).
- ⁹M. O. Reynier, J. C. Montet, A. Gerolami, C. Marteau, C. Crotte, A. M. Montet et S. Mathieu, *J. Lipid Res.* **22**, 467 (1981).
- ¹⁰F. M. Menger, J. U. Rhee et L. Mandell, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 918 (1973).
- ¹¹M. C. Carey et D. M. Small, *Arch. Intern. Med.* **130**, 506 (1972).
- ¹²L. R. Fischer et D. G. Oakenfull, *J. Phys. Chem.* **84**, 936 (1980).
- ¹³M. Lindheimer, J. C. Montet, J. Molenat, R. Bontemps et Brun, *J. Chim. Phys.* **78**, 447 (1981).
- ¹⁴M. C. Carey, J. C. Montet, M. C. Phillips, M. J. Armstrong et N. A. Mazer, *Biochemistry* **20**, 3637 (1981).
- ¹⁵M. Chen, M. Gratzel et J. K. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 2052 (1975).
- ¹⁶H. Igimi et M. C. Carey, *J. Lipid Res.* **22**, 254 (1981).
- ¹⁷P. Roeschlau, E. Bernt et W. Gruber, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **12**, 226 (1974).
- ¹⁸R. G. Bates et V. E. Bower, *Anal. Chem.* **28**, 1322 (1956).
- ¹⁹D. M. Small, S. A. Penkett et D. Chapman, *Biochem. Biophys. Acta* **176**, 178 (1969).
- ²⁰P. K. Bhattacharyya et Y. G. Bankawala, *Anal. Chem.* **50**, 1462 (1978).