

Université de Montréal

**Rôle du niveau d'expression d'ABCC2 dans la  
sensibilité à la cholestase intrahépatique induite par  
une infusion de taurocholate.**

par

Stéphanie Casavant

Département de Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc)  
en Sciences biomédicales

Avril 2006

© Stéphanie Casavant, 2006

Université de Montréal

Faculté des études supérieures



W

4

U58

2006

V. 125

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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**

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.

Ce mémoire intitulé :

**Rôle du niveau d'expression d'ABCC2 dans la  
sensibilité à la cholestase intrahépatique induite par  
une infusion de taurocholate.**

présenté par :

Stéphanie Casavant

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Claude Lavoie, président-rapporteur

Guylaine Bouchard, directeur de recherche

Émile Levy, codirecteur

Marc Bilodeau, membre du jury

## Résumé

*Introduction* : La formation de la bile est une fonction hépatique essentielle à l'homéostasie de l'organisme et produite à l'aide des transporteurs canaliculaires. Un arrêt ou une diminution de la sécrétion biliaire et de ses composés caractérise la cholestase intrahépatique, un syndrome fréquent et sévère pouvant aller jusqu'à la nécessité d'une transplantation hépatique pour la survie du patient. L'absence ou une diminution importante du niveau d'expression et/ou d'activité des protéines/transporteurs canaliculaires ATP8B1, ABCB4 et ABCB11 mène à la cholestase. Bien que les connaissances de ces cholestases d'origine génétique pure soient assez bien connues, les causes menant au développement des cholestases d'origine acquise demeurent considérablement à élucider. Contrairement à l'absence ou au faible niveau d'expression des protéines/transporteurs canaliculaires ATP8B1, ABCB11 et ABCB4 qui mène à la cholestase, l'absence d'ABCC2 protège de la cholestase expérimentale dans plusieurs modèles. L'objectif de cette étude est d'évaluer si le niveau d'expression et d'activité d'ABCC2 va affecter la sensibilité au développement de la cholestase induite par une insulte exogène de taurocholate (TC).

*Méthodes* : Pour les fins de cette étude, un nouveau modèle murin exprimant 50% du niveau d'expression normal d'Abcc2 (*Abcc2*<sup>+/-</sup>) a été produit par une délétion du gène. Une collecte biliaire de 100 minutes, par canulation du cholédoque, a été effectuée sur des souris recevant une infusion d'une dose croissante de TC (1.25, 2.50 et 3.75  $\mu\text{mol}/\text{min} \times 100 \text{ g}$  poids corporel). La sécrétion biliaire, ses composants lipidiques et le glutathion ont été analysés à des intervalles de 20 minutes. De plus, le niveau d'expression des transporteurs canaliculaires dans l'homogénat de foie, les BCM (membranes canaliculaires) et les IM (membranes intracellulaires) a été mesuré par transfert Western.

*Résultats* : Dans des conditions de base, les souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> et *Abcc2*<sup>+/-</sup> ont une sécrétion biliaire et une sécrétion des sels biliaires (SB) équivalentes. Lors de l'infusion de TC à des doses faibles, la sécrétion biliaire et la sécrétion des SB sont stimulées d'une même manière chez les deux groupes jusqu'à

l'atteinte du taux de sécrétion maximum (SRM) (atteinte aux doses intermédiaires de TC) qui arrive plus rapidement chez la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> et à des doses de TC plus faibles que chez la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup>. Suivant l'atteinte du SRM, la sécrétion biliaire et la sécrétion de ses composés chutent de façon importante (cholestase) dans les deux groupes. Cependant, la cholestase est initiée à des doses de TC plus élevées (doses maximales) chez la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup>. À la fin de l'infusion au TC, la quantité de transporteurs *Abcc2* dans l'homogénat du foie et dans les BCM est davantage semblable chez les deux souris que dans les conditions de base où la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> en exprimait la moitié. Alors que dans les IM, la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> possède trois fois moins d'*Abcc2* que la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> indiquant une diminution par rapport à son niveau en condition de base. Les niveaux d'*Abcb11* sont similaires dans l'homogénat et dans les BCM chez les deux groupes alors que les IM de la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> ont une tendance à avoir un niveau d'*Abcb11* plus élevé. Finalement, à la fin de l'infusion, les ratios BCM/IM sont plus élevés chez la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> pour les transporteurs *Abcc2* et *Abcb11*. *Conclusion* : Contrairement aux autres transporteurs canaliculaires, la sensibilité à la cholestase induite par une insulte exogène est plus grande lorsque le niveau d'expression d'*ABCC2* est plus élevé. Cela supporte l'hypothèse qu'*ABCC2* a un rôle primaire dans le contrôle de la sensibilité et dans le développement de la cholestase acquise par son rôle de régulateur menant à l'introgession des transporteurs canaliculaires. Puisque *ABCC2* est un gène hautement polymorphique menant à une grande variabilité du niveau d'expression et d'activité chez l'humain, il serait d'un grand intérêt d'établir son rôle dans le développement de la cholestase humaine.

**Mots-clés** : Cholestase intrahépatique, formation de la bile, *ABCC2*, taurocholate, sécrétion biliaire, sels biliaires.

## Abstract

Canalicular transporters are the main regulators of bile formation. While absent or low expression levels of ABCB11 (bile salt (BS) transport) and ABCB4 (phospholipid transport) are established to mediate cholestasis, the absence of ABCC2 (organic anion/ glutathione transport) inversely elicits resistance to experimentally-induced cholestasis. This leads us to question whether, when present, ABCC2 expression level directly impacts susceptibility to acute cholestatic insults. To obtain a clear response, we used a murine model where ABCC2 expression level was modified by gene targeting. Method: Mice expressing half-normal ABCC2 expression level (*Abcc2*<sup>+/-</sup>) and *Abcb2*<sup>+/+</sup> mice were infused with step-wise increasing doses of taurocholic acid (TCA, 1.25, 2.50 and 3.75  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g body weight}$ ). Bile flow, bile composition and the expression of canalicular transporters in liver homogenates, canalicular and intracellular membranes were studied. Results: At the lowest rate of TCA infusion, the BS secretory rate was stimulated similarly in *Abcc2*<sup>+/+</sup> and <sup>+/-</sup> mice. The intermediate TCA infusion rate led *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice to their BS maximum secretory rate (SR<sub>m</sub>) and to initiation of the cholestatic process, characterized by a progressive decline in bile flow and in the secretory rate of biliary components. In sharp contrast, bile flow remained high, and the biliary secretory rates of BS continued to rise in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice, with the net effect of a significant elevation of the BS SR<sub>m</sub>. A further increase of the TCA infusion rate also led *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice to develop cholestasis, with declining rate of bile formation mirroring that observed earlier in *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice. In contrast to the similar canalicular/intracellular ratio of ABCC2 and ABCB11 under baseline conditions, its assessment at the end of TCA infusion indicated much stronger inhibition of canalicular targeting in *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice. Conclusions: In contrast to other ABC canalicular transporters, high ABCC2 expression increases susceptibility to cholestatic insults, with the initiation of cholestasis occurring at a lower dose of the cholestatic trigger. Modulation of the pericanalicular trafficking of canalicular transporters, a feature commonly affected in cholestatic liver diseases, is likely to play a key role in the process.

**Keywords** : Cholestasis, bile formation, ABCC2, taurocholate, biliary secretion and bile salts.



1.4.2.2 ATP8B1 .....	24
1.4.3 Le transporteur canalulaire du cholestérol.....	25
1.4.3.1 ABCG5/ABCG8 .....	25
1.4.4 Les transporteurs canalulaires des anions organiques et du GSH .....	25
1.4.4.1 ABCC2.....	25
1.4.5 Le transporteur canalulaire des cations organiques .....	27
1.4.5.1 ABCB1.....	27
1.5 Les mécanismes de régulation des transporteurs hépatobiliaires.....	28
1.5.1 La régulation transcriptionnelle des transporteurs hépatobiliaires .....	28
1.5.2 La régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle des transporteurs canalulaires .....	31
1.5.2.1 La régulation post-traductionnelle selon un changement dans la localisation des transporteurs canalulaires.....	32
1.5.2.2 La régulation post-traductionnelle selon un changement dans le statut de phosphorylation des transporteurs. ....	35
1.6 Cholestase .....	36
1.6.1 Définition et généralités.....	36
1.6.2. Changements dans la fonction et dans la structure de l'hépatocyte .....	38
1.6.2.1 Changement dans la perméabilité des jonctions étanches et perte de la polarité .....	38
1.6.2.2 Changement dans la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie .....	39
1.6.2.3 Changement de la fluidité membranaire .....	39
1.6.2.4 Changement au niveau du cytosquelette et des microtubules.....	40
1.6.2.5 Changement du volume cellulaire .....	40
1.6.2.6 Changement de l'expression des transporteurs hépatobiliaires: la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle .....	41
1.6.3. Importances des variantes génétiques de certains transporteurs canalulaires dans la cholestase. ....	44
1.6.3.1 ABCB11.....	46
1.6.3.1.1 Conséquence de l'absence d'ABCB11 chez l'humain.....	46
1.6.3.1.2 Conséquence de l'absence d'Abcb11 chez l'animal .....	48
1.6.3.1.3 Conséquence d'une diminution d'ABCB11 chez l'humain .....	49
1.6.3.1.3 Conséquence d'une diminution d'Abcb11 chez l'animal .....	52
1.6.3.2 ABCB4.....	52
1.6.3.2.1 Conséquence de l'absence d'ABCB4 chez l'humain.....	52
1.6.3.2.2 Conséquence de l'absence d'Abcb4 chez l'animal .....	53
1.6.3.2.3 Conséquence d'une diminution d'ABCB4 chez l'humain .....	54

1.6.3.2.4 Conséquence d'une diminution d'Abcb4 chez l'animal .....	56
1.6.3.3 ATP8B1 .....	57
1.6.3.3.1 Conséquence de l'absence d'ATP8B1 chez l'humain.....	57
1.6.3.3.2 Conséquence de l'absence d'Atp8b1 chez l'animal.....	60
1.6.3.3.3 Conséquence d'une diminution d'ATP8B1 chez l'humain.....	60
1.6.3.3.4 Conséquence d'une diminution d'Atp8b1 chez l'animal .....	63
1.6.3.4 ABCC2.....	63
1.6.3.4.1 Conséquence de l'absence d'ABCC2 chez l'humain.....	63
1.6.3.4.2 Conséquence de l'absence d'Abcc2 chez l'animal .....	65
1.6.3.4.3 Conséquence d'une diminution d'ABCC2 chez l'humain .....	67
1.6.3.4.4 Conséquence d'une diminution d'Abcc2 chez l'animal.....	68
1.7 Hypothèses de recherche et objectifs.....	69
<b>Chapitre 2 : Article .....</b>	<b>71</b>
Abstract .....	72
Introduction.....	74
Materials and Methods.....	78
Results .....	83
Discussion .....	89
References.....	95
Figure Legends.....	105
<b>CHAPITRE 3: Discussion .....</b>	<b>116</b>
3.1 Introduction.....	116
3.1.1 Validation du modèle expérimental.....	117
3.2 Effet du niveau d'expression d'Abcc2 sur la formation de la bile et l'homéostasie (partielle) des SB en condition basale. ....	118
3.2.1 Débit biliaire. ....	119
3.2.2 Sécrétion des principaux lipides biliaires. ....	120
3.2.3 Concentration hépatique et sérique des SB .....	122
3.2.4 Expression et localisation intracellulaire de transporteurs canaliculaires ..	123
3.3 Effet du niveau d'expression d'Abcc2 sur la réponse à l'infusion de TC et la sensibilité au développement de la cholestase intrahépatique. ....	124
3.3.1 Réponse hépatobiliaire. ....	124
3.3.2 Expression hépatique et ciblage canaliculaire d'Abcc2 et d'Abcb11. ....	129

3.4 Proposition de mécanismes potentiels pour expliquer le rôle du niveau d'expression d'Abcc2 dans la sensibilité au développement de la cholestase. ....	132
3.4.1 Considération 1 : Abcc2 possède différents sites de liaison.....	133
3.4.2 Considération 2 : Abcc2 est liée à l'activité d'un canal chlore. ....	134
3.4.3 Considération 3 : L'activité des canaux Cl <sup>-</sup> est impliquée dans la régulation du volume et du pH intracellulaire. ....	134
3.4.4 Hypothèse unifiante.....	135
3.5 Conclusion majeure et épilogue.....	136
<b>Références</b> .....	138
<b>ANNEXES</b> .....	157

## Liste des tableaux

Tableau I : Pourcentage et concentration des principaux composants de la bile hépatique. ....	3
Tableau II : Position des groupements hydroxyles sur les acides biliaires. ....	10
Tableau III: Rôle des récepteurs aux hormones nucléaires, des facteurs de transcription et de leurs ligands dans la régulation de la synthèse des acides biliaires. ....	14
Tableau IV : Principaux composés transportés par ABCC2. ....	26
Tableau V : Récepteurs des hormones nucléaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle des transporteurs hépatobiliaires ....	30
Tableau VI : Médicaments ou composés ayant la capacité d'induire la cholestase intrahépatique. ....	37
Tableau VII : Mutations d' <i>ABCB11</i> associées à un phénotype de PFIC2. ....	47
Tableau VIII : Mutations d' <i>ABCB11</i> associées à un phénotype de BRIC2. ....	51
Tableau IX: Mutations d' <i>ABCB11</i> associées à la cholestase acquise. ....	51
Tableau X : Mutations d' <i>ABCB4</i> associées à un phénotype de PFIC3. ....	53
Tableau XI : Mutations d' <i>ABCB4</i> associées à la cholestase acquise. ....	55
Tableau XII : Mutations d' <i>ATP1B8</i> associées à un phénotype de PFIC1. ....	58
Tableau XIII : Mutations d' <i>ATP1B8</i> associées à un phénotype de BRIC1. ....	62
Tableau XIV : Mutations d' <i>ABCC2</i> associées au phénotype du syndrome de Dubin-Johnson. ....	64

## Liste des figures

Figure 1 : Les voies de synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol. ....	8
Figure 2 : Structure moléculaire de l'acide cholique .....	9
Figure 3 : Structure moléculaire de la glycine et de la taurine liée à la fonction carboxylique de l'acide biliaire. ....	10
Figure 4 : Facteurs nucléaires impliqués dans la régulation de la synthèse des acides biliaires et dans la détoxification. ....	15
Figure 5 : Les transporteurs et leur localisation. ....	28
Figure 6 : Rôle de FXR et PXR dans la régulation transcriptionnelle des transporteurs hépatobiliaires .....	31
Figure 7 : Mouvement des transporteurs canaliculaires, nouvellement synthétisés ou déjà présents dans le pool des vésicules péricanaliculaires, vers la membrane apicale. ....	34
Figure 8 : Principales maladies associées aux mutations des transporteurs canaliculaires. ....	45
Figure 9 : Hypothèse proposée liant ABCC2 à l'initiation de la cholestase. ....	136

## Liste des abréviations

ALT	Alanine aminotransférase
AB	Acide biliaire
ABC	«Atp Binding Cassette»
ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AO <sup>-</sup>	Anion Organique
AST	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
ATP8B1	«ATPase de type-P type IV» ou FIC1
BCM	«Bile canicular membrane», membrane canaliculaire
BRIC1 et BRIC2	«Benign recurrent intrahepatic cholestasis», Cholestase intrahépatique récurrente bénigne de type 1 et de type 2
BSEP	«Bile salt export pump »
CA	Acide cholique ou cholate
CAR	«Constitutive Androstene Receptor»
CDCA	Acide chénodésoxycholique ou chenodésoxycholate
CFTR	«Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator»
Chol	Cholestérol
CIG	Cholestase Intrahépatique de la Grossesse
CMC	Concentration micellaire critique
CO <sup>+</sup>	Cation organique
CYP27A1	Stérol 27-hydroxylase
CYP7A1	Cholestérol-7- $\alpha$ -hydroxylase
CYP8B1	Stérol-12- $\alpha$ -hydroxylase
DBcAMP	Dibutyryl-cyclicAMP

DBISB	Débit biliaire indépendant des SB
DCA	Acide désoxycholique ou désoxycholate
E <sub>2</sub> 3G	β-estradiol 3-(β-D-glucuronide)
E <sub>2</sub> 17G	Estradiol 17-β-Glucuronide
EHBR	«Eisai HyperBilirubinemic Rat» Rat hyperbilirubinémique Eisai souche Sprague-Dawley
FXR	«Farnesoid X Receptor»
GGT	γ-Glutamyl-Transpeptidase
GS-DNP	dinitrophényl-S-glutathion
GSH	Glutathion réduit
GSHt	Glutathion total
GSSG	Glutathion oxydé
GY	«Groningen Yellow» rat jaune Groningen souche Wistar
HDL	«High density lipoprotein» Lipoprotéine à haute densité
HNF-4α	«Hepatocyte nuclear factor 4α», Facteur nucléaire 4α de l'hépatocyte
IgA	Immunoglobuline A
IM	«Intracellular membrane», membrane intracellulaire ou péricanaliculaire
LAP	Leucine AminoPeptidase
LCA	Acide lithocholique ou lithocholate
L-FABP	«Fatty Acid Binding Protein »
LRH1	«Liver receptor homologue 1»
LPS	Lipopolysaccharide
LST-1	«Liver Specific organic anion Transporter 1»
LXR	«Liver X Receptor»
MCA	Acide muricholique ou muricholate
MDR	«MultiDrug Resistance- P-glycoprotein»
MRP	«Multidrug Resistance-associated Protein»
NAIC	«North American Indian Childhood Cirrhosis»

5'Nu	5'-nucléotidase
OATPS	«Organic Anion Transporting Proteins»
PA	Phosphatase alcaline
pb	Paire de bases
PC	Phosphatidylcholine
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PE	Phosphatidyléthanolamine
PFIC	«Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis» Cholestases intrahépatiques familiales progressives
$\Delta$ pHic	Changement de pH intracellulaire
PKC	Protéine kinase C
PL	Phospholipide
PPAR $\alpha$	«Peroxisome Proliferator Activator- $\alpha$ »
PS	Phosphatidylsérine
PXR	«Pregnane X Receptor»
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
r-lst1	«Rat Liver Specific organic anion Transporter»
RVD	«Regulatory Volume Decrease»
RVI	«Regulatory Volume Increase»
SB	Sels biliaires
SD	Rat Sprague-Dawley
SDJ	Syndrome de Dubin-Johnson
SHP	«Short Heterodimeric Partner»
SM	Sphingomyéline
SPGP	«Sister of P-Glycoprotein»
SRM	«Secretory maximum rate» ou taux de sécrétion maximum
SXR	«Steroid X Receptor»
TCA ou TC	Acide taurocholique ou taurocholate
TCDCa	Acide taurochénodésoxycholique ou

	Taurochénodésoxycholate
TLCA	Acide tauroolithocholique ou tauroolithocholate
TUDC	Acide taoursodésoxycholique ou taoursodésoxycholate
TR <sup>-</sup>	«Transport deficiant rat» Rat transport déficient Souche Wistar
$\Delta$ Vic	Changement du volume intracellulaire

À Martin et à mes parents

## Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Guylaine Bouchard, directrice de recherche de ma maîtrise, pour ses excellents conseils, son support technique et moral, son intégrité, sa qualité de chercheur ainsi que pour son esprit critique tout au long de ce projet.

Je tiens à remercier également le Dr Émile Levy, codirecteur de recherche pour ses conseils et pour m'avoir donné le goût de poursuivre des études de maîtrise. De plus, je remercie les Cinémas Guzzo pour m'avoir accordé une bourse d'étude.

Remerciements également à mes parents, Michèle et Pierre, à mon frère David et à mes beaux-parents Johanne et Michel pour leurs encouragements et leur support moral. Je tiens à remercier plus particulièrement Martin pour son support, ses encouragements et son aide, tout au long de mes études de maîtrise.

## Chapitre 1 : revue de la littérature

### 1.1 Le foie et le système biliaire

Le foie, l'un des organes les plus importants de l'organisme, possède de nombreux rôles métaboliques et digestifs. Les principales fonctions du foie sont : la formation et la sécrétion de la bile, le métabolisme des nutriments et des vitamines, l'excrétion de différents composés (toxines, médicaments, cholestérol, stéroïdes et autres hormones), la synthèse de protéines plasmatiques et l'immunité (cellules de Kupffer : macrophages du foie) (Benhamou et Erlinger, 2000).

L'unité structurale et fonctionnelle du foie est le lobule, composé d'hépatocytes. Comme toutes les cellules ayant une fonction sécrétoire, les hépatocytes sont des cellules épithéliales polarisées contenant un côté basolatéral (sinusoïdal) et apical (canaliculaire) (Boyer, 2003). Pour que les cellules puissent remplir leurs fonctions, les jonctions étanches, placées entre les cellules adjacentes, servent de barrière pour séparer les espaces du côté sinusoïdal (sang) des espaces du côté canaliculaire (bile) et permettent ainsi de maintenir leur polarité. Les jonctions étanches permettent aussi la conservation des domaines membranaires aux cellules polarisées en empêchant les échanges de protéines membranaires, dont les transporteurs hépatobiliaires, entre les régions apicales et basolatérales (van Mil, 2005). L'intégrité de la structure de la cellule est essentielle au maintien de la formation de la bile qui nécessite un gradient osmotique (Boyer, 2003, Rahner et *al*, 1996 et Anderson et *al*, 1996).

Le sang qui provient de la veine porte hépatique circule près des hépatocytes, du côté basolatéral, dans les sinusoides (capillaires sanguins) afin d'y favoriser les échanges spécifiques de molécules dans l'espace de Disse par les transporteurs sinusoïdaux ou par d'autres modes de transport, comme par exemple, la diffusion. Ainsi, le sang qui entre dans le foie, provenant des intestins, quitte moins riche en nutriments et en déchets grâce aux hépatocytes qui en assurent l'absorption et la détoxification. L'artère hépatique fournit le sang artériel au foie (Boyer, 2003).

Du côté apical, les hépatocytes sont en contact avec plusieurs canalicules biliaires où ils sécrètent, principalement par transport actif, les composés biliaires. Ces canalicules biliaires déversent la bile dans les canaux biliaires intralobulaires qui eux rejoignent les canaux interlobaires pour former les canaux hépatiques droit et gauche. Ces derniers vont s'unir à l'extérieur du foie afin de former le canal hépatique commun. Le canal hépatique commun déverse la bile hépatique nouvellement formée vers le cholédoque qui est en fait l'union du canal hépatique commun avec le canal cystique, canal reliant le cholédoque à la vésicule biliaire (Wanless, 2003).

Le foie produit de façon constante la bile. Lorsque la bile n'est pas nécessaire à la digestion, la vésicule biliaire l'emmagasine et la concentre en absorbant une partie de son eau, de ses ions et de certains composés (Trauner et Boyer, 2003). La bile vésiculaire peut être jusqu'à dix fois plus concentrée que la bile hépatique (Marieb et Laurendeau, 1993). La vésicule biliaire est drainée via le canal cystique qui s'unit au canal hépatique commun pour former le cholédoque. Ce canal déverse la bile dans le duodénum.

La bile est un liquide jaune produit par les hépatocytes suivant la sécrétion de nombreux composés par les transporteurs hépatobiliaires. Les molécules qui seront éventuellement sécrétées dans la bile proviennent du sang, sont déjà présentes au niveau hépatique ou sont nouvellement synthétisées dans le foie. Elles seront transportées à la membrane canaliculaire, avec ou sans modification métabolique (Arrese et Trauner, 2003), soit par diffusion en milieu aqueux dans le cytoplasme, soit par transport via des protéines intracellulaires de liaison/transport ou à l'aide des membranes lipidiques intracellulaires selon leur degré d'hydrophobicité. Finalement, plusieurs molécules biliaires sont excrétées dans la bile, contre un gradient de concentration, par les transporteurs canaliculaires. Les sels biliaires (SB) sont les principaux constituants de la bile. Plusieurs autres molécules organiques sont aussi sécrétées dans la bile tels que les phospholipides (PL), le cholestérol (Chol), la bilirubine, le glutathion (GSH) ainsi que des protéines, peptides, acides aminés et des électrolytes (voir le tableau 1, adapté de Boyer, 2003).

Tableau I : Pourcentage et concentration des principaux composants de la bile hépatique.

Composants biliaires	Concentration biliaire	Ratio bile/plasma
Eau	~95%	
Électrolytes		
Na	141-165 mEq/L	~1
K	2,7-6,7 mEq/L	~1
Cl	77-117 mEq/L	~1
HCO <sub>3</sub>	12-55 mEq/L	~1
Ca	2,5-6,4 mEq/L	~1
Mg	1,5-3 mEq/L	~1
SO <sub>4</sub>	4-5 mEq/L	
PO <sub>4</sub>	1-2 mEq/L	
Anions organiques		
Sels biliaires	3-45 mmol/L	>1
Bilirubine	1-2 mmol/L	>1
Lipides		
Cholestérol	97-310 mg/dl	<1
Phosphatidylcholine	140-810 mg/dl	<1
Protéines	<10 mg/ml	<1
Peptides et acides aminés		
Glutathion (GSH)	3-5 mmol/L	>1
Glutathion oxydé (GSSG)	0-5 mmol/L	>1
Acide glutamique	0,8-2,5 mmol/L	>1
Acide aspartique	0,4-1,1 mmol/L	>1
Glycine	0,6-2,6 mmol/L	>1
Nucléotides		
Adénosine triphosphate (ATP)	0,1-6 µmol/L	
Adénosine diphosphate (ADP)	0,1-5 µmol/L	
Adénosine monophosphate (AMP)	0,06-5 µmol/L	
Métaux lourds		
Cu	2,8 mg/L	>1
Mn	0,2 mg/L	>1
Fe	<1 mg/L	>1
Zn	0,2-0,3 mg/L	>1
Vitamines		
Cyanocobalamine	15-200 µg/L	
Folate	4-60 µg/L	

## 1.2 La sécrétion biliaire

### 1.2.1 Les fonctions de la sécrétion biliaire

La sécrétion biliaire est une fonction hépatique essentielle à l'organisme puisqu'elle joue plusieurs rôles importants. Ainsi, elle permet l'élimination des composés endogènes et exogènes. Les substances liposolubles qui ne sont pas filtrées par le rein sont éliminées dans la bile (Boyer, 2003). Les composés endogènes sont des molécules naturellement présentes dans l'organisme ou des produits métaboliques comme le Chol, la bilirubine et les stéroïdes. Les substances exogènes ou xénobiotiques peuvent être des médicaments et leurs métabolites et diverses molécules toxiques ou cancérigènes provenant de l'alimentation ou de l'environnement.

Lorsque nécessaire, la détoxification s'effectue grâce à un processus de trois phases. Dans la phase I, les composés xénobiotiques sont hydroxylés par les enzymes de la famille du cytochrome P-450 (les monooxygénases) (Obermayer-Straub et Peter Manns, 2003). Par la suite, les composés xénobiotiques hydroxylés vont être conjugués avec des molécules hydrophiles tels que l'acide glucuronique, le sulfate, le GSH et l'acétate par les enzymes de détoxification de la phase II dont la UDP-glucuronyltransférase, la sulfotransférase, la glutathion-S-transférase et la N-acétyltransférase respectivement (Obermayer-Straub et Peter Manns, 2003). Les transformations par les systèmes de détoxification de phase I et de phase II permettent de rendre les molécules à détoxifier plus polaires afin de permettre leur élimination. Finalement, la détoxification de phase III consiste dans la sécrétion de ces molécules par les transporteurs du foie et des reins dans la bile et l'urine respectivement.

La sécrétion biliaire possède une deuxième fonction importante qui permet la digestion et l'absorption des lipides et des composés liposolubles comme certaines vitamines (A, D, E et K) par l'intestin à l'aide des SB émulsifiants (Benhamou et Erlinger, 2000).

La sécrétion biliaire a aussi un rôle dans la protection de l'intestin. En effet, la bile contient le GSH réduit, un antioxydant qui protège l'intestin du stress oxydant. La bile a aussi un rôle dans l'immunité, elle protège des infections intestinales en sécrétant les IgA et plusieurs cytokines (Boyer et Nathanson, 2003).

La sécrétion biliaire est aussi impliquée dans l'homéostasie du Chol (Hofmann et *al*, 1999). La sécrétion biliaire est la voie majeure d'élimination du Chol de l'organisme (avec la desquamation cellulaire), tant dans sa forme libre que sous sa forme métabolisée en SB. En fait, la moitié du Chol sécrété dans la bile est réabsorbé par l'intestin. Chaque jour, jusqu'à 5% du pool des SB est excrété par l'intestin (Meier et Stieger, 2002). Suite à l'élimination de ces SB, d'autres molécules de Chol seront transformées en acides biliaires (AB) afin de conserver un pool constant.

### **1.2.2 La formation de la bile**

La formation de la bile est un processus produit par la sécrétion de composés organiques osmotiquement actifs par les hépatocytes (Boyer et Nathanson, 2003). Un système de transport actif efficace est indispensable pour produire le débit biliaire puisqu'un grand nombre de composés est sécrété dans le canalicule contre leur gradient de concentration. Des transporteurs d'électrolytes et des canaux ioniques, tant au niveau des hépatocytes que des cholangiocytes, contribuent aussi de manière importante au contenu biliaire. Le transport actif s'effectue à l'aide de plusieurs transporteurs présents sur la membrane canaliculaire et membres de la famille des «Atp Binding Cassette», nécessitant directement l'utilisation d'énergie sous forme d'ATP. Les mitochondries se retrouvent en grande quantité dans l'hépatocyte où elles

fournissent l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de la cellule et pour la sécrétion active (ATP dépendante) des composés biliaires (Desmet, 1994). Les transporteurs de la famille des «Atp Binding Cassette» seront largement discutés dans la section 1.4, traitant des transporteurs hépatobiliaires. Les molécules contribuant majoritairement au débit biliaire sont les SB et les GSH. En plus de la sécrétion de ces molécules organiques chargées, deux anions, le bicarbonate et l'ion  $\text{Cl}^-$ , qui contribuent aussi au débit biliaire, sont sécrétés au niveau canaliculaire et ductulaire (par les cholangiocytes) via des systèmes d'échanges  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  et des canaux ioniques (Arrese et Trauner, 2003). D'autres canaux, appelés aquaporines, sont responsables du transport de l'eau et contribuent au maintien de l'équilibre osmotique. (Splinter et *al*, 2004).

La formation normale de la bile est soumise à une régulation très contrôlée et dépend de plusieurs caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'hépatocyte. Un mauvais fonctionnement dans un de ces processus peut mener à une détérioration de la formation de la bile.

Le volume cellulaire est une caractéristique importante dans la modulation de la fonction hépatobiliaire. Ainsi, le volume de l'hépatocyte régule la formation de la bile et la quantité des transporteurs canaliculaires (par un mécanisme d'insertion dans la membrane et d'intériorisation dans les vésicules péricanaliculaires) impliqués dans la génération du débit biliaire (KubitZ et *al*, 1997). Il est donc d'une importance majeure que la régulation du volume cellulaire des hépatocytes soit effectuée de façon très efficace.

Normalement, il y a un transport qui s'effectue dans des vésicules suite à la synthèse et à la maturation des protéines afin d'amener les transporteurs canaliculaires de l'appareil du Golgi jusqu'à la membrane. Ce mécanisme a lieu non seulement pour les transporteurs nouvellement synthétisés, mais aussi pour les transporteurs du pool déjà présents dans les vésicules péricanaliculaires. Ainsi, la formation de la bile est aussi régulée grâce à ce mécanisme permettant d'augmenter ou de diminuer la

quantité de transporteurs nécessaires au bon fonctionnement de la fonction sécrétoire de l'hépatocyte (Crocenzi et al, 2004).

Le cytosquelette est une structure importante qui permet le mouvement des vésicules cytosoliques péricanaliculaires responsables du transport des transporteurs canaliculaires vers la membrane et des contractions des canalicules biliaires qui facilitent le mouvement de la bile (Ujhazy et al, 2001). Les composants du cytosquelette comprennent, entre autres, les microfilaments et les microtubules.

La fluidité ainsi que la composition lipidique de la membrane canaliculaire (et sinusoidale) ont un effet sur l'activité des protéines transmembranaires. La fluidité membranaire dépend de la quantité de Chol par rapport aux PL, du type de PL présent, mais aussi de la longueur et du degré de saturation des acides gras. Une diminution de la fluidité membranaire est associée avec une augmentation de la quantité de Chol libre dans la bicouche lipidique, mais aussi de sphingomyéline (SM) et de phosphatidylsérine (PS). La fluidité membranaire influence directement les interactions lipide-protéine et protéine-protéine, ce qui a pour effet d'influencer également l'activité des transporteurs et des enzymes membranaires (Asamoto, 2001 et Reichen et Simon, 1988).

### **1.3 Les principaux composés biliaires**

#### **1.3.1 Les sels biliaires**

##### **1.3.1.1 Les principaux acides biliaires chez l'humain et la souris, leur structure et leur synthèse**

Les AB sont synthétisés à partir du Chol via une série comportant au moins quatorze réactions enzymatiques dans le foie (Russell et al, 1992). Leur synthèse s'effectue par la voie des stérols neutres (classique) via la cholestérol-7- $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) dans le foie seulement ou par la voie acide (alternative) dans le foie et

dans les autres tissus via la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) tel qu'illustré sommairement à la figure 1 (Agellon *et al*, 2000 et Fuchs *et al*, 2003). Le gène CYP7A1 code pour l'enzyme de l'étape limitante dans la voie de conversion du Chol en AB (voir la section 1.3.1.2). Le gène CYP8B1 code pour la stérol-12- $\alpha$ -hydroxylase, une autre enzyme de la synthèse des AB (Goodwin *et al*, 2002).

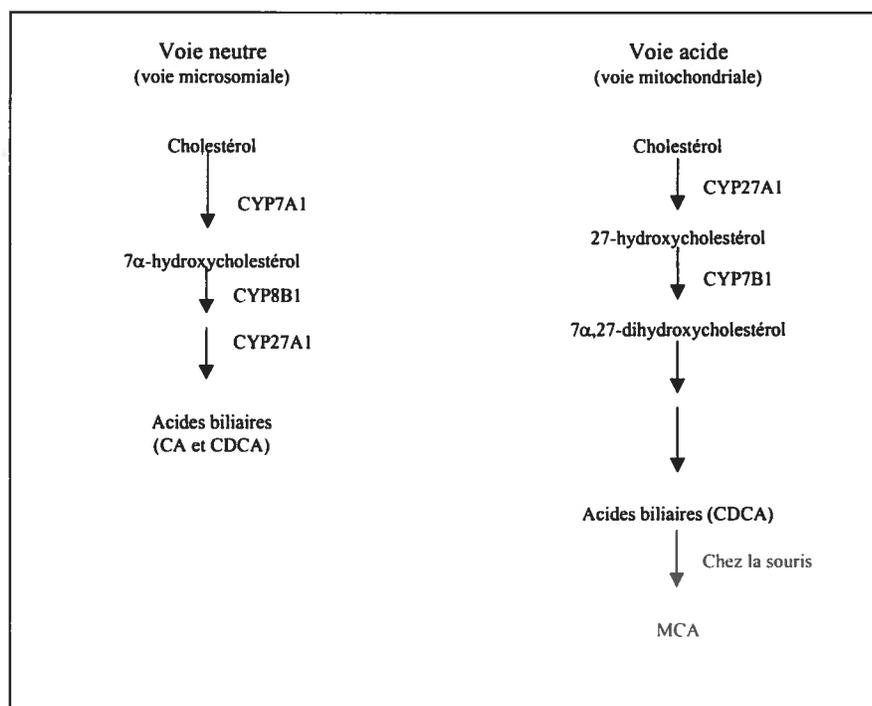


Figure 1 : Les voies de synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol.

Les AB sont constitués de 24 carbones, de plusieurs groupements hydroxyles et d'une chaîne aliphatique de longueur variable localisée sur le carbone 17 du cycle D et se terminant par une fonction carboxylique (voir la figure 2). L'acide cholique (CA, trihydroxylé) et l'acide chénodésoxycholique (CDCA, dihydroxylé) sont les AB retrouvés dans une plus grande proportion chez l'humain (le tableau 2 montre les positions des groupements hydroxyles des principaux AB). Ces derniers sont appelés AB primaires puisqu'ils sont synthétisés à partir du Chol. Par une réaction

d'amidation, les AB sont conjugués à la glycine ou à la taurine, sur leur groupement carboxylique terminal en C<sub>24</sub> et deviennent les SB (Falany et *al*, 1994) (voir la figure 3). Dans la nomenclature, suivant leur conjugaison, ils portent alors comme préfixe les noms de glyco- ou tauro-, respectivement, devant le nom de l'AB. Cette conjugaison permet d'augmenter leur caractère amphipatique et de diminuer leur constante d'ionisation menant à un SB plus hydrophile donc plus soluble dans la bile. En plus de réactions d'amidation, les AB subissent aussi plusieurs autres modifications structurales dont la déconjugaison, la déshydroxylation, la sulfatation et la glucuronidation (ces deux derniers modes étant particulièrement utilisés en condition cholestatique) (Agellon et *al*, 2000).

Chez la souris et le rat, l'acide chénodésoxycholique (dont la synthèse se poursuit en acide  $\alpha$  et  $\beta$ -muricholique), l'acide  $\alpha$  et  $\beta$ -muricholique ( $\alpha$  et  $\beta$ -MCA) et le CA sont les AB primaires. La souris possède beaucoup de MCA alors que la quantité est faible chez le rat (Hsia, 1971).

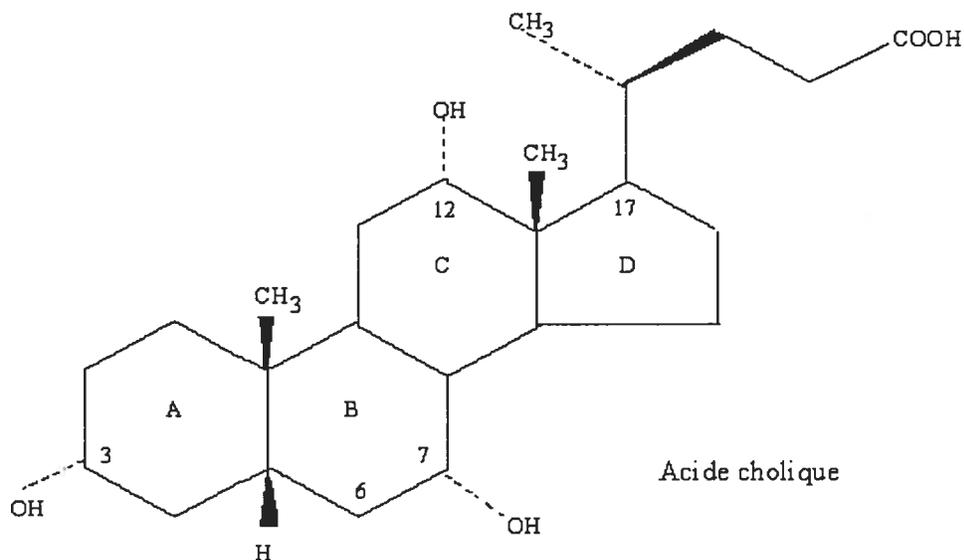


Figure 2 : Structure moléculaire de l'acide cholique

Tableau II : Position des groupements hydroxyles sur les acides biliaires.

Acides biliaires	Groupement en position			
	3	6	7	12
Acide cholique	OH	H	OH	OH
Acide chenodésoxycholique	OH	H	OH	H
Acide désoxycholique	OH	H	H	OH
Acide lithocholique	OH	H	H	H
Acide hyodésoxycholique	OH	OH	H	H
Acide muricholique	OH	OH	OH	H

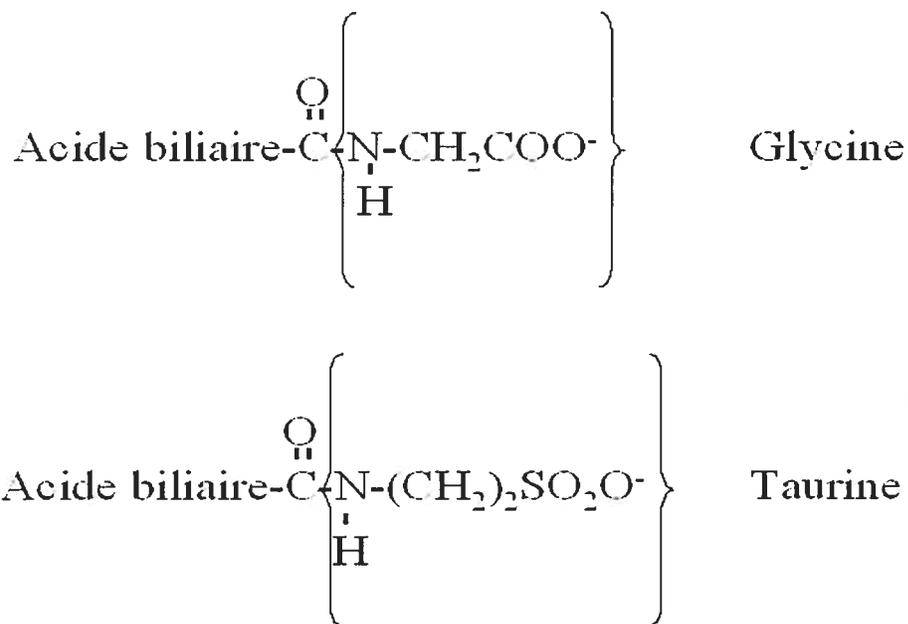


Figure 3 : Structure moléculaire de la glycine et de la taurine liée à la fonction carboxylique de l'acide biliaire.

Chez l'humain, suite à leur sécrétion dans l'intestin, le CA et le CDCA sont métabolisés dans le colon par des réactions de déshydroxylation (groupement hydroxyle en C<sub>7</sub>) effectuées par les bactéries de la flore intestinale en acide désoxycholique (dihydroxylé) et en acide lithocholique (monohydroxylé) respectivement. Le pool des SB contient environ 80% de CA et de CDCA conjugué en quantité égale et plus de 10% de DCA conjugué. Étant très faiblement absorbé par l'intestin, le DCA et le LCA sont excrétés dans les fèces et se retrouvent dans les

proportions de 70% et 30% respectivement (van Mil, 2005). Chez la souris, le MCA et le CA sont métabolisés par les bactéries intestinales dans le colon en acide hyodésoxycholique et en acide désoxycholique respectivement. Ces métabolites, aussi appelés AB secondaires, seront excrétés ou réabsorbés par l'intestin au niveau de l'iléon. Suite à leur réabsorption, ils retournent au foie, via la veine porte hépatique, où ils seront métabolisés tels les AB primaires et sécrétés à nouveau dans la bile. Ce mécanisme se nomme cycle entérohépatique des SB. Le cycle complet s'effectue de 6 à 10 fois par jour (Trauner et Boyer, 2003). Dans le plasma, les SB circulent liés avec une grande affinité à l'albumine (Roda et *al*, 1982). Les SB sont aussi transportés grâce à leur capacité de liaison aux lipoprotéines, particulièrement aux HDL (Salvioli et *al*, 1985).

La captation des SB à la membrane basolatérale de l'hépatocyte est un processus très efficace capable de réabsorber de 75 à 95% des SB provenant de la circulation entérohépatique et ce, de façon indépendante de la concentration plasmatique, mais dépendante de la structure des SB (Meier et *al*, 1995). Les SB conjugués nécessitent un transport actif secondaire pour leur réabsorption (Meier et *al*, 1995). Ainsi, la captation des SB conjugués se fait principalement par le transporteur NTCP/Ntcp alors que le transport des SB non conjugués se fait à l'aide des OATPs/Oatps (voir la section 1.4.1.1).

Par la suite, le transport vers la région canaliculaire des SB absorbés (ou nouvellement synthétisé à partir du Chol) s'effectue dans l'hépatocyte comme il est décrit à la section 1.4.1.2. Au niveau canaliculaire, l'excrétion des SB monovalents dans la bile est effectuée principalement grâce au transporteur ABCB11/Abcb11. ABCC2/Abcc2 permet la sécrétion dans la bile des SB sulfatés et glucuronidés (voir la section 1.4.1.3). Les transporteurs hépatobiliaires seront discutés en détail dans la section 1.4.

### 1.3.1.2 Régulation de la synthèse des acides biliaires

Comme les SB sont des molécules pourvues d'une certaine toxicité, leur concentration intracellulaire doit être hautement contrôlée. La régulation de la synthèse des AB s'effectue, entre autres, grâce à certains récepteurs membres de la famille des hormones nucléaires, qui nécessitent une hétérodimérisation avec RXR (retinoic X receptor) afin d'augmenter leur affinité pour l'ADN (Kast et *al*, 2002). Ces derniers ont pour ligand les SB (Parks et *al*, 1999). Le tableau 3 ci-dessous illustre le rôle de divers récepteurs membres de la famille des hormones nucléaires dans la régulation de la synthèse des AB à partir du Chol. En plus de leurs actions dans la régulation de la synthèse des AB, les récepteurs membres de la famille des hormones nucléaires possèdent d'autres rôles dans l'activation de la transcription de plusieurs transporteurs sinusoïdaux et canaliculaires et d'enzymes oxydatives permettant la détoxification et l'excrétion des SB. La fonction de la régulation des transporteurs des SB sera discutée dans la section 1.5.1.

La régulation positive de la synthèse des AB arrive lorsque la concentration hépatocellulaire du Chol est augmentée. Par conséquent, le Chol peut lui-même stimuler sa conversion en AB, via l'activation par LXR (liver X receptor) de CYP7A1 (Makishima et *al*, 1999 et Chiang et *al*, 2000) et CYP8B1 (del Castillo-Olivares et *al*, 2001) codant pour les enzymes impliquées dans la conversion du Chol en AB. (voir la figure 4) (Chiang et *al*, 2001). À l'inverse, lorsque la concentration intracellulaire de SB augmente dans l'hépatocyte, les SB se lient à FXR, signifiant « Farnesoid X Receptor » (Parks et *al*, 1999, Wang et *al*, 1999 et Makishima et *al*, 1999). Il en résulte en l'activation de la transcription de SHP (short heterodimeric partner). Celui-ci va, à son tour, inhiber la transcription de LRH1 (liver receptor homologue 1), facteur qui active LXR. Par la suite, LXR active CYP7A1 (Makishima et *al*, 1999 et Chiang et *al*, 2000) et CYP8B1 (del Castillo-Olivares et *al*, 2001). De cette façon, la synthèse des AB est inhibée par les AB eux-mêmes, menant à la diminution de la concentration intracellulaire des AB lorsque leur taux intracellulaire s'élève. LXR est considéré comme un transactivateur de CYP7A1 puisque son

promoteur ne contient pas d'élément de réponse pour FXR. Notons que le profil des AB est très important dans l'activation de la voie FXR puisque l'affinité de FXR pour ces derniers est variable. Les ligands les plus puissants semblent être les SB amidés hydrophobiques, tels les SB non-conjugués ou conjugués à la taurine ou à la glycine comme l'acide chénodésoxycholique (CDCA), l'acide désoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA). Le CA semble aussi un ligand de FXR, mais de moins haute affinité (Parks et *al*, 1999, Wang et *al*, 1999, Makishima et *al*, 1999).

PXR (pregnane X receptor), un autre récepteur membre de la famille des hormones nucléaires, peut aussi inhiber la synthèse des AB. Toutefois, contrairement à FXR, le seul AB qui semble activer PXR est LCA. Plusieurs autres composés tels que la rifampicine, la dexaméthasone ou l'hormone synthétique pregnenolone-16- $\alpha$ -carbonitrile (Goodwin et *al*, 2002a et 2002b) sont aussi de très bons activateurs (ligands) de PXR, résultant en une inhibition de transcription du gène CYP7A1 (voir la figure 4 ci-dessous). PXR active aussi la synthèse du gène CYP3A4, lequel permet d'augmenter le métabolisme (la détoxification) des SB secondaires (Goodwin et *al*, 2002b).

Tableau III: Rôle des récepteurs aux hormones nucléaires, des facteurs de transcription et de leurs ligands dans la régulation de la synthèse des acides biliaires.

Récepteurs aux hormones nucléaires et facteurs de transcription	Ligands	Principaux gènes régulés	Conséquences
FXR (Farnesoid X receptor)	SB hydrophobes (CDCA, DCA, LCA et CA)	SHP-1 (CYP7A1) (CYP8B1)	Répression de la synthèse des AB à partir du Chol
LXR (Liver X receptor)	Oxystérols  via FXR	CYP7A1  CYP7A1	Activation de la synthèse des AB à partir du Chol Via FXR : Répression
PXR (pregnane X receptor)	Lithocholate, ursodésoxycholate, pregnenolone-16- $\alpha$ - carbonitrile	CYP7A1  CYP3A4	Répression de la synthèse des AB à partir du Chol Active la biotransformation des SB secondaires
RXR (retinoic X receptor)	FXR, LXR, PXR	Voir FXR, LXR, PXR	Voir FXR, LXR, PXR
SHP-1 (short heterodimeric protein-1)	FXR	CYP7A1 CYP8B1	Répression de la synthèse des AB à partir du Chol
LRH1 (liver receptor homologue 1)	SHP-1 inhibe LRH1	CYP7A1 CYP8B1	Répression de la synthèse des AB à partir du Chol

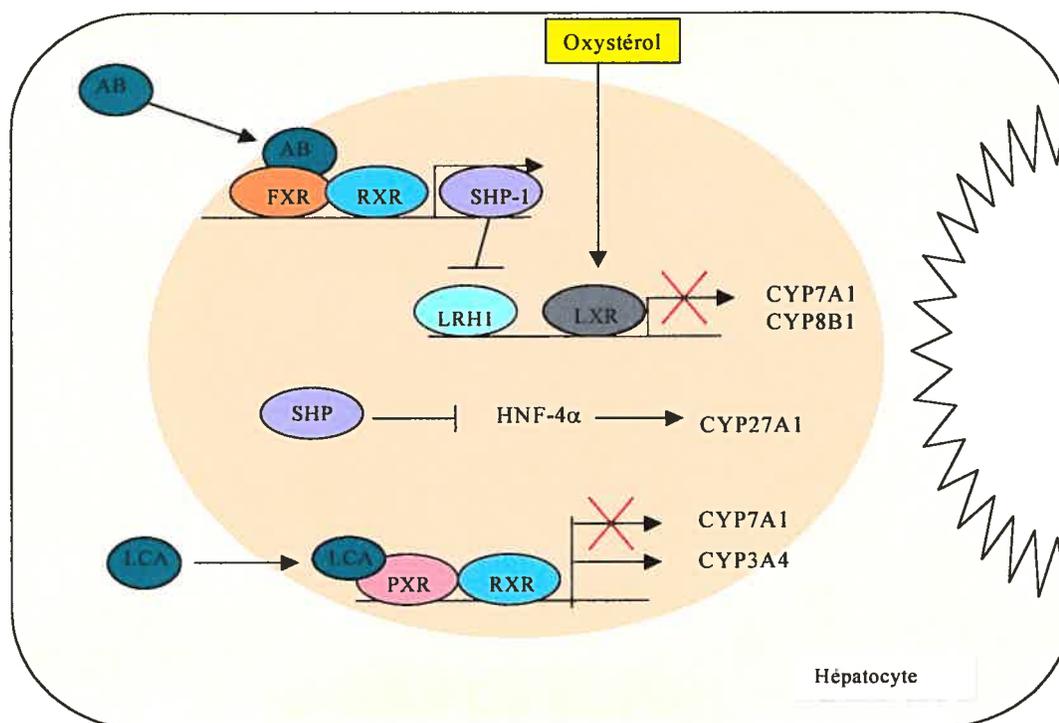


Figure 4 : Facteurs nucléaires impliqués dans la régulation de la synthèse des acides biliaires et dans la détoxification.

### 1.3.1.3 Propriété biophysique et fonction des sels biliaires

Les SB sont des détergents physiologiques permettant de solubiliser le Chol et les autres molécules hydrophobes dans la bile et d'émulsionner les lipides dans l'intestin afin de faciliter leur absorption. Leur cytotoxicité dépend, entre autres, de leur degré d'hydrophobicité (niveau d'hydroxylation) et de leur position dans le plan ( $\alpha$  ou  $\beta$ ). Le  $\beta$ -MCA (acide  $3\alpha$ ,  $6\alpha$ ,  $7\beta$ -trihydroxy- $5\beta$ -cholique), retrouvé en grande quantité chez la souris, est très hydrophile comparativement aux autres AB. Comme le MCA est particulièrement hydrophile, le pool des SB de la souris est beaucoup moins toxique que celui retrouvé chez l'humain (Wang et *al*, 2001). Les SB tendent à former des micelles avec les PL et le Chol en solution aqueuse (bile) dû à leur caractère amphipathique. Leurs têtes polaires se situent à l'extérieur alors que leurs parties hydrophobes se retrouvent au centre de la micelle. Dans les micelles, les PL vont s'aligner, avec leurs têtes polaires et leurs queues hydrophobes, de la même

façon que les AB alors que le Chol se retrouve au centre des micelles dû à sa grande hydrophobicité.

### **1.3.2 Le cholestérol**

Le Chol est un constituant essentiel des membranes cellulaires où il confère une certaine rigidité à la structure de la bicouche phospholipidique. Le Chol est aussi un constituant important de la structure externe des lipoprotéines. Il est présent dans les tissus et dans les lipoprotéines plasmatiques sous la forme libre ou estérifiée (lié à un acide gras à longue chaîne). Il est le précurseur de tous les stéroïdes de l'organisme dont les AB, les hormones sexuelles, les corticostéroïdes et la vitamine D (Garrett et Grisham, 2000). Le Chol est un lipide amphiphile synthétisé à partir de l'acétyl-CoA suite à une quinzaine de réactions enzymatiques (Redinger, 2003). L'homéostasie du Chol ainsi que son métabolisme sont directement liés à celui des AB, puisqu'ils correspondent aux produits finaux du catabolisme du Chol (Redinger, 2003). Dans la bile, il est sécrété seulement dans la forme libre. Ainsi, une partie du Chol est éliminée dans la bile sous forme de Chol libre ou transformé en AB. La quantité de Chol libre excrétée dans la bile correspond à 2 g par jour chez l'humain (Carey et Duane, 1994). De plus, l'excrétion fécale des SB correspondant de 3 à 5% de la sécrétion des SB dans la bile permet une perte supplémentaire d'environ 500 mg de Chol à chaque jour (Meier et Stieger, 2002).

### **1.3.3 Les phospholipides**

Les PL ont un rôle très important à jouer dans la structure des membranes cellulaires où ils forment la bicouche lipidique, mais aussi dans la sécrétion biliaire où ils solubilisent le Chol biliaire grâce à leur association sous forme de micelles avec les SB (Garrett et Grisham, 2000). Ainsi, les PL biliaires permettent la digestion et l'assimilation des lipides alimentaires dans le duodénum. De plus, les PL possèdent un rôle protecteur pour les canaux biliaires contre l'action détergente des SB. Les PL

sont des molécules amphipatiques, dont la structure comprend deux acides gras estérifiés sur le C-1 et le C-2 du glycérol ainsi que de l'acide phosphatidique en position C-3 du glycérol. Le groupement phosphoryle est aussi estérifié d'un composé hydrophile, tel que la choline, la sérine, l'éthanolamine ou autre (Garrett et Grisham, 2000). La phosphatidylcholine (PC ou lécithine) représente 95% des PL totaux retrouvés dans la bile (Moschetta et *al*, 2001). La phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS), la lysophosphatidylcholine ainsi que la sphingomyéline se retrouvent aussi dans la bile, mais en faible quantité. La composition en acide gras sur la PC est bien spécifique. Ainsi, la majorité des PC contiennent l'acide palmitique (hexadécanoate, 16:0) et l'acide linoléique (cis, cis- $\Delta^{9,12}$ -octadécadiénoate, 18:2) en position 1 et 2 du glycérol respectivement (Robins et *al*, 1991).

#### 1.3.4 Le glutathion

Le GSH réduit, aussi appelé L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine, est un tripeptide possédant un groupement thiol qui est un réducteur. Il se retrouve en grande concentration dans plusieurs tissus dont le foie. Le GSH est un antioxydant très important pour la cellule (Pompella et *al*, 2003). Le GSSG, une forme oxydée du GSH, comprend deux molécules de GSH liées par un pont disulfure. Le statut rédox de la cellule dépend du ratio de la forme réduite sur la forme oxydée (GSH/GSSG). Le GSH est sécrété en quantité importante dans la bile. Habituellement, la concentration de GSH sécrétée dans la bile est plus importante que celle du GSSG, suggérant un rôle dans la protection antioxydante de l'intestin des composés oxydants, provenant, entre autres, de l'alimentation. Une déficience en GSH, augmentant le stress oxydant, est observable dans plusieurs maladies (Townsend et *al*, 2003). Le GSH possède aussi des propriétés de détoxication. Ainsi, le GSH se lie aux xénobiotiques afin de permettre leur excrétion dans la bile ou dans l'urine (Pastore et *al*, 2003). L'enzyme impliquée dans cette réaction de conjugaison est la glutathion-S-transférase (Pompella et *al*, 2003).

### 1.3.5 La bilirubine

La bilirubine est un anion organique (OA<sup>-</sup>) qui provient de la dégradation chimique de l'hème. La sécrétion de la bilirubine dans la bile constitue la voie majeure de son élimination. C'est la molécule conférant la couleur jaune à la bile. Dans le plasma, la bilirubine étant faiblement soluble, elle est liée à l'albumine (Mayes PA, 1995). Le foie capte la bilirubine très efficacement et la conjugue avec l'acide glucuronique afin de l'éliminer dans la bile. La conjugaison de la bilirubine est catalysée par une glucuronosyltransférase spécifique et elle est excrétée dans la bile sous forme de bilirubine diglucuronide chez l'humain (la bilirubine monoglucuronide, étape intermédiaire chez l'humain, constitue toutefois la voie finale métabolique chez la souris). Une fois que la bilirubine est entrée dans le foie, elle est liée à des protéines cytosoliques qui lui confère une solubilité et empêche son efflux dans le sang. Ces protéines sont la ligandine et la protéine Y (Murray et Harper, 2003). Une fois la bile sécrétée dans l'intestin, la bilirubine est transformée dans la portion terminale de l'iléon et dans le colon, où les bactéries vont enlever les glucuronides liés à la bilirubine à l'aide d'enzymes spécifiques, les  $\beta$ -glucuronidases. Par la suite, la bilirubine sera encore modifiée par la flore intestinale en urobilinogène, une molécule sans couleur. Une partie de cet urobilinogène sera réabsorbée par la portion terminale de l'iléon et dans le colon pour effectuer le cycle entérohépatique. L'autre portion des molécules d'urobilinogène sera excrétée ou oxydée en urobiline, composé conférant la couleur aux fèces (Mayes PA, 1995).

### 1.4 Les transporteurs hépatobiliaires

Les transporteurs hépatobiliaires sont impliqués dans la capture et dans la sécrétion vers le sang ou dans la bile des divers constituants biliaires tel que les SB, les PL, le Chol, la bilirubine, le GSH, les anions et cations organiques et autres composés (voir la figure 5). À l'exception des SB, dont la circulation entérohépatique et la capture hépatique sont bien définis, les sources biliaires des autres composés demeurent questionnées. De plus, la formation de la bile s'effectue au niveau canaliculaire. Pour

ces raisons, dans le cadre de ce travail, nous nous limiterons, pour ces composés, à exposer leurs modes de transport canaliculaire. Il est à noter que dans la nomenclature des transporteurs hépatobiliaires, les abréviations des transporteurs (protéines) présents chez l'humain sont écrites en lettres majuscules alors que ceux présents chez les modèles animaux sont écrites en lettres minuscules (la première lettre étant en majuscule). Alors que dans la nomenclature des gènes de ces transporteurs, on utilise majuscule et italique pour l'humain et la première lettre majuscule suivie des autres lettres en minuscules, le tout en italique pour l'animal.

#### **1.4.1 Les transporteurs des sels biliaries**

##### **1.4.1.1 Les transporteurs des sels biliaries au niveau sinusoidal**

###### **1.4.1.1.1 NTCP**

Le NTCP, pour «sodium taurocholate cotransporting polypeptide » ou Ntcp chez les rongeurs (nom officiel du gène : *SLC10A1/Slc10a1* pour solute carrier family 10, member 1), est un transporteur dépendant du sodium. Il transporte les SB conjugués à la taurine ou à la glycine qui représentent la majorité des composants du pool des SB (Hagenbuch et al, 1991). Le NTCP/Ntcp transporte aussi le cholate non conjugué. La spécificité des substrats transportés par le NTCP/Ntcp ne se limite pas qu'aux SB. Ainsi, le NTCP/Ntcp transporte des hormones thyroïdiennes et sexuelles sulfatées, la bromosulfophtaléine (Meier et al, 1997) et le chlorambucil conjugués au TCA (Kullak-Ublick et al, 1997). Le mécanisme de transport actif permet au NTCP/Ntcp d'échanger, contre un gradient, un SB contre deux ions sodium. Ce mécanisme est électrogénique, c'est-à-dire qu'il est conduit par le gradient transmembranaire de  $\text{Na}^+$  lequel est maintenu à l'aide de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase et par le potentiel intracellulaire provenant de la diffusion de  $\text{K}^+$  vers l'extérieur (Trauner et Boyer, 2003 et Meier et al, 2002).

#### 1.4.1.1.2 OATPS

Les OATPS pour «organic anion transporting proteins» (nom officiel du gène : *SLC21A/Slc21a* pour solute carrier family 21) sont des transporteurs des AO<sup>-</sup>, de la famille « multispecific organic anion transporters », indépendants du sodium. Ceux-ci permettent le transport multi-directionnel des SB et plus particulièrement ceux non conjugués, dans ou hors de l'hépatocyte, mais aussi des AO<sup>-</sup> et CO<sup>+</sup>, des stéroïdes neutres, des hormones thyroïdiennes, de la bromosulfophtaléine, de la bilirubine, des glycosides cardiaques ainsi que plusieurs médicaments en fonction de leur gradient de concentration (Arrese et al, 2002, Meier et al, 2002). Ces transporteurs ont une activité moins importante que le NTCP. Le transport d'un OA<sup>-</sup> est effectué grâce à un mécanisme d'échange facilité avec un anion comme le GSH ou le HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Hagenbuch et al, 2003). Chez l'humain, les principaux transporteurs OATPS hépatiques transportant les SB sont les OATP-A (*SLCO1A2*), OATP-B (*SLC21A9*), OATP-C (*SLC21A6*) et OATP-8 (*SLC21A8*) (Kullak-Ublick et al, 2001). OATP-C, aussi nommé LST-1, OATP-2 ou OATP-6, est considéré comme étant le plus important transporteur des SB indépendants du sodium.

Chez le rat, les principaux Oatps sont Oatp-1 (*Slc21a1*), Oatp-2 (*Slc21a5*), Oatp-3 (*Slc21a7*) et Oatp-4 (*Slc21a10*). Récemment, Oatp-4 a été identifié comme étant l'isoforme complète de rlst-1 pour « rat liver specific organic anion transporter » et représente la forme la plus fonctionnelle chez le rat (Cattori et al, 2000). rlst-1 est un homologue de LST-1, le transporteur présent chez l'humain et il est un transporteur important des SB chez le rat (Kakyo et al, 1999). Bien que r-1st1 transporte seulement le TCA, Oatp4 transporte une grande variété de substrats tels que des SB non conjugués, la bromosulfophtaléine, des anions et cations organiques, des stéroïdes neutres, des hormones thyroïdiennes, la bilirubine, des glycosides cardiaques et plusieurs médicaments (Cattori et al, 2000).

Tout comme chez le rat, le foie de la souris exprime les transporteurs Oatp-1 (*Slc21a1*), Oatp-2 (*Slc21a5*), et Oatp-4 (lst-1) (*Slc21a10*). Oatp1 murin a été identifié comme étant l'orthologue du rat puisqu'il possède une très grande ressemblance dans sa séquence d'acides aminés ainsi que les mêmes fonctions et spécificités pour les substrats que celui du rat (Hagenbuch et *al*, 2000). Les recherches faites par Ogura et son équipe ont permis le clonage et la découverte de l'organisation génomique de Oatp-2 et de lst-1 (Ogura et *al*, 2000 et 2001).

#### 1.4.1.1.3 ABCC4

ABCC4/*Abcc4* (gène : *ABCC4/Abcc4*), membre de la famille des «ATP-binding cassette» de la sous-famille C, membre 4, est aussi nommé MRP4/*Mrp4* (Multidrug resistance-associated protein 4). Il est présent sur la membrane basolatérale et permet le transport de l'hépatocyte au sang. Il transporte les AO<sup>-</sup> et les SB sulfatés (produits surtout en condition cholestatique), les nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) ainsi que les anti-rétroviraux (Assem et *al*, 2004 et Rius et *al*, 2005). ABCC4 diminue l'efficacité médicamenteuse des nucléosides monophosphates acycliques, comme le PMEG (9-(2-phosphonylmethoxyethyl)-guanine), PMEAA (9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine) et l'azidothymidine monophosphate; des médicaments anti-viraux ou anti-VIH (Schuetz et *al*, 1999). De plus, ce transporteur sécrète les prostaglandines E1 et E2 (PGE1 et PGE2) (Reid et *al*, 2003).

#### 1.4.1.2 Le transport intracellulaire des sels biliaires

Les mécanismes par lesquels le transport des SB est effectué sont très mal définis. Premièrement, les SB se lient à des protéines cytoplasmiques et diffusent jusqu'à la membrane canaliculaire. Ces protéines sont la glutathion-s-transférase, la 3- $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase, la L-FABP (fatty acid binding protein) chez le rat et la «bile acid binding protein» chez l'humain (Agellon et *al*, 2000, Stolz et *al*, 1989).

Un deuxième mécanisme consiste au transport des SB libres (non liés aux protéines) dans des vésicules intracellulaires. Suite à leur synthèse et maturation, les transporteurs canaliculaires quittent l'appareil de Golgi dans des vésicules afin d'être livrés à la membrane canaliculaire. Puisque les transporteurs présents dans les vésicules sont fonctionnels, ils pourraient être actifs et transporter les SB à l'intérieur des vésicules tout en ce dirigeant vers la membrane (Kipp et Arias, 2002).

#### **1.4.1.3 Les transporteurs des sels biliaires au niveau canaliculaire**

##### **1.4.1.3.1 ABCB11**

ABCB11/*Abcb11* (gène : *ABCB11/Abcb11*), un membre de la famille des « ATP binding cassette » de la sous-famille B et membre 11, a été initialement nommé SPGP/*Spgp* pour « sister of P-glycoprotein ». Par la suite, cette protéine a été renommée BSEP/*Bsep* pour « bile salt export pump » pour finalement être formellement désignée comme étant ABCB11/*Abcb11*. Les SB contenus dans les hépatocytes, provenant de la circulation entérohépatique ou de la synthèse *de novo* à partir du Chol, sont sécrétés majoritairement dans la bile par le transporteur ABCB11 (Gerloff et *al*, 1998). ABCB11 transporte de façon ATP-dépendante les SB monovalents comme le TCA, le glycocholate, le taurochéno-deoxycholate (TCDCA) et le tauroursodésoxycholate (TUDCA) (Trauner et *al*, 2003).

Une étude a montré que lorsque le gène *Abcb11* est inactivé chez la souris, la sécrétion des SB est réduite à 30% par rapport au groupe contrôle, suggérant la présence d'un autre transporteur ou système de transport des SB (Wang et *al*, 2001). Il n'est toutefois pas impossible qu'un seul transporteur soit exprimé en condition physiologique normale et qu'un mécanisme compensatoire puisse être activé en absence de ce transporteur (Wang et *al*, 2001). Le profil des AB sécrétés dans ces conditions confirme qu'*Abcb11* est essentiel pour le transport de CA conjugué ainsi que des SB dihydroxylés donc des SB plutôt hydrophobes. Le système de transport « alternatif » semble permettre la sécrétion des SB hydrophiles comme les

muricholates (trihydroxylés) et les tétrahydroxylés. Récemment, ce même groupe de recherche a proposé que, chez les souris knock-out pour le gène *Abcb11*, le niveau de transporteurs *Mdr1* soit plus élevé que chez la souris sauvage fournissant une voie alternative dans le transport des SB. En fait, l'étude a montré que *Mdr1* est capable de transporter des AB dans un modèle d'une lignée cellulaire résistante aux médicaments qui exprime un haut niveau de *Mdr1* (Lam et al, 2005).

#### 1.4.1.3.2 ABCC2

ABCC2/*Abcc2*, aussi appelé MRP2/*Mrp2* pour le «multidrug resistance-associated transporter 2», est un autre membre de la grande famille des «ATP-binding cassette» localisé au domaine canaliculaire de l'hépatocyte. Anciennement, il était nommé cMOAT pour le «canalicular multispecific organic anion transporter». ABCC2/*Abcc2* est une glycoprotéine membranaire d'environ 190 KDa (Keppler et König, 1997) codé par le gène *ABCC2/Abcc2*. ABCC2 permet l'excrétion dans la bile de SB dianioniques 3-sulfaté et 3-glucuronidé ainsi que les esters sulfatés de l'acide lithocholique (Akita et al, 2001). En plus de ces SB, la liste des principaux SB sécrétés par ABCC2/*Abcc2* est énumérée dans le tableau 4 de la section 1.4.4.1.

#### 1.4.1.4 Le transporteur des sels biliaires au niveau latéral

##### 1.4.1.4.1 ABCC3

ABCC3/*Abcc3* (gène : *ABCC3/Abcc3*), membre de la famille des «ATP-binding cassette», est aussi connu sous le nom de MRP3 pour «multidrug resistance-associated transporter 3». Chez l'humain, ABCC3 transporte les glycocholates, les GSH conjugués et d'autres SB, mais pas le TCA (Zeng et al, 2000). *Abcc3* est localisé au niveau latéral des hépatocytes afin de permettre l'excrétion des SB divalents (sulfate de tauroolithocholate) et monovalents (tauro et glycocholate), xénobiotiques et des  $AO^-$  vers le sang (Hirohashi et al, 2000) chez le rat.

## 1.4.2. Les transporteurs canaliculaires des phospholipides

### 1.4.2.1 ABCB4

ABCB4/Abcb4 codé par le gène *ABCB4/Abcb4* est le membre 4 de la super famille des «ATP-binding cassette» de la sous classe B, anciennement dénommé MDR3 pour « multidrug resistance-3 P-glycoprotein » (Mdr2 chez la souris et le rat), est une flippase impliquée dans la translocation ATP dépendante de la PC du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche lipidique canaliculaire (Nies et *al*, 1996). L'absence de cette protéine dans un modèle de souris a montré une absence de sécrétion des PC biliaires dans la bile (Smitt et *al*, 1993). ABCB4/Abcb4 détermine le profil des PL biliaires retrouvés dans la bile.

### 1.4.2.2 ATP8B1

Une autre protéine, ATP8B1/Atp8b1 (ATPase, Classe I, type 8B, membre 1) ou FIC1/Fic1, est localisée à la membrane canaliculaire. Son nom, FIC1, provient simplement de la maladie génétique qu'il cause (PFIC1). Il a été proposé que ce gène code pour une ATPase de type-P type IV, une aminophospholipide transférase, qui permet de maintenir la PS et la PE dans la couche interne de la membrane plasmique par flip-flop du feuillet externe vers le feuillet interne (Tang et *al*, 1996, Bull et *al*, 1998 et Harris et *al*, 2003). Son rôle serait en fait de maintenir une asymétrie dans les membranes et de transporter certains métaux et ions (Harris et *al*, 2003). Cependant, la fonction d'ATP8B1/Atp8b1 n'est encore qu'hypothétique.

### 1.4.3 Le transporteur canaliculaire du cholestérol

#### 1.4.3.1 ABCG5/ABCG8

Récemment deux hémi-transporteurs, ABCG5/ABCG8 (*Abcg5/Abcg8* chez les rongeurs), membres de la super famille des «ATP-binding cassette» de la sous classe G, ont été identifiés comme étant impliqués dans le transport du sitostérol (stérol d'origine végétal) et du Chol dans la bile (Graf et *al*, 2002). Ils sont codés par les gènes *ABCG5/ABCG8* et *Abcg5/Abcg8* chez les humains et les rongeurs respectivement. Une étude a démontré que l'augmentation de l'expression d'ABCG5/ABCG8 (*Abcg5/Abcg8* chez les rongeurs) encourage la sécrétion biliaire du Chol et réduit l'absorption du Chol alimentaire (Yu et *al*, 2002b).

L'absence d'ABCG5/G8 ou *Abcg5/g8* inhibe presque totalement la sécrétion du Chol dans la bile. Ainsi, une étude chez la souris *Abcg5/g8 (-/-)* comparé avec la souris sauvage a montré une concentration biliaire du Chol de 0,4 vs 5,5  $\mu\text{mol/ml}$  respectivement (Yul L, 2002a).

### 1.4.4 Les transporteurs canaliculaires des anions organiques et du GSH

#### 1.4.4.1 ABCC2

En plus de la sécrétion de certains SB conjugués, ABCC2/*Abcc2* est impliqué dans la sécrétion biliaire ATP-dépendante du GSH réduit et oxydé, de la bilirubine, de plusieurs glutathions glucuronidés, de sulfates et glucuronides conjugués, de leucotriènes et autres  $\text{AO}^-$  non conjugués (Suzuki et *al*, 2002, voir les tableaux 4 ci-dessous). ABCC2/*Abcc2* est un transporteur très important puisqu'il a un rôle dans la formation de la bile par sa sécrétion de GSH qui génère un débit biliaire (Ballatori et Truong, 1992) ainsi que dans la détoxification hépatique. Les fonctions d'ABCC2/*Abcc2* seront largement discutées dans les prochaines sections. D'autres

transporteurs peuvent aussi être impliqués dans le transport des  $AO^-$ , mais ils ne sont toujours pas bien caractérisés.

Tableau IV : Principaux composés transportés par ABCC2.

<u>Leukotriènes Cystéinyles</u>	<u>Composés non-conjugués</u>
LTC4	Bromosulfofphthaléine
LTD4	Dibromosulfofphthaléine
LTE4	Carboxyfluorescéine
LTE4 N-Acétyle	Folates réduits
	Methotrexate
<b><u>GSH et GSH conjugués aux composés organiques</u></b>	CPT-11 (carboxylate)
Glutathion réduit (GSH)	SN-38 (carboxylate)
Glutathion disulfure (GSSG)	Ampicilline
2,4-Dinitrophényl-S-glutathion	Ceftriaxone
Glutathion-bimane	Cefodizime
GSH conjugué au bromosulfofphthaléine	Grepafloxacin
GSH conjugué au bromoisovalérylurée	Pravastatine
GSH conjugué au N-éthylmaléimide	Temocaprilat
GSH conjugué à l'acide éthacrynique	BQ123
GSH conjugué au a-naphthylisothiocyanate	Acide p-Aminohippurique
GSH conjugué au méthylfluorescéine	Fluo-3
GSH conjugué à la prostaglandine A1	Sulfinpyrazone (couplé au GSH)
GSH conjugué au (1)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-époxyde	Vinblastine (couplé au GSH)
GSH conjugué au 4-hydroxynonanal	PhPI (couplé au GSH)
	Etoposide
<b><u>GSH conjugué aux métaux</u></b>	Vincristine
Antimoine	Doxorubicine
Arsenic	Epirubicine
Bismuth	Cisplatine
Cadmium	
Cuivre	
Argent	
Zinc	

Tableau IV (suite). Principaux composés transportés par ABCC2.

<b>Glucuronide conjugué</b>	<b>Conjugué aux sels biliaires</b>
Bilirubine monoglucuronide	Cholate-3-O-glucuronide
Bilirubine diglucuronide	Lithocholate-3-O-glucuronide
Estradiol 17 $\beta$ -D-glucuronide	Chénodésoxycholate-3-O-glucuronide
triiodothyronine-glucuronide	Nordésoxycholate 3-O-glucuronide
p-Nitrophenol-b-D-glucuronide	Nordésoxycholate-3-sulfate
1-Naphtyol-b-D-glucuronide	Lithocholate-3-sulfate
E3040 glucuronide	Taurolithocholate-3-sulfate
SN-38 glucuronide	Glycolithocholate-3-sulfate
Grepafloxacin glucuronide	Taurochénodésoxycholate-3-sulfate
4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol glucuronide	
Telmisaltan glucuronide	<b>Conjugué au Sulfate</b>
Acétaminophène glucuronide	Déshydroépiandrosterone sulfate
Diclofenac glucuronide	
Indométhacine glucuronide	
Glucuronide conjugué au PhIP et à ses métabolites	
Liquiritigenin glucuronide	
Glycyrrhizin	

(Adapté de Suzuki et al, 2002)

## 1.4.5 Le transporteur canaliculaire des cations organiques

### 1.4.5.1 ABCB1

ABCB1 (gène : *ABCB1*) ou MDR1 (multidrug resistance-1 P-glycoprotein), un autre membre de la famille des «ATP-binding cassette», est le transporteur canaliculaire des cations organiques, des composés organiques neutres, des xénobiotiques et des cytotoxines dans la bile (Elferink et Groen, 2002). La souris et le rat possèdent deux gènes orthologues à celui de l'humain. Ils codent pour les transporteurs *Abcb1a/Mdr1a* et *Abcb1b/Mdr1b* (gène : *Abcb1a* et *Abcb1b*). Les souris *Mdr1a*(-/-) et *Mdr1b*(-/-) ont un débit biliaire normal, mais ont une grande réduction de la sécrétion des composés organiques normalement excrétés (Arrese et Accatino, 2002).

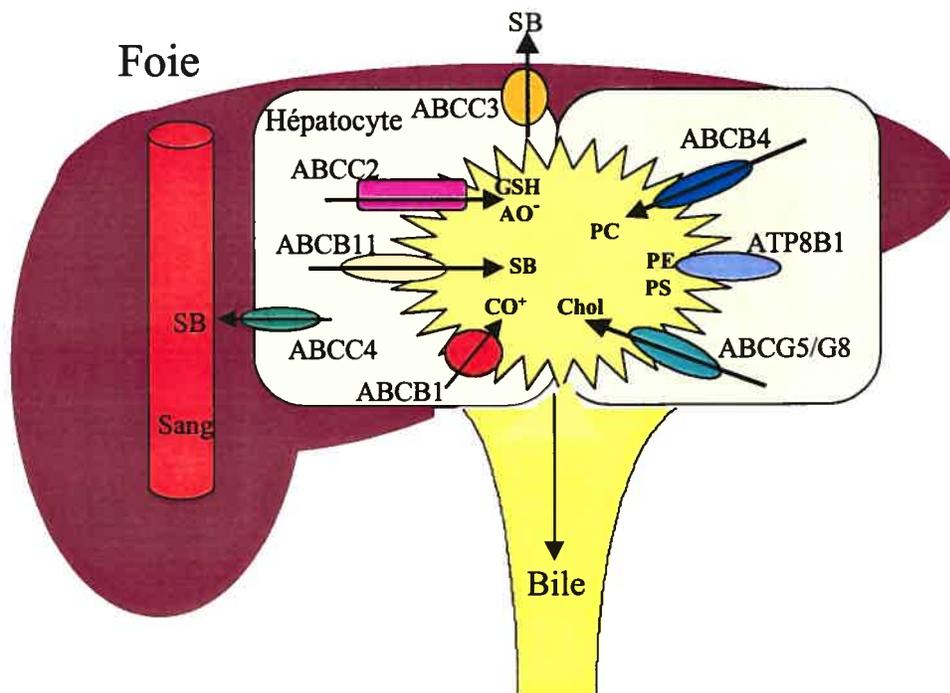


Figure 5 : Les transporteurs et leur localisation.

## 1.5 Les mécanismes de régulation des transporteurs hépatobiliaires

### 1.5.1 La régulation transcriptionnelle des transporteurs hépatobiliaires

L'expression des gènes des transporteurs canaliculaires de la famille des «ATP-binding cassette» est régulée, entre autres, par certains membres de la famille des récepteurs nucléaires. Afin que ces récepteurs soient activés, ils doivent être liés à leurs ligands spécifiques. Les principaux ligands et récepteurs nucléaires impliqués sont regroupés dans le Tableau 5 (voir aussi la figure 6).

Chez l'humain, l'augmentation hépatocellulaire des SB induit l'activation du récepteur nucléaire des AB, FXR, entraînant une augmentation de l'expression des

transporteurs canaliculaires. En effet, lorsque les SB se lient à FXR, plusieurs promoteurs des gènes des transporteurs hépatobiliaires sont activés au niveau transcriptionnel. Ces gènes, au niveau canaliculaire, sont *ABCB4* (Huang et al, 2003), *ABCB11* (Ananthanarayanan et al, 2001, Sinal et al, 2000), *ABCC2* (Kast et al, 2002) et *ABCG5/ABCG8* (Yul et al, 2005) permettent d'augmenter la sécrétion des différents composés biliaires. *Abcc2* est aussi induit par les récepteurs nucléaires PXR et CAR (Kast et al, 2002). *Abcb4* peut aussi être induit par PPAR $\alpha$  (Kok et al, 2003).

Au niveau sinusoidal, FXR active le gène OATP-8 (Jung et al, 2002) permettant la sécrétion vers le sang des AO<sup>-</sup>. De plus, FXR active la transcription de SHP-1. SHP-1 est responsable de l'inhibition de la transcription de NTCP, le principal transporteur impliqué dans la capture des SB de l'hépatocyte. NTCP est réprimé par l'action de FXR via SHP-1 puis RXR-RAR (Denson et al, 2001). FXR réprime aussi OATP-C (Kullak-Ublick et al, 2004). Cette répression permet de diminuer la captation de SB, d'anions et de cations organiques par les hépatocytes. Ces mécanismes permettent à l'hépatocyte de se protéger contre l'effet d'une accumulation intracellulaire de SB.

Chez la souris et le rat, l'activation du récepteur nucléaire FXR a lieu, tout comme chez l'humain, suivant une augmentation hépatocellulaire des SB. Cette augmentation des SB peut avoir lieu suite à l'administration d'une diète contenant 1% de CA. De la même façon que chez l'humain, il se produit une activation, via FXR, d'*Abcb11* et aussi d'*Abcc2* (Fickert et al, 2001, Kast et al, 2002) afin d'augmenter la sécrétion des SB dans la bile. De plus, *Abcb4* et *Abcg5/Abcg8* sont aussi activés au niveau transcriptionnel par FXR (Crocenzi et al, 2004). L'activation de ces gènes permet d'augmenter la sécrétion des divers composés dans la bile. Au niveau sinusoidal, *Ntcp* est réprimé par la voie de FXR (FXR active SHP-1 qui lui réprime RXR-RAR, l'activateur de *NTCP*) (Denson et al, 2001).

Tableau V : Récepteurs des hormones nucléaires impliqués dans la régulation transcriptionnelle des transporteurs hépatobiliaires

Récepteurs nucléaires	Ligands	Principaux gènes régulés	Conséquences
FXR (Farnesoid X receptor)	SB hydrophobes, Farnesol	<i>SHP-1</i> , <i>ABCB11</i> , <i>ABCC2</i> , <i>OATP8</i>	Régulation positive d' <i>ABCC2</i> , <i>SHP-1</i> , <i>ABCB11</i> , <i>OATP8</i> Repression de <i>NTCP</i> via <i>SHP-1</i>
PXR (pregnane X receptor) chez les rongeurs SXR (steroid X receptor) chez l'humain	Xénobiotiques, ursodésoxycholate, lithocholate	<i>Oatp-2</i> <i>ABCC2</i> <i>ABCB1</i>	Régulation positive de <i>Oatp-2</i> , <i>ABCC2</i> et d' <i>ABCB1</i>
CAR (constitutive androstene receptor)	Xénobiotiques	<i>ABCC2</i> <i>ABCC3</i>	Régulation positive de <i>ABCC2</i> et <i>ABCC3</i>
RAR $\alpha$ (retinoic acid receptor)	Rétinoïdes	<i>Ntcp</i> , <i>ABCC2</i>	Régulation positive de <i>Ntcp</i> et de <i>ABCC2</i>
SHP-1 (short heterodimeric protein-1)	Aucun	<i>Ntcp</i> <i>OATP-C</i>	Répression de <i>Ntcp</i> et de <i>OATP-C</i>
PPAR- $\alpha$ (peroxisome proliferator activator- $\alpha$ )	Acides gras Leucotriènes Eïcosanoïdes	<i>Abcb4</i>	Régulation positive d' <i>Abcb4</i>

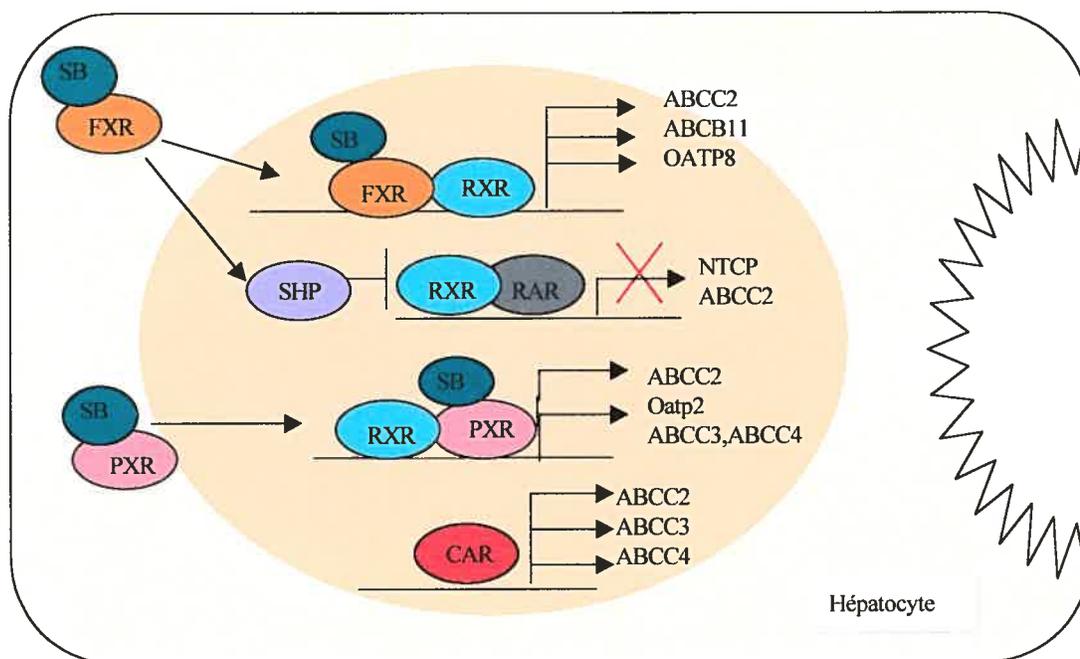


Figure 6 : Rôle de FXR et PXR dans la régulation transcriptionnelle des transporteurs hépatobiliaires

### 1.5.2 La régulation post-transcriptionnelle et post-traductionnelle des transporteurs canaliculaires

Il existe peu de données connues au sujet de la régulation post-transcriptionnelle des transporteurs canaliculaires. Toutefois, la connaissance de la régulation post-traductionnelle des transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire est mieux définie. Celle-ci permet un contrôle des transporteurs à court terme (minutes) par un changement dans la localisation ou dans le statut de phosphorylation des transporteurs de la famille des ABC.

### 1.5.2.1 La régulation post-traductionnelle selon un changement dans la localisation des transporteurs canaliculaires

Il existe deux sources de transporteurs ABC. Premièrement, ceux nouvellement synthétisés dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) qui sont ensuite transportés dans le complexe du Golgi et par la suite, à la membrane canaliculaire (Kipp et *al*, 2001). Deuxièmement, un pool de transporteurs, dans des endosomes appelées vésicules péricanaliculaires, est localisé près de la membrane canaliculaire. Les transporteurs présents dans ces vésicules péricanaliculaires sont ABCC2/Abcc2, ABCB11/Abcc11, ABCB1/Abcb1 et ABCB4/Abcb4 (Kipp et *al*, 2001 et Crocenzi et *al*, 2004). Ils sont nouvellement synthétisés ou recyclés.

La présence de ce pool de transporteurs permet d'augmenter ou de diminuer rapidement la quantité de transporteurs à la membrane à l'aide de l'insertion de ces vésicules dans la membrane canaliculaire ou de la récupération des transporteurs dans les vésicules péricanaliculaires, selon la demande des conditions physiologiques (Kipp et Arias, 2002). En combinaison au taux de synthèse, ce mécanisme semble être la voie majeure de la régulation des transporteurs canaliculaires et de la sécrétion biliaire (voir la figure 7, Figure adaptée de Crocenzi et *al*, 2004).

Un changement dans le volume cellulaire a la capacité de stimuler la mobilisation ou la récupération des transporteurs canaliculaires. Ainsi, l'hyperosmolarité va causer une diminution du volume cellulaire et de la sécrétion biliaire de l'hépatocyte (Schmitt et *al*, 2001) et stimuler l'endocytose des transporteurs canaliculaires dans les vésicules péricanaliculaires (Kubitz et *al*, 1997). À l'inverse, un hépatocyte ayant subi un gonflement dû à un milieu hypoosmotique aura une augmentation de sa sécrétion biliaire et de TCA causée par une relocalisation membranaire des transporteurs canaliculaires présents dans les vésicules péricanaliculaires (Kubitz et *al*, 1997). Ce gonflement cellulaire active des canaux Cl<sup>-</sup> afin de permettre un efflux d'anions essentiels au rétablissement du volume cellulaire (Lang et *al*, 1998). Ces changements du niveau d'expression des transporteurs à la membrane canaliculaire

(et de la sécrétion biliaire) sont plus précisément associés aux phases de rétablissement du volume cellulaire, soit le RVI (regulatory volume increase) dans le cas d'une cellule qui a subi une diminution de volume ou le RVD (regulatory volume decrease) dans le cas d'une cellule qui a subi un gonflement cellulaire. Suivant le RVD, une cellule peut ne pas avoir atteint son volume initial et les électrolytes intracellulaires peuvent demeurer dilués (Graf et *al*, 1996).

Plusieurs autres facteurs peuvent provoquer la récupération ou l'endocytose des transporteurs canaliculaires (Abcc2 et Abcb11) dans les vésicules péricanaliculaires tels que l'administration d'E<sub>2</sub>17G (Mottino et *al*, 2002 et Crocenzi et *al*, 2003a), de phalloïdine (Rost et *al*, 1999), de LPS (Vos et *al*, 1998 et Kubitz et *al*, 1999) et de tauroolithocholate (TLCA) (Beuers et *al*, 2001 et Crocenzi et *al*, 2003b) menant tous à une diminution de la sécrétion biliaire. Le TCA (en dose non-cholestatique) (Kipp et *al*, 2001), le tauroursodésoxycholate (TUDC) (Beuers et *al*, 2001), l'AMPc ou le DBcAMP (Roelofsen et *al*, 1998) vont, à l'inverse, stimuler la mobilisation ou l'insertion dans la membrane des transporteurs canaliculaires présents dans les vésicules péricanaliculaires. Bien que la plupart des références dans le présent paragraphe soient des études menées sur le transporteur ABCC2/Abcc2, la régulation à court terme d'ABCB11/Abcb11 se fait de façon semblable (Kipp et Arias, 2002).

Les mécanismes par lesquels les transporteurs sont mobilisés et récupérés à la membrane canaliculaire ne sont pas connus en détails. Cependant, le mécanisme de transport des vésicules vers la membrane est un processus dépendant des microtubules puisqu'il est arrêté par la colchicine, un inhibiteur de la fonction des microtubules (Kipp et *al*, 2000). Toutefois, l'endocytose n'est pas affectée par la colchicine. Une étude a montré que le rétablissement de la cholestase induite par l'E<sub>2</sub>17G est un processus dépendant des microtubules (Mottino et *al*, 2004). Ceux-ci permettent le retour d'Abcc2 à la membrane canaliculaire dans les vésicules péricanaliculaires. L'endocytose induite par l'E<sub>2</sub>17G n'est pas un processus nécessitant l'intégrité des microtubules.

D'autres protéines semblent avoir un rôle à jouer dans la localisation et le mouvement péricanaliculaire des transporteurs canaliculaires. La radixine fait partie d'une famille de protéines nommée ezrine-radixine-moesine (ERM) qui interagissent avec les filaments d'actine et les protéines transmembranaires. Une étude a montré que l'interaction d'Abcc2 avec la radixine semble nécessaire pour sa localisation canaliculaire (kikuchi et *al*, 2002). Pour arriver à cette conclusion, une expérimentation utilisant une souris qui n'exprime pas la radixine a montré que la souris n'avait pas de transporteurs Abcc2 à la membrane canaliculaire et par conséquent, elle a développé une hyperbilirubinémie conjuguée. Une étude a montré que HAX-1 s'associe avec Abcb11, Abcb1 et Abcb4 dans la membrane canaliculaire chez le rat et suggère que HAX-1 pourrait avoir un rôle à jouer dans l'endocytose d'Abcb11 (Ortiz et *al*, 2004).

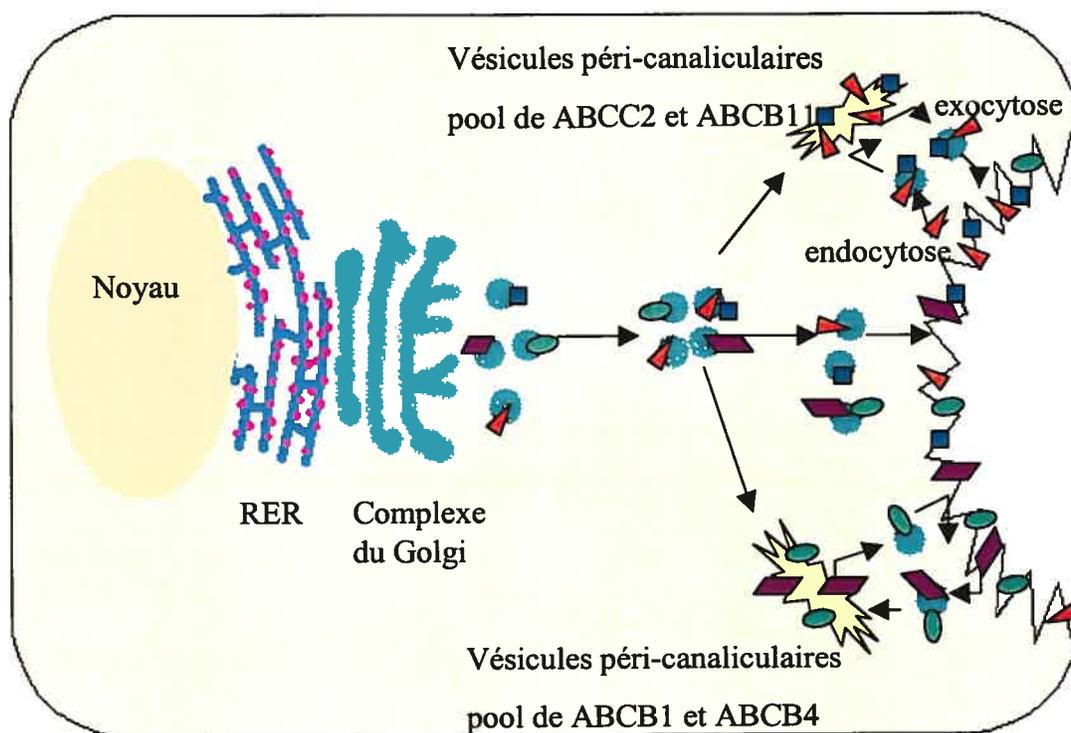


Figure 7 : Mouvement des transporteurs canaliculaires, nouvellement synthétisés ou déjà présents dans le pool des vésicules péricanaliculaires, vers la membrane apicale.

### 1.5.2.2 La régulation post-traductionnelle selon un changement dans le statut de phosphorylation des transporteurs.

Le deuxième mode de régulation des transporteurs de la famille des ABC est le niveau de phosphorylation. Plusieurs sites putatifs de phosphorylation ont été identifiés chez la plupart des transporteurs canaliculaires (Crocenzi et *al*, 2004). Cependant, on connaît encore très mal comment la modification dans le statut de phosphorylation agit sur la fonction du transporteur. Ainsi, l'activité de transport de ces protéines est régulée par des protéines kinases et phosphatases, qui font des réactions de phosphorylations et de déphosphorylations respectivement. Ces changements dans le statut de phosphorylation permettent un changement rapide de l'activité de transport de la protéine. Le transporteur ABCC2 est phosphorylé par la protéine kinase C (PKC) (Pikula et *al*, 1994a et 1994b). Des études ont montré que cette phosphorylation augmente significativement le  $V_{\max}$  de l'activité de transport pour son substrat dinitrophényl-S-glutathion (GS-DNP), mais pas son  $K_m$  (Pikula et *al*, 1994a et 1994b).

Comme mentionné précédemment, plusieurs conditions amènent l'introgession des transporteurs canaliculaires dans les vésicules péricanaliculaires. Bien que normalement ce phénomène permette un ajustement de la sécrétion biliaire aux conditions physiologiques demandées, ces mécanismes de régulation peuvent mener dans certain cas au développement de la cholestase.

## 1.6 Cholestase

### 1.6.1 Définition et généralités

La cholestase est caractérisée par une diminution ou un arrêt de la sécrétion biliaire normale et par l'accumulation dans le foie et dans le sang de molécules normalement sécrétées dans la bile (Crocenzi et *al*, 2004). La sécrétion biliaire étant altérée, les composés toxiques s'accumulent dans le foie menant à d'importants dommages. Cette accumulation provoque un reflux vers le sang de molécules normalement sécrétées dans la bile. Ainsi, plusieurs molécules habituellement sécrétées dans la bile comme les SB, la bilirubine et le Chol peuvent se retrouver en concentration élevée dans le sérum menant à une jaunisse (hyperbilirubinémie) (van Mil, 2005). La maladie produit une malabsorption intestinale des lipides alimentaires ainsi que des vitamines liposolubles. Il y a aussi une diminution de la sécrétion du GSH, un antioxydant et des IgA dans l'intestin. L'élimination urinaire des SB est augmentée dans des conditions cholestatiques tant chez l'humain que chez le modèle animal (Trauner et Boyer, 2003).

La cholestase peut être intrahépatique, causée par une altération dans la formation de la bile ou extrahépatique, provoquée par l'obstruction des canaux hépatiques par des calculs biliaires ou par une tumeur (Arrese et Trauner, 2003). La cholestase intrahépatique peut être d'étiologie génétique (pure), acquise ou complexe (interactions gènes/environnement). Des mutations dans plusieurs gènes, et surtout dans des protéines canaliculaires et plus précisément des transporteurs hépatobiliaires, menant à leur absence à la membrane canaliculaire, ont été identifiées au cours des dernières années. Ces mutations représentent les bases moléculaires de certaines formes sévères de cholestases intrahépatiques familiales progressives. Celles-ci seront décrites de façon détaillée dans la section 1.6.3. Les cholestases dites acquises s'associent à une réaction pathologique suite à la présence de médicaments ou composés cholestatiques (voir tableau 6, Jansen et Müller, 2003), d'infections (septicémie à gram négatif produisant des endotoxines) (Oude Elferink, 2003),

d'hormones (contraceptifs oraux ou grossesse), de problèmes métaboliques ou d'auto-immunité (Trauner et *al*, 1998a).

Il a toutefois été remarqué que les cholestases «acquises» (toxicologiques ou médicamenteuses) ont souvent une association familiale qui peut laisser suggérer une contribution génétique. Plusieurs familles ont une sensibilité accrue et sont affectées par la cholestase suivant la prise de certains médicaments ou de contraceptifs oraux à des doses pharmacologiques. Certaines de ces cholestases sont causées par des variantes génétiques menant à une plus grande sensibilité aux facteurs environnementaux. La présence de ces variantes génétiques combinées aux facteurs environnementaux semble, via des mécanismes inconnus, perturber l'homéostasie des AB et amener une toxicité hépatique conduisant à une diminution de la quantité ou de la capacité de transport maximale de transporteurs présents à la membrane canaliculaire (Eloranta et *al*, 2003 et Dixon et *al*, 2000). Les mécanismes précis menant au développement de la cholestase dans ces conditions sont toutefois encore incompris. De plus amples détails seront donnés sur ces cholestases dans la section 1.6.3.

Tableau VI : Médicaments ou composés ayant la capacité d'induire la cholestase intrahépatique.

Médicaments ou molécules cholestatiques
estradiol-17- $\beta$ -glucuronide
Cyclosporine A
Rifamycine
Rifampicine
Glibenclamide
Bosentan
Phalloïdine
Dexaméthazone
Acétaminophène
LPS
Acides biliaires

Plusieurs enzymes sériques peuvent être analysées afin de diagnostiquer une cholestase. Les enzymes sériques tel que la phosphatase alcaline (PA), la leucine aminopeptidase (LAP), la  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase (GGT), la 5'-nucléotidase (5'Nu) ainsi que les transaminases (aspartate aminotransférase (AST) et alanine aminotransférase (ALT)) sont des marqueurs cholestatiques qui reflètent des dommages au niveau canaliculaire (PA et LAP), ductulaire (GGT) et hépatocytaire (5'Nu, ALT et AST) (Reichen et Simon, 1988).

### **1.6.2. Changements dans la fonction et dans la structure de l'hépatocyte**

On retrouve, dans la plupart des cas de cholestase, tant chez l'humain que chez le modèle animal, des changements structuraux et fonctionnels importants au niveau de l'hépatocyte. En effet, la cholestase est associée à plusieurs perturbations au niveau du cytosquelette et des microtubules, des jonctions étanches et de la perte de la polarité de l'hépatocyte, de l'expression des transporteurs hépatobiliaires, de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie ainsi que dans la fluidité membranaire (Trauner et Boyer, 2003). Ils seront tous brièvement décrits. Cependant, il n'est pas encore connu si ces changements sont primaire ou secondaire à la cholestase. Toutefois, les travaux des dernières années ont confirmé un rôle majeur et primaire aux transporteurs canaliculaires. Ils seront traités en détail dans la section 1.6.3.

#### **1.6.2.1 Changement dans la perméabilité des jonctions étanches et perte de la polarité**

Lors de la cholestase induite par l'éthinylestradiol chez le rat, une désorganisation des jonctions étanches peut contribuer à la perte du gradient osmotique nécessaire à la formation de la bile (Anderson et *al*, 1996 et Rahner et *al*, 1996). Des jonctions étanches altérées augmentent la perméabilité para-cellulaire et la régurgitation des constituants biliaires dans le sang (Trauner et *al*, 1998a).

### **1.6.2.2 Changement dans la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie**

Plusieurs médicaments peuvent causer une hépatotoxicité par inhibition de la  $\beta$ -oxydation, par interaction avec l'ADN ou en affectant la respiration mitochondriale (Kaplowitz et *al*, 2003). Lors de la cholestase, l'accumulation de certains SB hydrophobes cause des dommages hépatocytaires. Une étude visant à vérifier, dans les mitochondries isolées de foie de rat, si la cytotoxicité des SB est effectuée, entre autres, via une altération mitochondriale, a conclu que certains SB à des doses toxicologiques causent des altérations au niveau bioénergétique dans les mitochondries (Rolo et *al*, 2000). Dans ces conditions, la membrane interne de la mitochondrie peut subir une augmentation de perméabilité due à l'ouverture de pores laissant passer des molécules ou des ions de moins de 1500 Da (Zorratti et *al*, 1995). Cette perméabilité cause une rapide dépolarisation et un gonflement de la mitochondrie résultant en une inhibition de la phosphorylation oxydative et en une diminution de la production d'ATP (Zorratti et *al*, 1995).

### **1.6.2.3 Changement de la fluidité membranaire**

Comme il a déjà été mentionné, la fluidité membranaire influence directement l'activité et la fonction des transporteurs des divers composés biliaires, mais aussi des enzymes membranaires en modifiant les interactions dans la bicouche lipidique (Asamoto et *al*, 2001). Lors de la cholestase induite par l'éthinylestradiol, la fluidité membranaire est diminuée de façon importante. Il a été proposé que cette diminution de la fluidité membranaire soit impliquée dans la diminution du débit biliaire et de l'activité ATPase sodium/potassium dépendant des transporteurs (Berr et *al*, 1984, Vore et *al*, 1987). Une étude plus récente, utilisant un modèle de rat cholestatique induit par la ligature du cholédoque, a aussi montré un changement dans les transporteurs canaliculaires ainsi que dans la composition lipidique de la membrane menant à une diminution de la fluidité membranaire (Hyogo et *al*, 2001).

#### **1.6.2.4 Changement au niveau du cytosquelette et des microtubules**

Dans la majorité des cholestases, il se produit des changements au niveau du cytosquelette des hépatocytes. De tels changements arrivent près de la région canaliculaire et des jonctions étanches. Ces perturbations peuvent être au niveau des microtubules, de l'accumulation des microfilaments d'actine ou encore de l'augmentation des filaments intermédiaires dans la région canaliculaire (Trauner et *al*, 1998). Une perturbation du cytosquelette peut causer une fuite au niveau des jonctions étanches entre les cellules (Anderson et *al*, 1996) et/ou une diminution des contractions des canalicules biliaires résultant en une diminution du mouvement de la bile (Boyer et *al*, 2001). Une forme sévère de cholestase familiale, la North American Indian childhood cirrhosis, est associée à une grande augmentation de la présence des microfilaments près du domaine canaliculaire (Weber et *al*, 1981).

#### **1.6.2.5 Changement du volume cellulaire**

La sécrétion biliaire est contrôlée, entre autres, par le volume cellulaire de l'hépatocyte. Un changement dans le volume cellulaire a la capacité de stimuler la mobilisation à la membrane canaliculaire ou l'introgession vers les vésicules péricanaliculaires des transporteurs canaliculaires. Lors de la cholestase, l'accumulation hépatocellulaire de divers composés peut altérer l'homéostasie du volume cellulaire. Cette accumulation ou hyperosmolarité provoque généralement une diminution du volume cellulaire, associée à une diminution de la sécrétion biliaire de l'hépatocyte (Schmitt et *al*, 2001) causée par l'endocytose des transporteurs canaliculaires dans les vésicules péricanaliculaires (Kubitz et *al*, 1997).

### 1.6.2.6 Changement de l'expression des transporteurs hépatobiliaires: la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle

Lors de la cholestase, la concentration hépatique des SB augmente et leur profil change et devient plus hydrophobe et plus toxique permettant l'activation de FXR (voir la section 1.5.1). Il a été suggéré que FXR, PXR et CAR protègent partiellement contre les SB toxiques pendant la cholestase (Guo et *al*, 2003). Cette protection s'effectue par la régulation transcriptionnelle qui permet de diminuer les transporteurs impliqués dans la captation des SB et des AO<sup>-</sup> et d'augmenter les transporteurs permettant l'efflux des composés biliaires dans le sang ou dans la bile.

Dans des conditions cholestatiques, l'expression de *Oatp2* et *Oatp4* est maintenue de façon à permettre l'efflux de SB de l'hépatocyte vers le sang afin de diminuer l'hépatotoxicité (Li et *al*, 2000). Il y a aussi une diminution de la captation des SB par une diminution des transporteurs *Ntcp*, *Oatp1* et *r-Lst1*. Le transporteur NTCP/*Ntcp* est diminué dans tous les modèles expérimentaux et chez l'humain ayant la cholestase (Lee et *al*, 2000). *Ntcp* est rapidement désactivé au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel dans plusieurs modèles de cholestase tels que l'éthinyl estradiol et les endotoxines (Koopman et *al*, 1998), mais aussi chez une souris dont la diète contient du CA (Fickert et *al*, 2001). En fait, le transporteur *Ntcp* quitte rapidement la membrane suivant l'inhibition de la transcription de son gène (Gartung et *al*, 1996). Chez le rat, l'administration de LPS ou d'éthinyl estradiol comme modèle de cholestase cause la régulation négative d'*Oatp-1* (Lee et Boyer, 2000b).

Au début de la cholestase, l'expression d'*ABCB11/Abcb11* est diminuée et elle est par la suite partiellement retrouvée lors d'une cholestase de longue durée (Lee et *al*, 2000). Chez l'humain et la souris, le promoteur d'*ABCB11/Abcb11* contient un élément de réponse à FXR suggérant que lors de la cholestase, l'augmentation des SB puisse permettre aux transporteurs *ABCB11/Abcb11* d'être conservés (Ananthanarayanan et *al*, 2001 et Kast et *al*, 2002). L'expression d'*Abcc2* est diminuée de façon très importante chez de nombreux modèles animaux de cholestase

induite tel que l'éthinyl estradiol (Vos et *al*, 1998 et Lee et *al*, 2000) et le LPS (Lee et *al*, 2000 et Kubitz et *al*, 1999). À l'inverse, le gène *Abcc3* est activé, permettant l'efflux des sulfates de lithocholate, des SB conjugués, de la bilirubine conjuguée et des glucuronides monovalents vers le sang (Donner et *al*, 2001). Les SB conjugués aux sulfates sont synthétisés dans des conditions cholestatiques et ils sont des substrats de grandes affinités pour *Abcc3* (Hirohashi et *al*, 2000). *Mrp1*, un transporteur des glutathions S-conjugués, est exprimé dans des conditions de cholestase induite par des endotoxines (Vos et *al*, 1998).

Des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle des transporteurs ont aussi été observés. L'endocytose des transporteurs canaliculaires ou leur rétention dans les vésicules péricanaliculaires semble être un mécanisme cholestatique majeur, qui est observé en parallèle au développement de plusieurs conditions cholestatiques expérimentalement induites. Le déséquilibre entre l'exocytose et l'endocytose des transporteurs canaliculaires peut mener à une diminution des transporteurs canaliculaires à la membrane et à une inhibition de la formation de la bile (Stieger et *al*, 1996). Plusieurs études menées dans différents modèles de cholestase chez les rongeurs ont montré qu'une réduction du niveau d'expression des transporteurs canaliculaires sur la membrane s'associe au développement de la cholestase (Schmitt et *al*, 2000, Mottino et *al*, 2002, Crocenzi et *al*, 2003a, Trauner et *al*, 1998b, Kubitz et *al*, 1999). Ces modèles cholestatiques incluent l'E<sub>2</sub>17G, la phalloïdine, le TLCA, les endotoxines et le stress oxydant.

La cholestase induite par l'E<sub>2</sub>17G est un modèle expérimental des mieux caractérisés et très fréquemment utilisé. Une étude a démontré que l'administration d'E<sub>2</sub>17G, chez des rats SD, induit la cholestase par une diminution du débit biliaire et de l'activité de transport d'*Abcc2* causé par son introgression (Mottino et *al*, 2002). L'introgression d'*Abcc2* correspond à la diminution de l'activité du transporteur. Comme pour le transporteur *Abcc2*, le même groupe de recherche a effectué une étude semblable sur *Abcb11*. Cette recherche suggère que dans le modèle de cholestase induite par l'E<sub>2</sub>17G, l'introgression d'*Abcb11* soit impliquée dans la diminution du débit biliaire

et de la sécrétion biliaire des SB (Crocenzi et *al*, 2003a). Il a été proposé que le mécanisme initiant la réponse cholestatique de l'E<sub>2</sub>17G puisse précisément débiter par l'intériorisation des transporteurs Abcc2 et Abcb11, suivie par l'accumulation des substrats d'Abcc2 et d'Abcb11, qui, rappelons-le, transportent les deux agents principaux (les glutathions et les SB) responsables de la formation de la bile (Mottino et *al*, 2003). Une autre étude a aussi noté une introgression des transporteurs d'Abcc2 suivant l'administration de l'E<sub>2</sub>17G (Mottino et *al*, 2005). Dans ces études (Mottino et *al*, 2002, Crocenzi et *al*, 2003a et Mottino et *al*, 2005), des doses de 15 µmol/kg (en intraveineux) ont été administrées aux rats SD et TR<sup>-</sup> (TR<sup>-</sup> dans l'étude sur Abcb11 seulement) et la localisation des transporteurs Abcc2 et Abcb11 a été effectuée par transfert Western (sur la fraction des vésicules péricanaliculaires) et par analyse confocale. La cholestase induite par l'E<sub>2</sub>17G est réversible et peut être prévenue en partie par le DBcAMP. Le DBcAMP protège de la cholestase en stimulant le retour des transporteurs à la membrane canaliculaire (Roelofsen et *al*, 1998, Crocenzi et *al*, 2003a).

Dans le modèle de la cholestase induite par la phalloïdine chez le rat, le débit biliaire diminue 15 minutes suivant l'administration de phalloïdine (0.5mg/kg) et la diminution d'Abcc2 et de d'Abcb11 à la membrane canaliculaire est causée par leur introgression dans les vésicules péricanaliculaires (Rost et *al*, 1999).

Le TLCA est un SB capable d'induire la cholestase. Une étude effectuée sur le foie de rat isolé et perfusé a montré, par les méthodes de transfert Western et de microscopie immuno-électronique, que dans ce modèle cholestatique, Abcc2 subit une introgression dans les vésicules péricanaliculaires (Beuers et *al*, 2001). De plus, une autre étude effectuée chez les rats Wistar *in vivo* et avec des couplets d'hépatocytes isolés de rat, utilisant le TLCA comme agent cholestatique, a montré que la diminution de la sécrétion biliaire des SB peut être causée par l'introgression d'Abcb11 dans les vésicules péricanaliculaires (Crocenzi et *al*, 2003b).

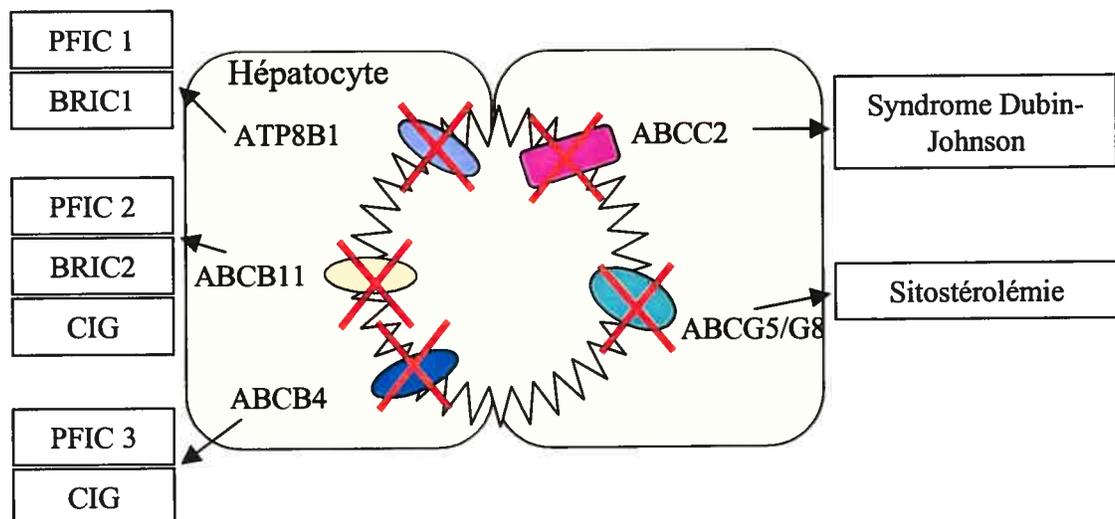
La cholestase induite par les endotoxines est un autre modèle dans lequel l'introgession d'Abcc2 et d'Abcb11 est observable. La localisation de ces transporteurs canaliculaires a été observée dans une étude qui a utilisé la méthode de microscopie confocale par balayage au laser, suggérant une introgession d'Abcc2 et d'Abcb11 dans un foie entier et dans des hépatocytes isolées de rats suivant l'administration d'endotoxines (Vos et *al*, 1998). Une autre étude utilisant le modèle de cholestase induite par le LPS, dans le foie perfusé a aussi montré une introgession d'Abcc2 des membranes canaliculaires vers les vésicules péricanaliculaires dans les trois heures suivant le traitement au LPS par la méthode de microscopie confocale. Cette étude a conclu que l'introgession d'Abcc2 dans les vésicules péricanaliculaires cause la cholestase induite par le LPS (Kubitz et *al*, 1999).

Le stress oxydant peut aussi induire la cholestase. Une étude utilisant le tert-butyl hydroperoxyde et le chloro-dinitrobenzène pour induire la cholestase dans le modèle de foie perfusé de rat a aussi démontré une endocytose d'Abcc2 de la membrane canaliculaire vers les vésicules péricanaliculaires par la méthode de microscopie confocale par balayage au laser (Schmitt et *al*, 2000). Cependant, le mécanisme menant à ce phénomène d'introgession, dans les diverses cholestases énumérées ci-dessus, n'est pas encore clairement identifié.

### **1.6.3. Importances des variantes génétiques de certains transporteurs canaliculaires dans la cholestase.**

Lors des dernières années, plusieurs bases moléculaires des cholestases ont été identifiées (voir la figure 8, adapté de Trauner et Boyer 2003). Celles-ci proviennent, pour la plupart, de mutations dans les gènes des transporteurs impliqués dans la formation de la bile. Parmi ces cholestases, se retrouvent les cholestases intrahépatiques familiales progressives de type 1, 2 et 3 (PFIC) reliées directement à des mutations dans *ATP8B1*, *ABCB11* et *ABCB4* respectivement. Les conséquences des mutations de ces protéines canaliculaires/transporteurs seront traitées en détail

dans les prochaines sections. Notons toutefois que d'autres bases moléculaires ont été identifiées. Par exemple, la «North American Indian childhood cirrhosis» (NAIC) qui touche les enfants Ojibway-Cree du nord du Québec. Telles plusieurs cholestases progressives chroniques, la NAIC débute aussi par une jaunisse à la naissance. La pathologie continue à se développer en cirrhose biliaire avec une hypertension portale. Au niveau sérique, la phosphatase alcaline et la  $\gamma$ -glutamyl-transférase sont élevées (Chagnon et al, 2002). La transplantation hépatique est souvent nécessaire pour la survie de l'enfant. Récemment, le gène *CIRHIN* a été identifié comme étant la base moléculaire de la NAIC. Ce gène code une protéine ne semblant pas avoir de localisation canaliculaire et dont les fonctions demeurent élusives en ce moment (Chagnon et al, 2002). L'identification de la cause moléculaire de cette cholestase permettra d'élucider de nouveaux mécanismes dans le développement de la cholestase et mènera certainement, telles les autres bases moléculaires identifiées, à une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant la fonction biliaire.



(Abréviations : PFIC : cholestases intrahépatiques familiales progressives ; BRIC : cholestases intrahépatiques récurrente bénigne ; CIG : cholestase intrahépatique de la grossesse)

Figure 8 : Principales maladies associées aux mutations des transporteurs canaliculaires.

### 1.6.3.1 ABCB11

#### 1.6.3.1.1 Conséquence de l'absence d'ABCB11 chez l'humain

La PFIC de type 2 provient de mutations dans le gène *ABCB11*, le transporteur canaliculaire des SB. Les mutations impliquées sont diverses (voir le tableau 7), mais semblent causer une absence du transporteur ABCB11 à la membrane canaliculaire. La sécrétion des SB dans la bile de ces patients représente moins de 1% de la quantité normalement excrétée (Jansen et *al*, 1999). Pendant les premiers mois, les patients souffrent d'hépatite néonatale. Le principal symptôme est celui du prurit qui débute vers la fin de la première année (Thompson et Strautnieks, 2001). La maladie se complique en cholangiopathie, cirrhose et finalement, en défaillance hépatique (Wang et *al*, 2003). Tout comme la PFIC de type 1, c'est une cholestase progressive et persistante qui nécessite une transplantation du foie avant l'âge de 10 ans (Jansen, 2001).

Tableau VII : Mutations d'*ABCB11* associées à un phénotype de PFIC2.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d' <i>ABCB11</i>	Âge du début de la maladie	Progression de la maladie	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Homozygote</b>					
na	G238V_c	Aucune	1 mois	Tx à 3 ans	Dégradé rapidement
890A>G	E297G_c	nd	nd	na	Ciblage et transport déficient
1381A>G	K461E_c	nd	nd	na	nd
1445A>G	D482G_c	nd	nd	na	transport déficient
1723C>T	R575X	Aucune	1 mois	na	nd
2944G>A	G982R_c	nd	nd	na	Ciblage et transport déficient
na	G1004D_c	nd	10 mois	na	nd
na	R1090X	Aucune	1 mois	Tx à 4 ans	nd
3457C>T	R1153C_c	nd	nd	na	Ciblage et transport déficient
3767_3768insC	T1256fsX1296	nd	nd	na	nd
3803G>A	R1268Q_c	nd	nd	na	Ciblage et transport déficient
<b>Hétérozygote</b>					
na	S114R(?)	Aucune	4 mois	Tx à 9 ans	nd
695del (1bp,ng)	fs	Aucune	5 an	Tx à 14 ans	nd
908delG	R303fsX321	nd	na	na	nd
na	C336S_c	Aucune	1 mois	Tx à 9 ans	Ciblage et transport normal
1723C>T	R575X	Aucune	1 mois	na	
2944G>A	G982R_c	Aucune	1 mois	Tx à 10 ans	Ciblage et transport déficient
3169C>T	R1057X	nd	na	na	nd

Tableau VII (suite): Mutations dans ABCB11 associées à un phénotype sévère de PFIC2.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d'ABCB11	Âge du début de la maladie	Progression de la maladie	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Hétérozygote composite</b>					
[na]+[1145del; 1bp,na]	V284L+ fs	nd	1 mois	na	nd
[na]+[890A>G]	R1057X+E297G_c	Aucune	1 mois	Tx planifiée	nd
[1116G>A]+ [1587G>A]	V330X+R487H	nd	2 mois	na	nd
[1723C>T]+ [1907A>G]	R575X+E636G	nd	5 mois	Tx à 7 ans	nd
[na]+[1145del; 1bp]	V284L_c+ fs	nd	1 mois	na	nd
[na]+[3213del; 1bp na]	S593R_c+ fs	Aucune	1 an	na	nd

Abréviations : del: délétion; ins: insertion; X: codon stop; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; Tx: Transplantation hépatique; na: non disponible; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus et al, 2005)

### 1.6.3.1.2 Conséquence de l'absence d'Abcb11 chez l'animal

La souris *Abcb11*<sup>-/-</sup> possède un phénotype de cholestase intrahépatique beaucoup moins sévère que celui retrouvé chez l'humain ayant une mutation dans le gène *ABCB11* (patient ayant la PFIC2). Le phénotype *Abcb11*<sup>-/-</sup> est une cholestase intrahépatique non-progressive, mais persistante (Wang et al, 2001). Ce phénotype moins sévère que chez l'humain est probablement alloué à la capacité de détoxification qu'a l'hépatocyte de la souris via l'hydroxylation des SB et au maintien de leur sécrétion via un système de transport alternatif. Comme il a déjà été mentionné dans la section 1.4.1.3.1, une sécrétion importante de SB hydrophiliques est possible en l'absence d'ABCB11 dans ce modèle. En fait, des SB tétra-hydroxylés sont sécrétés en grande quantité chez la souris knock-out, mais pas chez la souris témoin (Wang et al, 2001). L'hydroxylation des SB ainsi que la présence d'un autre transporteur canaliculaire pourraient tous deux contribuer à expliquer une meilleure résistance à la cholestase sévère chez la souris (Wang et al, 2001).

Comme le profil des SB de la souris est beaucoup plus hydrophilique que celui de l'humain, une étude a modifié le pool des SB de la souris afin qu'il ressemble à celui de l'humain. Ainsi, dans cette étude, une diète contenant du CA a été donnée à des souris *Abcb11*<sup>-/-</sup> afin d'observer si le phénotype était aggravé. Tel que prévu, la diète a induite une cholestase sévère ressemblant à celle de l'humain (Wang *et al*, 2003). Toutefois, une sécrétion des SB plus importante que celle obtenue chez l'humain a encore été observée. La présence d'un système de transport alternatif pour les AB hydrophiliques, d'une capacité de détoxification plus importante, mais aussi une durée d'expérimentation trop courte, pourraient contribuer à expliquer ces observations.

### **1.6.3.1.3 Conséquence d'une diminution d'ABCB11 chez l'humain**

#### **1.6.3.1.3.1 La cholestase intrahépatique de la grossesse**

La cause de la cholestase intrahépatique de la grossesse (CIG) est très mal définie, mais les œstrogènes jouent probablement un rôle puisqu'ils peuvent induire la cholestase tant chez l'humain que chez les modèles animaux (Bacq *et al*, 1997). Cependant, la CIG peut être aussi associée avec la progestérone (Meng *et al*, 1997).

Récemment, une association entre la CIG et des polymorphismes dans le gène *ABCB11* a été trouvée (Eloranta *et al*, 2003). En fait, la CIG semble fréquente chez les mères d'enfants souffrant de PFIC type 2, qui n'ont hors-grossesse aucun symptôme clinique. Cette observation a mené à la suggestion que l'hétérozygotie de certaines mutations d'*ABCB11* n'affecte pas négativement la fonction biliaire en condition physiologique usuelle, mais puisse diminuer la capacité de réponse en condition de surcharge (hypersensibilité aux changements environnementaux). L'augmentation des taux d'oestrogènes ou de ses métabolites, qui, rappelons-le, sont hautement cholestatiques chez l'animal en doses toxicologiques, a été proposée comme l'agent environnemental responsable du développement de la cholestase dans ces conditions (Ferenci *et al*, 2002 et Oude Elferink, 2003).

#### 1.6.3.1.3.2 La cholestase intrahépatique récurrente bénigne

La cholestase intrahépatique récurrente bénigne (BRIC) de type 2 ou BRIC2 est une forme légère de cholestase récurrente qui a une durée de quelques jours à quelques mois. Suite à la disparition de la cholestase, le foie ne conserve aucun dommage. Des travaux récents ont montré que ces patients possèdent diverses mutations dans le gène *ABCB11*, qui affectent de manière moins sévère la fonction d'*ABCB11* que celles menant à la PFIC de type 2 (voir les tableaux 8 et 9). Cette condition a donc été nommée BRIC2 afin de suivre la nomenclature de PFIC2 (Van Mil et *al*, 2004). Il est important de noter que, au sein des familles étudiées, ce ne sont pas tous les individus possédant une mutation associée à BRIC2 qui développeront des épisodes cholestatiques, ce qui suggère que d'autres facteurs génétiques et/ou environnementaux soient nécessaires dans le développement phénotypique de la cholestase (Oude Elferink, 2003 et Trauner et Boyer, 2003). En fait, il a été proposé que ces mutations d'*ABCB11* induisent ici encore une diminution de la résistance à la cholestase suite à l'exposition à un agent au potentiel cholestatique.

Tableau VIII : Mutations d'*ABCB11* associées à un phénotype de BRIC2.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d' <i>ABCB11</i>	Âge du début de la maladie	Conditions associées	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Homozygote</b>					
890A>G	E297G_c	nd	2 et 14 mois	Cholélithiase	nd
1708G>A	A570T_c	nd	1 an	Cholélithiase	nd
3148C>T	R1050C_c	nd	5 et 24 ans	Cholélithiase	nd
3383G>A	R1128H_c	nd	5 et 18 ans	Cholélithiase	nd
<b>Hétérozygote</b>					
557A>G	E186G_c	nd	4 ans	Cholélithiase	nd
<b>Hétérozygote composite</b>					
[890A>G]+[1294G>C]	E297G_c+R432T_c	nd	16 ans	na	nd
[2767A>G]+ [2776G>C]	T923P_c+A926P_c	nd	14 ans	Cholélithiase	nd
[3148C>T]+[IVS19 +1G<A]	R1050C_c+ site d'épissage	nd	2 et 3 ans	Cholélithiase	nd

Abréviations: del: délétion; ins: insertion; fs: cadre de lecture; IVS: inversion; dup: duplication; X: codon stop; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; na: non disponible; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus et *al*, 2005)

Tableau IX: Mutations d'*ABCB11* associées à la cholestase acquise.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d' <i>ABCB11</i>	Phénotype de la maladie	Conditions associées	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Hétérozygote</b>					
580T>C	S194P_c	nd	PSC	–	nd
779G>A	G260D_c	nd	PBC	–	nd
1772A>G	N519S_c	nd	CIG	–	nd
3683C>T	A1228V_c	nd	PBC	–	nd

Abréviations: del: délétion; ins: insertion; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; CGI: cholestase intrahépatique de la grossesse; PBC: cirrhose biliaire primaire; PSC: cholangite sclérosante primaire; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus et *al*, 2005)

### **1.6.3.1.3 Conséquence d'une diminution d'Abcb11 chez l'animal**

Au meilleur de nos connaissances, aucune étude sur les conséquences d'une diminution du niveau d'expression d'Abcb11 chez l'animal n'a été publiée, tant au niveau des effets en conditions basales que de la réponse aux agents environnementaux.

### **1.6.3.2 ABCB4**

#### **1.6.3.2.1 Conséquence de l'absence d'ABCB4 chez l'humain**

La PFIC de type 3 est causée par des mutations dans le transporteur canaliculaire des PL, ABCB4, menant à une quasi-absence de PL dans la bile (voir le tableau 10). Il a été proposé que les SB, qui ne sont alors pas associés aux PL dans les micelles ou vésicules, soient alors très toxiques et dommageables pour les hépatocytes et les cholangiocytes menant au développement de la pathologie (Jansen et *al*, 2001). La maladie est caractérisée par une inflammation portale, une prolifération des canalicules biliaires et une fibrose qui peut progresser vers la cirrhose (Oude Elferink, 2003). La maladie peut débuter dès l'âge de 1 mois jusqu'à l'âge de 20 ans. Les symptômes sont l'hypertension portale, l'hépatosplénomégalie, la jaunisse, le prurit et, ultérieurement, une défaillance hépatique menant à la nécessité d'une transplantation hépatique (van Mil et *al*, 2005).

Tableau X : Mutations d'*ABCB4* associées à un phénotype de PFIC3.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d' <i>ABCB4</i>	Âge du début de la maladie	Progression de la maladie	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Homozygote</b>					
111A>G	S27Xfs	Aucune	14 mois et 2,5 ans	Tx à 5 ans	nd
426_432del	Y132fsX162	Aucune	3 mois	Tx à 4 ans	nd
1069G>T	S346I_c	très faible	3 mois	Tx à 10 ans	nd
1216A>G	E395G_c	nd	5 ans	Tx à 13 ans	nd
1653A>T	I541F_c	Aucune	1 ans	Tx à 5 ans	nd
1699T>G	L556R_c	nd	5 mois	Tx à 9 ans	nd
1744delT	V571fsX587	Aucune	1 ans	Tx à 6 ans	nd
1938C>T	Q636X	Aucune	1 et 2 mois	Tx à 3 et 4 ans	nd
1986A>G	R652G	nd	6 mois	na	nd
2901C>T	R957X	Aucune	8 mois	Tx à 9 ans	nd
<b>Hétérozygote</b>					
444T>C	W138R_c	Nd	1,5 ans	Tx à 10 ans	nd
1302A>G	T424A_c	très faible	1 an	Tx à 13 ans	nd
1307G>A	V425M_c	Normale	3 mois	Tx à 10 ans	nd
1986A>G	R652G	Nd	1 mois à 15 ans	na	nd
1723A>G	D564G_c	Nd	8 mois	na	nd
2132T>C	F711S_c	Nd	13,5 et 20,5 ans	na	nd
<b>Hétérozygote composite</b>					
[2975_2984del]+ [2979G>A]	V981fsX985+G983S	Nd	8 mois	na	nd

Abréviations : del: délétion; ins: insertion; fs: cadre de lecture; X: codon stop; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; Tx: Transplantation hépatique; na: non disponible; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus *et al*, 2005)

### 1.6.3.2.2 Conséquence de l'absence d'*Abcb4* chez l'animal

Les souris ayant une absence d'*Abcb4* à la membrane canaliculaire secrètent aussi une quantité infime de PL dans la bile (Smit *et al*, 1993). Cette quasi-absence de PL biliaire empêche la formation de micelles, laissant ainsi les AB «libres». Les souris *Abcb4*<sup>-/-</sup> développent des dommages semblables aux humains, de type cholangite non-suppurée inflammatoire, mais de façon beaucoup moins sévère (Mauad *et al*, 1994). La sévérité moindre chez la souris est probablement explicable par le fait qu'elle possède un pool de SB beaucoup plus hydrophile que celui de l'humain avec

son MCA. Encore une fois, en modifiant le pool des SB de la souris pour qu'il s'apparente à celui de l'humain à l'aide d'une diète supplémentée au cholate en dose ne produisant aucune toxicité chez la souris sauvage, la souris *Abcb4*<sup>-/-</sup> développe alors une pathologie sévère qui mène rapidement au développement de fibrose et de complications hépatiques importantes (Van Nieuwkerk et al, 1996).

#### **1.6.3.2.3 Conséquence d'une diminution d'ABCB4 chez l'humain**

Il a été observé que des mères d'enfants ayant la PFIC3 ont développé la CIG (Jacquemin et al, 1999, Pauli-Magnus et al, 2004). Ces femmes sont considérées obligatoirement hétérozygotes puisque leurs enfants sont atteints d'une maladie homozygote récessive, bien qu'un certain taux de néomutations ait été démontré. Il a été observé qu'une mutation non-sens hétérozygote chez une patiente n'ayant aucune histoire familiale connue de PFIC, dans le gène *ABCB4* est associée avec la CIG (Dixon et al, 2000). Bien que peu étudié, il semble donc encore une fois que les individus porteurs de mutations limitant l'expression ou l'activité d'ABCB4 soient plus sensibles au «stress» exogène hépatobiliaire induit par plusieurs agents et, donc, au développement de la cholestase (voir le tableau 11).

Tableau XI : Mutations d'*ABCB4* associées à la cholestase acquise.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d' <i>ABCB4</i>	Âge du début de la maladie	Progression de la maladie	Phéno- type <i>in vitro</i>
<b>Homozygote</b>					
959C>T	S320F_c	nd	CIG, choléli- thiase	na	nd
1772T>A	L591Q_c	nd	Choléli- thiase	na	nd
3481C>T	P1161S_c	nd	Choléli- thiase	na	nd
<b>Hétérozygote</b>					
217C>G	L73V_c	nd	PBC	na	nd
495T>A	F165I_c	nd	Choléli- thiase	na	nd
523A>G	T175A_c	nd	CIG, Choléli- thiase	na	nd
728A>C	D243A_c	nd	PBC	na	nd
902T>C	M301T_c	nd	Choléli- thiase	na	nd
1007_1015del	L341X	nd	Choléli- thiase	na	nd
1007_1015ins	D355X	nd	Choléli- thiase	na	nd
1304A>C	K435T_c	nd	PBC	na	nd
1327insA	D447X	nd	Choléli- thiase, CIG	na	nd
1584G>C	E528D	nd	Choléli- thiase	na	nd
Na	G535D_c	réduite	CIG, Choléli- thiase	na	nd
1633C>T	R545C_c	nd	PSC	na	nd
Na	A546D_c	nd	CIG	na	Ciblage anormal, transport normal
1712delT	V571fsX587	nd	CIG	na	nd
1954A>G	R652G	nd	CIG	na	nd
1973G>A	Y658X	nd	Choléli- thiase	na	nd

Abréviations : del: délétion; ins: insertion; fs: cadre de lecture; X: codon stop; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; Tx: Transplantation hépatique; na: non disponible; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus *et al*, 2005)

Tableau XI (suite): Mutations dans *ABCB4* associées à la cholestase acquise.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d'ABCB4	Âge du début de la maladie	Progression de la maladie	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Hétérozygote</b>					
2285G>A	G762E_c	nd	CIG	na	nd
2363G>T	R788E_c	nd	Choléli-thiase	na	nd
2270_2273insT	K793X	nd	Choléli-thiase	na	nd
2901C>T	R957X	nd	CIG	na	nd
3481C>T	P1161S_c	nd	Choléli-thiase	na	nd
3751A>C	G1251Q_c	nd	PBC	na	nd
IVS15+6T>C	site d'épissage	nd	PBC	na	nd
IVS21+1G>A	site d'épissage	nd	CIG	na	nd
IVS25+5G>C	site d'épissage	nd	CIG	na	nd
IVS25-3C>G	site d'épissage	nd	CIG	na	nd
IVS26+53A>G	site d'épissage	nd	CIG	cholestase récurrente	nd

Abréviations : del: délétion; ins: insertion; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; CGI: cholestase intrahépatique de la grossesse; PBC: cirrhose biliaire primaire; PSC: cholangite sclérosante primaire; na: non disponible; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus et *al*, 2005)

#### 1.6.3.2.4 Conséquence d'une diminution d'Abcb4 chez l'animal

Les souris hétérozygotes pour *Abcb4* expriment la moitié des transporteurs à la membrane canaliculaire. Ainsi, la souris excrète 50% de la quantité totale des PL de la souris sauvage et elle ne développe pas de cholestase ni de problèmes hépatiques (Smith et *al*, 1998). Toutefois, malgré l'importance de tels travaux pour favoriser notre compréhension des effets précédemment décrits dans les paragraphes antérieurs, aucune étude n'a, au meilleur de notre connaissance, exploré la réponse de ces animaux au «stress» hépatobiliaire.

### 1.6.3.3 ATP8B1

#### 1.6.3.3.1 Conséquence de l'absence d'ATP8B1 chez l'humain

La PFIC de type 1, aussi appelée maladie de Byler, est causée par diverses mutations (voir le tableau 12) dans le gène *ATP8B1* (Bull et *al*, 1998). Ce gène code pour une aminophospholipide transférase qui permet de maintenir une asymétrie de la distribution des PL dans les membranes. C'est une maladie progressive et fatale qui débute à la naissance. Les patients souffrant de cette maladie ont plusieurs symptômes tel que la diarrhée, la stéatorée, la jaunisse, l'hépatosplénomégalie et développent une défaillance hépatique (van Mil et *al*, 2005). Les patients peuvent aussi faire des pancréatites.

Tableau XII : Mutations d'*ATP1B8* associées à un phénotype de PFIC1.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d'ATP8B1	Âge du début de la maladie	Progression de la maladie	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Homozygote</b>					
IVS+1del3	site d'épissage	nd	na	na	nd
IVS8+1G>T	site d'épissage	nd	na	na	nd
IVS21+5G>A	site d'épissage	nd	na	na	nd
IVS17-1G>A	IVS17>IVS17-1G>A IVS17(-1)	nd	na	na	nd
IVS18+2T>C	IVS18(+2)	nd	2.5 mois	Tx à 6 ans	nd
1660G>A	D554N_c	nd	na	na	nd
279G>A	A93 site d'épissage	nd	na	na	nd
3040C>T	R1014X	nd	na	na	nd
380T>C	L127P_c	nd	na	Tx à 14 ans	nd
841T>A	na	nd	na	Tx à 5 ans	nd
863T>C	L288S_c	nd	na	na	nd
Na	R296C	nd	1 mois	na	nd
923G>T	G308V_c	nd	na	na	nd
1235G>C	R412P	nd	na	Tx à 18 ans	nd
1367C>T	T456M_c	nd	na	na	nd
1587_1589del	F529del	nd	na	Tx à 4 ans	nd
1604A>T	H535L_c	nd	na	na	nd
1993G>T	E665X	nd	na	na	nd
Na	I694N_c	nd	1 mois	na	nd
2124_2125ins	K709fs	nd	na	Tx à 6 ans	nd
2558T>C	F853S_c	nd	na	na	nd
2543_2556dup	F853fs	nd	na	na	nd
2596_2599dup	R867fs	nd	na	na	nd
2674G>A	G892R_c	nd	na	na	nd
2788C>T	R930X	nd	na	na	nd
3118G>A	G1040R_c	nd	na	na	nd
3140delT	L1047fs	nd	na	na	nd
3622_3628del	A1208	nd	na	na	nd

Abréviations : del: délétion; ins: insertion; fs: cadre de lecture; X: codon stop; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; Tx: Transplantation hépatique; na: non disponible; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus et al, 2005)

Tableau XII (suite): Mutations dans *ATP1B8* associées à un phénotype de PFIC1.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d'ATP8B1	Âge du début de la maladie	Progression de la maladie	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Hétérozygote</b>					
185_282del	na	nd	1 mois	na	nd
1286A>C	E429A	nd	na	na	nd
1498T>C	Y500H	nd	na	na	nd
2197G>A	G733R	nd	na	na	nd
2097+2T>C	site d'épissage	nd	na	na	nd
<b>Hétérozygote composite</b>					
[IVS18+2T>C]+[IVS21+5G>A]	site d'épissage	nd	na	na	nd
[IVS3-2A>G]+[1587_1589del]	site d'épissage +F529	nd	na	na	nd
[556_628del]+[na]	na +Q1131X	nd	1 mois	Tx à 6 ans	nd
[614_615ins]+[2854C>T]	N205+R952X	nd	na	na	nd
[1208C>A]+[2373_2374ins]	S403Y+P792	nd	na	na	nd
[1336G>A]+[2271T>A]	G446R+Y757X	nd	2 mois	Tx à 4 ans	nd
[2873delA]+[3069_3070del]	N958+Q1023	nd	na	na	nd
[1982T>C]+[1804C>T]	I661T+R602X	nd	na	na	nd
[1982T>C]+[2854C>T]	I661T+R952X	nd	na	na	nd
[2016delG]+[2788C>T]	K672+R930X	nd	na	na	nd
[2063A>G]+[2674G>A]	D688G+G892R	nd	na	na	nd

Abréviations : del: délétion; ins: insertion; fs: cadre de lecture; IVS: inversion; dup: duplication; X: codon stop; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; Tx: Transplantation hépatique; na: non disponible; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus *et al*, 2005)

### 1.6.3.3.2 Conséquence de l'absence d'Atp8b1 chez l'animal

Une souris mutante pour le polymorphisme G308V/G308V dans le gène *Atp8b1*, retrouvé chez les patients Amish souffrant de PFIC de type 1, a été produite (Pawlikowska et al, 2004). Contrairement aux humains, la souris ne développe pas de phénotype cholestatique, démontrant une sécrétion biliaire normale et une absence de dommage hépatique. Cependant, ces souris ont une diminution de leur poids au sevrage et une concentration sérique élevée en SB. Ces souris ont été soumises à une diète contenant 0,5% de CA. Suite à la diète, la souris mutante a développé une accumulation de SB sérique, une jaunisse, une hépatomégalie, un dommage hépatique et une augmentation du pool des SB malgré une sécrétion biliaire normale, alors que la souris sauvage n'a subi aucun changement. Globalement, le phénotype demeure toutefois beaucoup moins sévère que chez l'humain même suite à une diète contenant du CA. On ne sait pas si la dose et durée étaient insuffisantes. Les auteurs de cette étude ont aussi rapporté une hydroxylation importante des SB, ce qui pourrait contribuer à une diminution de la toxicité de ces SB.

### 1.6.3.3.3 Conséquence d'une diminution d'ATP8B1 chez l'humain

#### 1.6.3.3.3.1 La cholestase intrahépatique de la grossesse

Tout comme pour la CIG provenant de mutations dans le gène *ABCB4*, des mères d'enfants atteints de la PFIC1 ont développé la cholestase lors de leur grossesse (Jacquemin et al, 1999, Pauli-Magnus et al, 2004). Encore dans ce cas, ces mères sont fort probablement hétérozygotes pour les mutations d'*ABCB4* pouvant mener à la PFIC de type 1 puisque leurs enfants sont atteints d'une maladie récessive. Les mécanismes menant au développement de la cholestase sont encore incompris. Toutefois, puisqu'il est proposé que la protéine perd une partie de son activité, il est probable que lors d'une surcharge hépatique en hormone, le foie devient incapable de se détoxifier efficacement.

#### 1.6.3.3.2 La cholestase intrahépatique récurrente bénigne

Tout comme la BRIC2, la BRIC1 est une cholestase récurrente qui a une durée de quelques jours à quelques mois et qui ne laisse aucune séquelle au foie après sa disparition. Elle est toutefois associée à des mutations dans le gène d'*ATP8B1* (voir le tableau 13). Toutefois, contrairement aux mutations retrouvées dans la PFIC type 1, aucune mutation non-sens n'est retrouvée dans *ATP8B1* permettant ainsi fort probablement la conservation d'une certaine activité de la protéine. Comme dans le cas des mutations dans *ABCB11*, les mutations dans *ATP8B1* ne mèneront pas nécessairement à la BRIC. En effet, le développement phénotypique de la cholestase semble nécessiter une interaction avec d'autres gènes ou des stress environnementaux (Elferink et *al*, 2003, Trauner et Boyer, 2002).

Tableau XIII : Mutations d'*ATB1B8* associées à un phénotype de BRIC1.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d'ATP8B1	Âge du début de la maladie	Progression de la maladie	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Homozygote</b>					
1982T>C	I661T	nd	5 mois à 47 ans	na	nd
IVS23-3C>A	site d'épissage	nd	na	na	nd
3722delG	G1241fs	nd	na	na	nd
2384del	G795_R797del	nd	na	na	nd
<b>Hétérozygote</b>					
1286A>C	E429A	nd	na	na	nd
<b>Hétérozygote composite</b>					
[208G>A]+ [1799G>A]	D70N+R600Q_c	nd	na	na	nd
[923G>A] +[1982T>C]	G308D_c+I661T	nd	na	na	nd
[1030A>T]+ [1358C>A]	I344F+S453Y_c	nd	na	na	nd
[1361A>G]+ [2081T>C]	D454G_c+I694T_c	nd	na	na	nd
[1798C>T] +[1982T>C]	R600W+I661T	nd	na	na	nd
[1799G>A] +[1982T>C]	R600Q+I661T	nd	na	na	nd
[1882C>T]+ [2854C>T]	R628W_c+R952X	nd	na	na	nd
[2674G>A] +[1982T>C]	G892R+I661T	nd	na	na	nd
[3490C>T]+ [1982T>C]	R1164X+I661T	nd	na	na	nd
[IVS26+2T>A]+ [1982T>C]	site d'épissage +I661T	nd	na	na	nd
[279G>A]+ [1982T>C]	A93 site d'épissage +I661T	nd	na	na	nd

Abréviations : del: délétion; ins: insertion; X: codon stop; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; na: non disponible; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus *et al*, 2005)

#### **1.6.3.3.4 Conséquence d'une diminution d'Atp8b1 chez l'animal**

D'après nos recherches dans la littérature, aucune étude sur les conséquences d'une diminution de l'expression d'Atp8b1 chez l'animal n'a été publiée, tant au niveau des effets dans des conditions physiologiques que de la réponse aux agents cholestatiques. Toutefois, on peut supposer l'absence de gravité en conditions basales si l'on compare avec l'absence complète de la protéine qui n'a pratiquement aucun effet sur la souris (Pawlikowska et al, 2004).

#### **1.6.3.4 ABCC2**

##### **1.6.3.4.1 Conséquence de l'absence d'ABCC2 chez l'humain**

L'absence d'ABCC2 à la membrane canaliculaire ne cause pas, à l'opposé des autres transporteurs canaliculaires précédemment discutés, de cholestase intrahépatique, mais résulte en un syndrome de Dubin-Johnson (SDJ), un désordre autosomique récessif caractérisé par une hyperbilirubinémie conjuguée. Les mutations menant à ce syndrome sont très variées (voir le tableau 14) et peuvent aussi être causées à différents niveaux tel que la dégradation de l'ARNm mutant, l'interaction avec les chaperones et une instabilité de la protéine (Keitel et al, 2003). D'autres causes ont aussi été identifiées tel qu'une mutation non-sens résultant en un codon stop qui met fin à la traduction de la protéine (Kartenbeck et al, 1996) ou à une mutation qui affecte la maturation de la protéine ou à l'hydrolyse de l'ATP chez deux patients (Hashimoto et al, 2002). Une étude faite sur une protéine ABCC2 mutante pour les délétions de Arg1392 et Met1393 a montré une incapacité à la maturation et au transport de la protéine du RER vers l'appareil du Golgi (Keitel et al, 2000). Une autre étude, qui a analysé une mutation fréquente (MRP2I1173F), a montré que la protéine ABCC2 n'arrivait pas à maturation puisqu'elle est dégradée par les protéosomes (Keitel et al, 2003).

Tableau XIV : Mutations d'*ABCC2* associées au phénotype du syndrome de Dubin-Johnson.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d' <i>ABCC2</i>	Âge du début de la maladie	Conditions associées	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Homozygote</b>					
3517A>T	I1173F_c	nd	na	–	Ciblage et transport déficient
33449G>A	R1150H_c	nd	na	–	Ciblage normal transport déficient
2302C>T	R768W_c	nd	51 et 81 ans	–	Dégradé rapidement
2272_2439del	G758_K813del	nd	28 ans	–	nd
3196C>T	R1066X	Aucune	20 et 32 ans	–	nd
2002_2068del	K635X	nd	Enfance	–	nd
[1669_1815del;IV S13+2T>A]	V557_Q605del; site d'épissage	nd	na	–	nd
[2272_2439del;IV S18+2T>C]	G758_K813del;site d'épissage	nd	26, 28 ans	–	nd
4175_4180del	R1392_M1393del	Aucune	15 ans	–	transport déficient
1901_1968del	D634_D656del	nd	23 ans	–	nd

Abréviations : del: délétion; ins: insertion; X: codon stop; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; Tx: Transplantation hépatique; na: non disponible; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus et al, 2005)

Tableau XIV(suite): Mutations dans ABCC2 associées au phénotype du syndrome de Dubin-Johnson.

Mutations dans l'ADNc	Changement en acide aminé	Coloration d'ABCC2	Âge du début de la maladie	Conditions associées	Phénotype <i>in vitro</i>
<b>Hétérozygote</b>					
2302C>T	R768W_c	nd	31 ans	–	Dégradé rapidement
2272_2439del	G758_K813del	nd	28 ans	–	nd
<b>Hétérozygote composite</b>					
[IVS18+2T>C]+[4145A>G]	site d'épissage +Q1382R	nd	24 ans	–	Ciblage normal, transport déficient
[298C>T]+[3928C>T]	R105X(?)+R1310X	Aucune	Enfance	–	nd
[IVS13+2T>A]+[3928C>T]	K557_Q605del +R1310X	nd	7 ans	–	nd
[1901_1968del]+[2026G>C]	D634_D656del +G676R_c	nd	25 ans	–	nd
[2302C>T]+[2272_2439del]	R768W_c+G758_K813del	nd	4 et 7 ans	–	nd
IVS21+1G>A	site d'épissage	nd	CIG	na	nd
IVS25+5G>C	site d'épissage	nd	CIG	na	nd
IVS25-3C>G	site d'épissage	nd	CIG	na	nd
IVS26+53A>G	site d'épissage	nd	CIG	cholestase récurrente	nd

Abréviations : del: délétion; ins: insertion; fs: cadre de lecture; X: codon stop; \_c: position d'acide aminé conservée dans l'évolution; na: non disponible; nd: non déterminé. (Tableau adapté de Pauli-Magnus et al, 2005)

#### 1.6.3.4.2 Conséquence de l'absence d'Abcc2 chez l'animal

Les rats TR<sup>-</sup> («transport déficient», souche Wistar), EHBR («Eisai hyperbilirubinemic rat», souche Sprague-Dawley) et GY («Groningen Yellow», souche Wistar) n'expriment pas ou très peu Abcc2 en raison de mutations spontanées sur le gène d'Abcc2. La mutation chez le rat TR<sup>-</sup> cause une réduction importante de l'ARNm et donc de la protéine (Paulusma et al, 1996), alors que la mutation chez le rat EHBR crée un codon stop prématuré (Ito et al, 1997). Tout comme chez l'humain, ces rats ont le SDJ. Au niveau biliaire, en plus de la bilirubine conjuguée, d'autres AO<sup>-</sup>, normalement transportés par Abcc2, sont aussi touchés tels que les SB divalents, les

leucotriènes, les métaux lourds, le GSH, le GSH conjugué et le GSSG comme chez l'humain (Trauner et *al*, 2003). Pour une liste plus complète des composés sécrétés par ABCC2/Abcc2, voir le tableau 4. Il est intéressant de mentionner qu'un mécanisme compensatoire à l'absence d'Abcc2 a été établi. En effet, le transporteur Abcc3, faiblement exprimé dans des conditions normales (Hirohashi et *al*, 1998, Konig et *al*, 1999 et Donner et *al*, 2001), démontre un haut niveau d'expression en absence d'Abcc2. Ce transporteur, présent au niveau latéral, est un homologue d'Abcc2 et permet l'efflux de la bilirubine et des SB conjugués aux sulfates vers la circulation sanguine afin de diminuer l'augmentation hépatique (et l'hépatotoxicité) des composés normalements excrétés dans la bile (Donner et Keppler, 2001). Ces composés peuvent par la suite être excrétés par le rein dans l'urine (Donner et Keppler, 2001). Tout comme Abcc3, le transporteur Abcc4 est aussi un mécanisme compensatoire permettant de diminuer la concentration hépatique de certains composés hépatotoxiques. En fait, l'expression d'Abcc4 est augmentée lors de stress cholestatique (Mennone et *al*, 2006).

Tel que discuté dans les sections antérieures, une absence ou une diminution de l'expression et/ou de l'activité d'un des transporteurs canaliculaires amène ou peut mener au développement de la cholestase. Toutefois, à l'encontre de cette tendance, une absence du transporteur canaliculaire Abcc2 *empêche* le développement de la cholestase chez l'animal. En effet, pour la grande majorité des composés étudiés à ce jour, il a été expérimentalement impossible d'induire une cholestase par une insulte exogène chez les rats n'exprimant pas Abcc2 (Sano et *al*, 1993 et Huang et *al*, 2000), le débit biliaire ainsi que la sécrétion des composés biliaires non transportés par Abcc2 demeurant in affectés par les agents usuellement cholestatiques. En fait, plusieurs composés tels que divers AB et les oestrogènes ont été incapable d'induire la cholestase chez les rats n'exprimant pas Abcc2. Cette résistance à la cholestase demeure aussi même lorsque les doses d'agents cholestatiques ont été accrues afin de compenser pour un éventuel relargage accru via Abcc3. Plus précisément, une dose normalement cholestatique d'E<sub>2</sub>17G ne peut induire la cholestase chez les rats EHBR n'exprimant pas Abcc2 contrairement aux rats contrôles (Sano et *al*, 1993). De la

même façon, chez les rats TR<sup>-</sup>, ayant une absence d'Abcc2, une dose d'E<sub>2</sub>17G douze fois plus élevée que celle nécessaire pour inhiber le débit biliaire de 51% chez les rats contrôles est incapable d'induire la cholestase (Huang et al, 2000). De plus, une dose très élevée de E<sub>2</sub>17G donnée aux rats TR<sup>-</sup> nécessaire pour avoir une concentration biliaire de E<sub>2</sub>17G identique aux rats contrôles Wistar ne peut toujours pas induire la cholestase (Huang et al, 2000). Ces résultats suggèrent donc qu'Abcc2 puisse avoir un rôle primaire à jouer dans le développement de la cholestase induite par l'E<sub>2</sub>17G et plus particulièrement, que l'expression d'Abcc2 soit essentielle au développement de la cholestase acquise, du moins dans ce modèle. Une autre étude de Crocenzi et al (2003a) montre que les rats TR<sup>-</sup> ne développent pas la cholestase induite par l'E<sub>2</sub>17G et que les transporteurs Abcb11 présents au niveau de leur membrane canaliculaire ne sont pas endocytés. Cela suggère encore la nécessité de la présence d'Abcc2 dans l'initiation de la cholestase, mais aussi dans l'introgression du transporteur Abcb11.

#### 1.6.3.4.3 Conséquence d'une diminution d'ABCC2 chez l'humain

Il existe des individus hétérozygotes pour les mutations retrouvées chez les patients ayant le SDJ. Ces individus sont normaux si l'on compare le pourcentage de coproporphyrine excrété dans l'urine (31.6%) avec les sujets normaux (24.8%) ou hyperbilirubinémique (88.9%) (Wolkoff et al, 1973). Malgré que le SDJ soit une condition très rare, attribuée à une absence d'ABCC2 à la membrane canaliculaire (Hashimoto et al, 2002), il est bien connu que ce transporteur possède une grande variabilité génétique. Il est possible que certains polymorphismes dans *ABCC2* puissent rendre la protéine plus ou moins fonctionnelle par rapport à l'activité normale du transporteur. Deux études, une effectuée sur 48 individus japonais en santé et une autre sur 72 lignées cellulaires d'individus japonais, ont été faites afin de déterminer les différents polymorphismes (Itoda et al, 2001 et Ito et al, 2002). Il a été observé que de nombreux polymorphismes génétiques sont présents, menant potentiellement à une grande variation du niveau d'expression et d'activité d'ABCC2. Une étude sur le niveau d'expression et de fonction de certaines variantes génétiques d'*ABCC2* suggère que la variante la plus fréquente (V417I) n'affecte pas la fonction

d'ABCC2 alors que deux variantes moins fréquentes (S789F et A1450T) pourraient être associées avec une diminution de fonction (Hirouchi et *al*, 2004). De plus, l'exposition à différents facteurs environnementaux, comme par exemple les médicaments ou la pollution, semblent aussi avoir un rôle à jouer dans le niveau d'expression et d'activité d'ABCC2 (Suzuki et Sugiyama, 2002). Ces variations génétiques ou environnementales peuvent avoir un rôle dans les différences retrouvées entre les individus dans l'élimination des médicaments (Suzuki et Sugiyama, 2002). L'impact du niveau d'expression d'ABCC2 sur la sensibilité à la cholestase n'est pas encore connu.

#### **1.6.3.4 Conséquence d'une diminution d'Abcc2 chez l'animal**

Très peu d'études ont été publiées sur les conséquences d'une diminution d'Abcc2 chez l'animal. Une étude faite sur des rats possédant la moitié du niveau d'expression normal d'Abcc2 (*Abcc2*<sup>+/-</sup>) a montré une diminution de la sécrétion du GSH à 63% des rats contrôles (Paulusma et *al*, 1999). Cependant, l'effet d'une hémi-expression d'ABCC2 sur la sensibilité au développement de la cholestase ou sur le degré de la réponse cholestatique n'a pas, au meilleur de nos connaissances, été étudié.

## 1.7 Hypothèses de recherche et objectifs

La cholestase intrahépatique est l'une des maladies hépatiques des plus communes et sévères menant souvent à des dommages importants du foie qui peuvent aller jusqu'à la nécessité d'une transplantation hépatique pour prévenir un décès. Malgré l'avancement important sur les bases moléculaires menant au développement de cholestases sévères et progressives d'origine génétique «pure», les causes menant aux cholestases dites «acquises» demeurent encore largement à élucider. Il est toutefois devenu évident que des mutations moins sévères (ou retrouvées sous forme hétérozygote) de plusieurs gènes codant pour les protéines associées à la PFIC, qui s'expriment exclusivement ou principalement au niveau canaliculaire, mènent à une plus grande sensibilité de la fonction biliaire aux facteurs environnementaux.

Bien que l'absence ou la diminution de l'expression et de l'activité de plusieurs transporteurs canaliculaires puissent être responsables du développement de la cholestase, l'absence d'Abcc2 protège expérimentalement de la cholestase dans plusieurs modèles. Ces travaux supportent en fait que la présence du transporteur Abcc2 puisse être nécessaire pour permettre le développement de la cholestase expérimentalement induite par plusieurs agents exogènes (Crocenzi et *al*, 2003a, Sano et *al*, 1993 et Huang et *al*, 2000). Abcc2 pourrait donc être un facteur modifiant la réponse aux mutations impliquées dans le développement de CIG ou de BRIC, tout comme un agent principalement responsable de la régulation de l'intégrité hépatobiliaire et de sa réponse aux surcharges d'agents exogènes ou endogènes. L'absence d'ABCC2 chez l'humain est très rare, mais il existe de nombreux polymorphismes génétiques menant potentiellement à une grande variation du niveau d'expression et d'activité d'ABCC2 (Hirouchi et *al*, 2004), ouvrant la porte à une plausible importance d'ABCC2 dans la sensibilité à la cholestase. Malgré ce fait, aucune étude ne nous permet d'établir si le niveau d'expression et d'activité d'ABCC2 affecte la réponse à la cholestase. Nous émettons donc l'**hypothèse** qu'ABCC2 pourrait s'avérer un déterminant majeur impliqué dans la sensibilité à la cholestase acquise.

L'**objectif** de cette étude est d'évaluer si le niveau d'expression du transporteur ABCC2 affecte la susceptibilité au développement de la cholestase intrahépatique lors d'une insulte exogène. Afin de réaliser cette étude, un nouveau modèle murin génétiquement modifié a été produit. Ce modèle possède 50% du niveau d'expression normal d'Abcc2 (*Abcc2+/-*) de la souris sauvage (*Abcc2+/+*). Afin d'induire la cholestase toxicologique à notre modèle, nous avons procédé à une administration par infusion de doses élevées et croissantes de TC. Ce dernier étant un SB (endogène et capable de s'accumuler dans le foie) bien caractérisé, stimulant initialement le débit biliaire et la sécrétion des SB (cholérèse) jusqu'à l'atteinte du taux de sécrétion maximum des SB (SRM). Par la suite, le débit biliaire ainsi que la sécrétion des SB ne peuvent être maintenus et diminuent résultant en une cholestase (Barnwell et *al*, 1987 et Yousef et *al*, 1992). Ce modèle a été fréquemment utilisé chez le rat et permet d'établir dans un seul protocole le niveau de sensibilité du foie à la cholestase (Kitani et Kanai, 1982, Barnwell et *al*, 1987 et Fukumoto et *al*, 1994).

## Chapitre 2 : Article

Modification of ABCC2 expression level through gene targeting exposes its role in hepatic sensitivity to acute cholestatic insult induced by taurocholic acid overload

Casavant Stéphanie<sup>1,2</sup>, Korstanje Ron<sup>3,4</sup>, Lammert Frank<sup>5</sup>, Lévy Emile<sup>1,6</sup> and  
Bouchard Guylaine<sup>1,2,3,6</sup>

Division of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Ste-Justine Hospital<sup>1</sup>,  
Department of Biomedical Science<sup>2</sup>, University of Montreal, Montreal, PQ, Canada;  
The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA<sup>3</sup>; Medical Biology division,  
University Medical Centre Groningen, The Netherlands<sup>4</sup>, Medizinische Klinik I,  
Universitätsklinikum Bonn, Germany<sup>5</sup> and Department of Nutrition, University of  
Montreal, Montreal, PQ, Canada<sup>6</sup>

Corresponding author : Dr. Guylaine Bouchard  
Division of Nutrition and Gastroenterology,  
Hepatology and Nutrition  
Ste-Justine Research Center  
Department of Nutrition  
University of Montreal  
3175 Cote Ste-Catherine  
Montreal, Quebec, CANADA  
Phone: (514) 345-49354931, ext 2796  
FAX: (514) 345-4999

Email: [REDACTED]

Short title : Role of ABCC2 in cholestasis

**Soumis dans : Hepatology**

## Abstract

Canalicular transporters are the main regulators of bile formation. While absent or low expression levels of ABCB11 (bile salt (BS) transport) and ABCB4 (phospholipid transport) are established to mediate cholestasis, the absence of ABCC2 (organic anion/ glutathione transport) inversely elicits resistance to experimentally-induced cholestasis. This leads us to question whether, when present, ABCC2 expression level directly impacts susceptibility to acute cholestatic insults. To obtain a clear response, we used a murine model where ABCC2 expression level was modified by gene targeting. Method: Mice expressing half-normal ABCC2 expression level (*Abcc2*<sup>+/-</sup>) and *Abcb2*<sup>+/+</sup> mice were infused with step-wise increasing doses of taurocholic acid (TCA, 1.25, 2.50 and 3.75  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g body weight}$ ). Bile flow, bile composition and the expression of canalicular transporters in liver homogenates, canalicular and intracellular membranes were studied. Results: At the lowest rate of TCA infusion, the BS secretory rate was stimulated similarly in *Abcc2*<sup>+/+</sup> and <sup>+/-</sup> mice. The intermediate TCA infusion rate led *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice to their BS maximum secretory rate (SR<sub>m</sub>) and to initiation of the cholestatic process, characterized by a progressive decline in bile flow and in the secretory rate of biliary components. In sharp contrast, bile flow remained high, and the biliary secretory rates of BS continued to rise in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice, with the net effect of a significant elevation of the BS SR<sub>m</sub>. A further increase of the TCA infusion rate also led *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice to develop cholestasis, with declining rate of bile formation mirroring that observed earlier in *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice. In contrast to the similar canalicular/intracellular ratio of ABCC2 and ABCB11 under baseline conditions, its assessment at the end of TCA

infusion indicated much stronger inhibition of canalicular targeting in *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice. Conclusions: In contrast to other ABC canalicular transporters, high ABCC2 expression increases susceptibility to cholestatic insults, with the initiation of cholestasis occurring at a lower dose of the cholestatic trigger. Modulation of the pericanalicular trafficking of canalicular transporters, a feature commonly affected in cholestatic liver diseases, is likely to play a key role in the process.

**Word count: 334**

## Introduction

Bile formation is essential for the efficient elimination of endogenous and exogenous substances as well as for adequate lipid and liposoluble vitamin absorption. It also contributes importantly to intestinal protection via its delivery of antioxidants (mainly glutathione (GSH) and conjugated bilirubin) and immunoglobulin A (IgA)<sup>1</sup>. In the last decade, canalicular transporter members of the ATP-binding cassette superfamily (ABC) have been unravelled as a main driving force underlying bile formation. Among the best characterized are ABCB11, the predominant bile acid/bile salt (BS) transporter, ABCB4, involved in phosphatidylcholine translocation, ABCG5/G8, an heterodimer regulating cholesterol secretion, and ABCC2, the main carrier implicated in the canalicular transport of GSH but also of a large array of organic anions, including many metabolic products<sup>2,3</sup>. The apical expression of these transporters in hepatocytes, which determines secretory capacity, is a highly-regulated process, including through long-term transcriptional control as well as more rapid actions via phosphorylation and modulation of pericanalicular trafficking. The latter is becoming increasingly accepted as the main regulatory pathway that rapidly increases or decreases transport capacity at the canalicular membrane by means of the endocytic internalization or exocytic insertion of transporters to/from the pericanalicular vesicular compartment<sup>4,5</sup>.

Genetic mutations leading to complete or severe abrogation of the activity of many canalicular transporters have been linked to human diseases, including biliary diseases like progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) and the Dubin-

Johnson syndrome<sup>6, 7</sup>. However, such a drastic change in canalicular transporter functionality is not necessary for significant perturbations of the liver and the hepatobiliary system. In fact, *ABCB11* and *ABCB4* genetic mutations leading (or expected to lead) to less severe impairment in their expression/activity are also emerging as pivotal determinants of a much larger array of hepatic diseases, including cholelithiasis, benign recurrent intrahepatic cholestasis and pregnancy-induced cholestasis<sup>3, 7, 8</sup>. Thus, even when constitutively present, the expression level of these canalicular transporters can modulate the ability of the liver to respond to exogenous or physiological stresses.

ABCC2 has been one of the first canalicular transporters identified and, because of its involvement in the transport of many drugs and toxins, it has been studied extensively for its role in pharmacokinetics and toxicology, including drug-resistance<sup>9, 10</sup>. ABCC2 exhibits a high level of genetic variants, some established to modify its activity but most remaining of unknown impact on its activity or function<sup>11-15</sup>. In contrast to *ABCB11* and *ABCB4*, the absence of ABCC2 at the canalicular membrane in humans and animals is not linked to severe progressive cholestasis but is the molecular basis of the Dubin-Johnson syndrome, a disease mainly characterized by conjugated hyperbilirubinemia with minimal hepatotoxicity<sup>2, 16, 17</sup>. Albeit genetic variants affecting the function or expression level of ABCC2 are emerging as playing a role in drug metabolism and toxicity<sup>10, 18</sup>, the hepatobiliary impacts of changes in the expression level of ABCC2 have not yet been directly investigated.

Based on previous work in animal models, variations in ABCC2 expression could, as its homologues, be postulated to be pivotal in modulating hepatic sensitivity to exogenous or endogenous triggers. In fact, in contrast to animal models of PFIC types 2 and 3 lacking ABCB4 and ABCB11, which are sensitive to chronic cholestasis<sup>19,20</sup>, the absence of ABCC2 has been shown to abrogate the cholestatic action of various exogenous cholestatic triggers, including estradiol-17- $\beta$ -D-glucuronide, but also BS transported or not by ABCC2 (like lithocholate-3-O-glucuronide, sulfated glycolithocholic acid, taurocholic acid (TCA) and taurochenodeoxycholate)<sup>21-26</sup>. Compelling data have now been reported, at least with estradiol-17- $\beta$ -D-glucuronide, to support the finding that the absence of ABCC2 may, in fact, induce resistance to cholestasis through direct action in hepatocytes, rather than through a pharmacokinetic process<sup>24</sup>. A similar conclusion could also be supported by the observation that the absence of ABCC2 also abrogated the cholestasis induced by agents not transported by ABCC2, such as the usual BS<sup>25</sup>. Altogether, this provides compelling evidence that interaction between ABCC2 and cholestatic agents may be necessary to trigger the cholestatic process. Although the exact mechanism(s) leading to the development of cholestasis by estradiol-17- $\beta$ -D-glucuronide or various BS remain(s) unclear, early changes in the pericanalicular trafficking of transporters have been observed and proposed to initiate the limitation of secretory capacities<sup>5,27-30</sup>. It is, therefore, interesting that resistance to cholestasis in the absence of ABCC2 has now been demonstrated to also associate with better retention of canalicular transporters to the apical membrane<sup>26</sup>, which suggests that the presence of ABCC2 might play an important role in the internalization of canalicular transporters.

The hypothesis that direct interaction between ABCC2 and cholestatic triggers might be essential to the cholestatic response is paving the way for a potential role of ABCC2 expression level or activity in determining the response to cholestatic agents. Our objective here was to directly test whether ABCC2 expression level can effectively influence the response to a cholestatic trigger. We used a murine model genetically modified to express 50% of the wild type ABCC2 expression level (*Abcc2*<sup>+/-</sup>). We also elected to investigate the well-described cholestatic model of BS infusion in step-wise increasing doses because BS are believed to contribute significantly to the development or maintenance of cholestasis and hepatocyte damage<sup>31, 32</sup>, but most of all because this model is well-defined as initially stimulating biliary secretion and the BS secretory rate until a maximal secretory rate (SR<sub>m</sub>), which cannot be sustained and is followed by rapid and progressive impairment of biliary secretion<sup>25, 33</sup>. It thus appears to be the most appropriate model to test, in a single protocol, the potential differential response to varying doses of BS.

Our data clearly established that the ABCC2 expression level modulated liver sensitivity to our cholestatic agent, with mice expressing more ABCC2 developing cholestasis at a lower dose of TCA. As many genetic polymorphisms and a large array of exogenous components appear able to modify ABCC2 expression level<sup>9, 11, 14, 15</sup>, our results strongly support that, in addition to *ABCB4* and *ABCB11*, genetic variants of *ABCC2* should also be explored as potentially strong modulators of sensitivity to cholestatic triggers.

## Materials and Methods

### *Animals and diet*

The *Abcc2*<sup>+/+</sup> and *Abcc2*<sup>+/-</sup> offspring used in this study were obtained from mating of heterozygous and homozygous (wild type allele) mice (on a mixed 129S1/SvImJ and C57BL6/J genetic background). The construction of the mouse model is being reported elsewhere<sup>34</sup>. All mice with free access to standard laboratory chow (Harlan, IN, USA) and water were maintained on a constant 12-hour light/12-hour dark cycle with constant temperature (20°C). The protocol was approved by the Institutional Animal Care Committee of Hôpital Sainte-Justine.

### *DNA isolation and genotyping*

Genotype was followed through amplification by polymerase chain reaction (PCR) of the mutated (Primers 5'CAT TGC TCA GCG GTG CTG T3' (forward) and 5'CAG TTC AGT GCG CAG CAG AA3' (reverse)) and endogenous (5'GGG AAT GAG GAA GGG TTT GG3' (forward), 5'AAC ATC GCA TGG ACT CAG CA3' (forward) and 5'CAG TTC AGT GCG CAG CAG AA3' (reverse)) *Abcc2* alleles on genomic DNA isolated from the tail or spleen<sup>35</sup>. PCR products were migrated on 3% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

### Experimental protocol

The mice were weighed and surgery performed under anaesthesia induced by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (MTC Pharmaceuticals, Ont., Canada). Body temperature of the mice was maintained with a rectal probe at

37.5±1.0°C, using a thermostatically-controlled infrared lamp. Surgery was started at 7:00 AM and limited to a 2-hour 30-minute window to avoid diurnal variations in biliary secretion. After laparotomy, the cystic duct was ligated to prevent gallbladder bile secretion into the common bile duct. Then, the common bile duct was cannulated with a PE-10 catheter (Beckton Dickinson Intramedia Clay Adams Brand, MD, USA), and the right jugular vein was exposed and cannulated for later infusion. After 20 minutes of bile collection, bovine serum albumin (2.5%, Interscience, Ont., Canada) in 0.9% sodium chloride was infused at a rate of 35 µl/min with a peristaltic pump for 20 minutes. TCA (Steraloids, RI, USA) was then infused in step-wise increasing doses of 1.25, 2.50 and 3.75 µmol/min·100 g body weight in 2.5% bovine serum albumin (in 0.9% saline), with each dose being administered for 20 minutes. Throughout the experiment, bile samples were collected in 10-minute aliquots, in ice-cold pre-weighed vials protected from light. For each of the 5 conditions, the first bile sample (first 10 minutes) was collected in 10 µL of 10% sulfosalicylic acid to avoid degradation of GSH. At the end of the infusion, the mice were sacrificed by cardiac puncture, and the liver was removed rapidly, weighed, frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until required for analysis. Serum was isolated by centrifugation at 13,000 RPM for 10 minutes and frozen at -20°C until analysed. Except for biliary samples processed for GSH which were freshly analyzed, residual bile samples were frozen at -20°C until assayed. It should be noted that an additional group of mice, used to establish baseline conditions, was sacrificed in the same manner with the exception that they did not receive TCA infusion.

### ***Biliary secretion and bile analysis***

Bile flow was measured by gravimetry, assuming a density of 1 g/ml. Total GSH was assayed according to the GSH reductase recycling procedure<sup>36</sup>. Total BS were quantified by 3- $\alpha$ -OH-steroid dehydrogenase (Sigma Aldrich, MO, USA) assay<sup>37</sup>, with BS profile being established by HPLC<sup>38</sup>. Biliary phospholipids (PL) and cholesterol were assayed according to Bartlett's method and by HPLC<sup>37, 38</sup>.

### ***Hepatic and serum BS assays***

After extraction (liver samples)<sup>39</sup>, serum and hepatic BS concentrations were assayed with the Bile Acids L3K<sup>®</sup> kit (Diagnostic Chemicals Limited, PEI, Canada), which is a recycling assay using 3- $\alpha$ -OH-steroid dehydrogenase.

### ***Isolation of liver membranes***

1.2 to 1.6 g of liver was taken to isolate enriched plasma bile canalicular membranes (BCM) and enriched intracellular/pericanalicular membranes (IM). BCM were isolated by differential centrifugation on a discontinuous sucrose gradient<sup>40</sup>, and IM were prepared according to a procedure described previously<sup>26, 27, 41</sup>, starting with the material from the 1.26 g/ml fraction in the previous centrifugation. After adjustment to a density of 1.03 g/ml, the samples were centrifuged at 17,000 g for 20 minutes. The resulting pellet was gently resuspended in 45 ml buffer containing NaHCO<sub>3</sub> 1 mM and CaCl<sub>2</sub> 0.5 mM, pH 7.4, and recentrifuged at a rate of 17,000 g for 20 minutes to remove sucrose. This procedure was performed twice. Aliquots of BCM and IM were frozen at -80°C until analysed. Membrane purity was verified by

enzymatic determination of plasma canalicular markers (leucine aminopeptidase<sup>40</sup> and 5'nucleotidase<sup>40</sup>). Enrichments (representing specific activity of the sample divided by specific activity of the homogenate) in 5'nucleotidase were 23-fold  $\pm$  7 in BCM and 2.5-fold  $\pm$  0.5 in IM, while leucine aminopeptidase was enriched 10-fold  $\pm$  3 in BCM but 0.7-fold  $\pm$  0.1 in IM. As described previously<sup>26, 27</sup>, the IM fraction revealed some enrichment in glucose-6-phosphatase<sup>40</sup> (6.7-fold  $\pm$  1.1 in IM).

### ***Western blot analysis***

ABCB11 and ABCC2 expression in homogenates, BCM and IM was measured by Western blots<sup>38</sup>. Protein concentrations were quantified by the Lowry method<sup>38</sup>. Ponceau S, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase or GAPDH (homogenates) and dipeptidyl peptidase IV or DDPIV (BCM) were used to verify loading. Proteins (10-100  $\mu$ g/20  $\mu$ l) were separated by 8% (w/v) (DDPIV) or 12% (w/v) (ABCC2, ABCB11, GAPDH) sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (with samples for DDPIV and GAPDH boiled previously). After transfer to nitrocellulose membranes (Amersham Life Science, IL, USA), the blots were blocked with Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (Sigma, Ont., Canada) and 1% (w/v) (DDPIV), 5% (GAPDH) or 10% (ABCC2, ABCB11) low-fat dry milk and probed with polyclonal antibody EAG15 (1:500 dilution) for ABCC2 (obtained from Dr. Bruno Stieger)<sup>42</sup>, antiserum IW<sup>43</sup> for ABCB11 (1:2,000 dilution, generously provided by Dr. Victor Ling), monoclonal DDPIV antibody (1:5,000 dilution, Pierce Chemical Compagny, IL, USA) or monoclonal GAPDH antibody (1:5,000 dilution, Novus Biologicals. Inc., CO, USA). Detection with horseradish peroxidase-conjugated anti-

Ig (1:5,000 dilution, Pierce Super Signal West Pico mouse Ig detection kit (DDP1V, GAPDH) or Upstate Visualizer anti-rabbit Ig (ABCC2, ABCB11, Pierce Chemical Company) was followed by enhanced chemiluminescence detection with Pierce Super Signal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce Chemical Company). The nitrocellulose membranes were then exposed for 1 minute on Kodak Biomax MR film.

### ***Statistical analysis***

The unpaired T-test was employed to determine statistical differences between 2 groups, with a significance level fixed at  $p < 0.05$ . All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was undertaken with the GraphPad Prism 4.0 program.

## Results

### *Validation of the model*

To ensure that our animal study populations were effectively exhibiting distinct ABCC2 expression levels, we initially performed a pilot experiment to quantify hepatic ABCC2 content in *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice. This experiment confirmed that *Abcc2*<sup>+/-</sup> only expressed around 50% of the ABCC2 protein level found in *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice (results not shown but very similar to the data reported in Fig. 3A).

### *Anthropometric data*

Carrying 1 or 2 wild alleles for *Abcc2* did not modify body weight or liver weight as similar values were obtained for *Abcc2*<sup>+/+</sup> and *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice (body weight: 36.96±1.13 and 35.31±1.52 g respectively; liver weight: 1.42±0.07 and 1.40±0.08 g respectively).

### *Bile formation, BS homeostasis and distribution of selected canalicular transporters in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice under basal condition*

#### *Bile formation*

Because ABCC2 is the main transporter of biliary GSH and appears to be the rate-limiting step in GSH secretion<sup>44</sup>, we first examined if the GSH biliary secretion rate was affected in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice. As expected<sup>44</sup>, modifying the ABCC2 expression level resulted in parallel modulation of the tripeptide secretory rate, with mice

expressing a half-normal ABCC2 expression level exhibiting around 50% of the biliary GSH secretion rate compared to wild type controls (Fig. 1A). Surprisingly, despite this strong effect, there was no significant impact of ABCC2 expression level on bile flow, with *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice presenting only a small 10% decline compared to *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 1B).

We then followed the influence of the ABCC2 expression level on the secretion of biliary lipids (BS, cholesterol and PL), which are not translocated through the canalicular membrane by the protein under study. Whether mice were from the *Abcc2*<sup>+/+</sup> or the *Abcc2*<sup>+/-</sup> group proved irrelevant in regard to the BS secretory rate (Fig. 1C). Examination of the BS profile also displayed no change between *Abcc2*<sup>+/+</sup> and *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice (results not shown).

In sharp contrast to BS, a highly significant effect of the ABCC2 expression level was observed on the biliary PL secretion rate (Fig. 1D), which was increased by about 40% in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice compared to the wild type controls. Although more modest and non-significant, the same tendency was observed for the biliary secretion rate of cholesterol (Fig. 1E). Accordingly, the cholesterol/PL ratio depicted a trend downstream for *Abcc2*<sup>+/-</sup> in comparison to *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 1F), whereas both the PL/BS and cholesterol/BS ratios tended to be higher in the *Abcc2*<sup>+/-</sup> group (PL/BS: 15.71±1.33 vs 12.68±2.70, and cholesterol/BS: 2.46±0.76 vs 2.15±0.59 for the *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> groups, respectively).

### ***Serum and hepatic BS***

As illustrated in Figure 2, the ABCC2 expression level did not affect BS homeostasis as evaluated by BS concentration in serum and liver.

### ***Expression and pericanalicular targeting of ABCC2 and ABCB11***

As expected, the hepatic ABCC2 expression level in the *Abcc2*<sup>+/-</sup> was decreased to nearly 50% of the wild type controls (Fig. 3A). Despite this, and in accordance with the GSH secretory levels, no sign of adaptation increasing the presence of ABCC2 at the canalicular membrane was seen in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice. This was evident from the half ABCC2 expression level in both BCM and IM fractions of the heterozygous strain compared to *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 3A). In addition, the BCM/IM ratio, reflecting relative pericanalicular targeting<sup>5, 26, 27</sup>, remained similar in the 2 experimental groups.

In accordance with the physiological data, the ABCC2 expression level did not modify the hepatic ABCB11 expression level or its content in BCM and IM fractions (Fig. 3B). Consequently, pericanalicular targeting evaluated through the BCM/IM ratio displayed no difference between *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice.

### ***Bile formation, BS homeostasis and distribution of selected canalicular transporters in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice in response to TCA infusion***

***BS secretion:***

Figure 4 depicts the response of *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice to TCA infusion. At the lowest dose of TCA infusion, the BS secretory rate was rapidly stimulated in a manner that was independent of the ABCC2 expression level (Fig. 4A). In both groups, nearly 100% of the BS infused appeared to be secreted (data not shown). When the amount of TCA was increased to the intermediate infusion dose (2.5  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g body weight}$ ), *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice initially responded by further stimulation of their BS secretory rate, but reached their SRm and their BS secretory rate then started to decline in a manner similar to data reported previously in a rat model<sup>33</sup>. In sharp contrast, the same infusion rate of TCA in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice induced constant stimulation of the BS secretory rate, which reached a level significantly higher than in the *Abcc2*<sup>+/+</sup> group. Further increments of TCA infusion to 3.75  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g body weight}$  also led the *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice to reach their SRm and to initiate a decline in the BS secretory rate. Albeit occurring at a different dose of TCA and remaining at significantly different BS secretory levels for the same dose of TCA infused, the slope of the decline in BS biliary secretion was quite similar between both groups (Fig. 4A). The higher extrusion capacity of the cholestatic agent in the bile of *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice was also reflected by the significantly greater total BS secretion observed in this group compared to *Abcc2*<sup>+/+</sup> before reaching the SRm, with *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice secreting 43% more BS (Fig. 4B).

Examination of the biliary BS profile revealed very similar composition in *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice (data not shown), with a minor decline of dihydroxylated BS in

the *Abcc2*<sup>+/-</sup> group that however reached a statistically different level at the dose of 3.75  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100$  g body weight (TCA 1.25:  $0.57\pm 0.29\%$  vs  $1.13\pm 0.14\%$  for *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice, respectively,  $p > 0.05$ ; TCA 3.75:  $0.24\pm 0.03\%$  vs  $0.57\pm 0.15\%$  for *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup>, respectively,  $p < 0.05$ ).

#### ***Other biliary parameters***

The effects of the ABCC2 expression level on bile flow and GSH biliary secretion in response to TCA infusion are illustrated in Figure 4C and 4D respectively. It can be seen that the lowest dose of TCA infusion stimulated both bile flow and GSH secretion. However, while bile flow was stimulated in a highly similar manner in *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice, quantitative stimulation of the GSH secretory rate remained about 50% lower in the *Abcc2*<sup>+/-</sup> group (with the percent increase being similar to that in the *Abcc2*<sup>+/+</sup> group, data not shown). Increasing the TCA infusion rates to 2.5  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100$  g body weight resulted in a biliary response comparable to the one described for BS, except that the biliary parameters stabilized in the *Abcc2*<sup>+/-</sup> group. Increasing the TCA infusion rate further to 3.75  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100$  g body weight, again similarly to the BS secretory rate, led to more profound inhibition of bile flow and GSH biliary secretion in *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice while enabling the defect in bile formation to develop in the *Abcc2*<sup>+/-</sup> group. It is noteworthy that final GSH biliary secretion was identical between the groups, due to the marked decline occurring in *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice.

The impact of the ABCC2 expression level on the biliary PL and cholesterol secretion rates was also followed in response to TCA infusion and mimicked the BS secretory rates in both groups (data not shown).

#### ***Serum, hepatic and biliary targeting of BS***

When assayed at the end of the experiment, both serum and hepatic BS concentrations tended to be decreased in the *Abcc2*<sup>+/-</sup> group (Fig. 5A and 5B respectively). Hepatobiliary targeting of BS in response to TCA, through the BS ratio in bile/bile+liver, was also found to be more efficient in *Abcc2*<sup>+/-</sup> than in *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 5C and 5D).

#### ***Expression and pericanalicular targeting of ABCC2 and ABCB11***

In contrast to the clear half expression level of ABCC2 in *Abcc2*<sup>+/-</sup> compared to *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice at baseline, hepatic ABCC2 expression at the end of TCA infusion in the *Abcc2*<sup>+/-</sup> group represented 81% of the level observed in the wild type controls (Fig. 6A). A similar effect was apparent in regard to ABCC2 level in the BCM fraction, with *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice exhibiting 88% of wild type values (Fig. 6A). In contrast, the difference between groups became accentuated in the IM fraction, resulting in a 7-fold increase of the BCM/IM ratio in *Abcc2*<sup>+/-</sup> compared to *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 6A).

When looking at the ABCB11 hepatic expression level and distribution (Fig. 6B), no significant difference could be found because of the large variation between the mice.

However, there was also a clear tendency for *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice to express around 50% less ABCB11 in the IM fraction, which lead to a 4-fold increase in the BCM/IM ratio.

## Discussion

This study was designed to establish whether changes in ABCC2 expression levels can be a risk factor modifying sensitivity to the development of cholestasis. Our data clearly showed that, when challenged by TCA infusion, the initial ABCC2 expression level modified the dose at which our exogenous trigger was leading to cholestasis. More precisely, and in clear contrast with other canalicular transporters where increased sensitivity to cholestasis appeared to associate with decreased expression<sup>7</sup>,<sup>8</sup>, a *higher* ABCC2 expression level led to greater susceptibility to the cholestatic insult, with the initiation of cholestasis occurring at a lower dose of the cholestatic trigger.

Knowledge of the hepatobiliary consequences of variable ABCC2 expression levels is very limited, with most biliary changes related to ABCC2 deriving from studies exploring the consequences of complete absence of ABCC2 activity<sup>1, 25, 45-49</sup>. As illustrated by our findings, variation in the expression level can have consequences very distinct from a complete absence of protein expression. Experimentally, we are only aware of a single study that explored, in the rat, the consequences of a half-normal level of ABCC2 on bile formation<sup>44</sup>. Similarly to their findings, we observed that the biliary GSH secretion rate paralleled the expression level of ABCC2. We also

established that *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice did not demonstrate perturbations in the BS biliary secretory rate, or serum or hepatic BS accumulation. However, we noted that the ABCC2 expression level was strongly modifying biliary PL secretion. Although the molecular mechanism may be incomplete, such ‘uncoupling’ of PL from BS has been shown to be induced by organic anions or variations in BS independent bile flow<sup>50, 51</sup>. We did not follow the major endogenous organic anion secreted by ABCC2 (conjugates of bilirubin), but it appears likely that a higher ABCC2 expression level, contributing to the secretion of organic anions as well as to the generation of BS independent bile flow through GSH secretion, may participate in this effect. It is in fact interesting that our previous work looking at the genetic determinants underlying sensitivity to cholelithiasis led us to propose that ABCC2 hyperactivity could be underlying the *Lith2* quantitative trait locus<sup>52</sup>. In our current conditions, mice were fed a chow diet and exhibited a low cholesterol saturation index. However, under other conditions, the declining PL associated with a higher ABCC2 expression level could well prove to precipitate lithogenicity. Thus, regulation of biliary PL secretion (and of biliary lipid coupling) as well as changes in the availability of antioxidants provided to the intestinal lumen (and therefore in the capacity to neutralize dietary oxidants) are 2 of the main features that appear to be directly linked to ABCC2 expression level. Whether these phenomena are occurring at a significantly important level to contribute to the induction of diseases remains to be explored.

Another feature observed between *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice was that animals expressing a half hepatic ABCC2 expression level did not attempt to compensate for the decreased availability of transporters localized at the canalicular membrane. In fact, both enriched BCM and IM fractions maintained a ratio similar to that observed in homogenates, with an unchanged BCM/IM ratio likely reflecting unchanged targeting or retention of the canalicular transporter to the membrane. This was also indirectly supported by the half decline in GSH biliary secretion but also by the initial response to the lower amount of TCA infused, where *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice stimulated half of the BS-induced biliary secretion of GSH, a fact that has been associated with the recruitment of pericanalicular transporters to the membrane<sup>5</sup>. Altogether, these data suggest that the liver does not modify its delivery mechanism of the transporter to the membrane in a way that would help to compensate for the loss of function.

While the ABCC2 expression level did not impact BS homeostasis under basal conditions, it clearly modulated its sensitivity to a BS overload. At the intermediate dose of TCA used in this study, *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice developed a classic cholestatic response, evidenced by a decline in the secretion of BS and other biliary components. In contrast, *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice maintained a physiologically normal response, with a BS secretory rate (and associated bile formation) that continued to rise. We thereby provided a strong demonstration that the ABCC2 expression level has a significant impact on the response to a cholestatic exogenous trigger. What we have, however, also demonstrated is that further increasing the TCA dose then induced a cholestatic response in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice, a response that at this point appeared to follow the same

declining rate observed earlier in *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice (slope of decline in biliary secretion). These data are in fact quite different from studies performed in the absence of ABCC2, where complete resistance to cholestasis has been convincingly demonstrated in various cholestasis models<sup>21-24, 26</sup>, including TCA<sup>25</sup>. Some of these studies, particularly when large amounts of an oestrogenic cholestatic compound were used<sup>24</sup>, have led to the proposition that direct interaction between the cholestatic agent and ABCC2 may in fact be important in initiation of the cholestatic process. In our model, *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice proved to be more resistant to initiation of the cholestatic process but not to cholestasis itself. Because the absence of ABCC2 expression is associated with resistance to cholestasis and because a half ABCC2 expression level improves resistance to cholestasis but cannot prevent its development, we would like to propose further that ABCC2 is a major protein essential in the establishment of many cholestatic processes, but that its expression level is the key determinant of the concentration at which a potentially cholestatic agent will initiate the disease.

Another major finding is the fact that *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice appeared to demonstrate highly modified pericanalicular targeting at the end of the experiment, the BCM/IM ratio being raised by 7- and 4-fold in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice compared to the wild type controls for ABCC2 and ABCB11 respectively. Thus, the ABCC2 expression level may directly contribute to modify the availability of canalicular transporters (ABCC2 and ABCB11) by altering their pericanalicular transport in presence of an hepatic stressor. According to the limitations of our experimental Western blot design, which do not allow us to directly compare the variations

obtained between basal and infused mice, we can not clearly establish if the changes of this ratio or targeting are the reflection of greater introgression or decreased insertion in the membrane, but we can conclude that this disturbance of pericanalicular transport seems to demonstrate some specificity because the BCM/IM ratio of another protein localized on the canalicular membrane (DDPIV) remained identical in our 2 experimental groups. We believe, however, that our results support an important introgression, particularly in the *Abcc2*<sup>+/+</sup> group. We base this interpretation on the observation that, in contrast to the marked difference between *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice when studied under basal conditions, the relative ABCC2 difference between the groups almost disappeared, after TCA infusion, in both the BCM and the homogenate while the relative difference in the ABCC2 expression level increased in the IM. Although a high level of newly-synthesized proteins in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice could theoretically explain this phenomenon, we do not favour such an hypothesis based on our very short experimental time. A second mechanism that we favour could be a high degradation rate of ABCC2 in the *Abcc2*<sup>+/+</sup> group. In accordance with the remaining elevated level of ABCC2 in the IM fraction of *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice compared to the *Abcc2*<sup>+/-</sup> group, we propose that a much higher level of internalization is occurring in *Abcc2*<sup>+/+</sup> mice, leading to a large decrease in BCM localization and to increased accumulation of the transporters in the IM, where they are processed for subsequent degradation. As interiorization of canalicular transporters, probably an important player in the initiation of declining secretory functions<sup>53</sup>, is observed in a wide array of experimental cholestatic models, including BS<sup>29, 30</sup> but also E217G<sup>26-28</sup>, endotoxins<sup>54</sup>, phalloidin<sup>55</sup>, oxidative stress<sup>56</sup>

and hyperosmolarity<sup>57</sup>, the ABCC2 expression level could emerge as a major regulator of sensitivity to a large group of cholestatic agents. However, our data also clearly provides a proof of principle that the sole exploration of canalicular transporters expression under already established cholestatic conditions may totally invalidate the conclusions as the similar levels of ABCC2 expression observed at the canalicular membrane of our *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup> groups are the reflection of major differential changes in response to TCA infusion.

In conclusion, this study has established that the ABCC2 expression level can control the sensitivity of hepatocytes to BS. We would like to speculate that ABCC2 is also involved in cholestatic sensitivity to other exogenous agents, through a primary role in the regulation of pericanalicular trafficking of canalicular transporters. How ABCC2 controls this process mechanistically is still obscure, but its intriguing properties, including its non-substrate-binding sites<sup>58, 59</sup> as well as its regulation of a membrane chloride channel<sup>60</sup>, are certainly opening avenues that may lead to new paradigms in regard to the fine tuning of bile formation, culminating in discovery of potential new preventive and interventional therapies. A mechanistically unifying hypothesis is proposed in Figure 7. At the moment, because the ABCC2 expression level is expected to be highly variable in humans due to genetic polymorphisms<sup>11, 14, 15</sup> but also in response to environmental factors (e.g. drugs)<sup>9</sup>, further studies should establish if ABCC2 is an additional key player in human cholestasis, particularly in conditions where pericanalicular trafficking of transporters has been shown to be affected.

## References

1. Benhamou JP, Erlinger S. Maladies du foie et des voies biliaires. Médecine-Sciences Flammarion, 2000.
2. Pauli-Magnus C, Meier PJ. Hepatocellular transporters and cholestasis. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:S103-S110.
3. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003;83:633-671.
4. Kipp H, Arias IM. Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *Annu Rev Physiol* 2002;64:595-608.
5. Kubitz R, Helmer A, Haussinger D. Biliary transport systems: short-term regulation. *Methods Enzymol* 2005;400:542-557.
6. Keitel V, Kartenbeck J, Nies AT, Spring H, Brom M, Keppler D. Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin- Johnson syndrome. *Hepatology* 2000;32:1317-1328.
7. van Mil SW, Houwen RH, Klomp LW. Genetics of familial intrahepatic cholestasis syndromes. *J Med Genet* 2005;42:449-463.
8. Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *J Hepatol* 2005;43:342-357.
9. Suzuki H, Sugiyama Y. Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1311-1331.

10. Wada M. Single nucleotide polymorphisms in ABCC2 and ABCB1 genes and their clinical impact in physiology and drug response. *Cancer Lett* 2006;234:40-50.
11. Hirouchi M, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Ieiri I, Ohtsubo K, Sugiyama Y. Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2. *Pharm Res* 2004;21:742-748.
12. Ito S, Ieiri I, Tanabe M, Suzuki A, Higuchi S, Ohtsubo K. Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics* 2001;11:175-184.
13. Itoda M, Saito Y, Soyama A, Saeki M, Murayama N, Ishida S, Sai K, Nagano M, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S, Sawada JJ. Polymorphisms in the ABCC2 (cMOAT/MRP2) gene found in 72 established cell lines derived from Japanese individuals: an association between single nucleotide polymorphisms in the 5'-untranslated region and exon 28. *Drug Metab Dispos* 2002;30:363-364.
14. Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger U, Meier PJ, Stieger B. Relationship of canalicular ATP-binding cassette (ABC)-transporter expression in human liver and single nucleotide polymorphisms of corresponding genes in caucasians. *40 ed.* 2004:647A.
15. Ryu S, Kawabe T, Nada S, Yamaguchi A. Identification of basic residues involved in drug export function of human multidrug resistance-associated protein 2. *J Biol Chem* 2000;275:39617-39624.

16. Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P, Oude Elferink RP. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 1996;271:1126-1128.
17. 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* 1997;272:G16-G22.
18. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:216-237.
19. Wang R, Lam P, Liu L, Forrest D, Yousef IM, Mignault D, Phillips MJ, Ling V. Severe cholestasis induced by cholic acid feeding in knockout mice of sister of P-glycoprotein. *Hepatology* 2003;38:1489-1499.
20. van Nieuwkerk CM, Elferink RP, Groen AK, Ottenhoff R, Tytgat GN, Dingemans KP, van den Bergh Weerman MA, Offerhaus GJ. Effects of ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted *mdr2* P-glycoprotein gene. *Gastroenterology* 1996;111:165-171.
21. Takikawa H, Minagawa K, Sano N, Yamanaka M. Lithocholate-3-O-glucuronide-induced cholestasis. A study with congenital hyperbilirubinemic rats and effects of ursodeoxycholate conjugates. *Dig Dis Sci* 1993;38:1543-1548.

22. Kuipers F, Hardonk MJ, Vonk RJ, van der MR. Bile secretion of sulfated glycolithocholic acid is required for its cholestatic action in rats. *Am J Physiol* 1992;262:G267-G273.
23. Sano N, Takikawa H, Yamanaka M. Estradiol-17 beta-glucuronide-induced cholestasis. Effects of ursodeoxycholate-3-O-glucuronide and 3,7-disulfate. *J Hepatol* 1993;17:241-246.
24. Huang L, Smit JW, Meijer DK, Vore M. Mrp2 is essential for estradiol-17beta(beta-D-glucuronide)-induced cholestasis in rats. *Hepatology* 2000;32:66-72.
25. Hoshino M, Hayakawa T, Hirano A, Kamiya Y, Ohiwa T, Tanaka A, Kumai T, Inagaki T, Miyaji M, Takeuchi T. The mutant Eisai hyperbilirubinemic rat is resistant to bile acid- induced cholestasis and cytotoxicity. *Hepatology* 1994;20:932-939.
26. Crocenzi FA, Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Pozzi EJ, Vore M, Coleman R, Roma MG. Estradiol-17beta-D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G449-G459.
27. Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Crocenzi F, Roma MG, Vore M. Altered localization and activity of canalicular Mrp2 in estradiol- 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology* 2002;35:1409-1419.
28. Mottino AD, Crocenzi FA, Pozzi EJ, Veggi LM, Roma MG, Vore M. Role of microtubules in estradiol-17beta-D-glucuronide-induced alteration of

- canalicular Mrp2 localization and activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G327-G336.
29. Crocenzi FA, Mottino AD, Sanchez Pozzi EJ, Pellegrino JM, Rodriguez Garay EA, Milkiewicz P, Vore M, Coleman R, Roma MG. Impaired localisation and transport function of canalicular Bsep in tauroolithocholate induced cholestasis in the rat. *Gut* 2003;52:1170-1177.
  30. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G, Dombrowski F. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 2001;33:1206-1216.
  31. Yousef IM, Bouchard G, Tuchweber B, Plaa GL. Mechanisms involved in bile acid-induced cholestasis. In: Plaa G and Hewitt W, eds. *Toxicology of the liver*. 1998:347-382.
  32. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 1998;339:1217-1227.
  33. Yousef I, Mignault D, Tuchweber B. Effect of complete sulfation of bile acids on bile formation: role of conjugation and number of sulfate groups. *Hepatology* 1992;15:438-445.
  34. Bouchard G, Chao HC, Lammert F, Carey MC, Paigen B. Murine cholesterol cholelithiasis due to Lith2 is linked to a structural mutation in the *Abcc2* gene. *Nat Genet* 2006;in revision.

35. Bouchard G, Nelson HM, Lammert F, Rowe LB, Carey MC, Paigen B. High-resolution maps of the murine Chromosome 2 region containing the cholesterol gallstone locus, Lith1. *Mamm Genome* 1999;10:1070-1074.
36. Bouchard G, Yousef IM, Barriault C, Tuchweber B. Role of glutathione and oxidative stress in phalloidin-induced cholestasis. *J Hepatol* 2000;32:550-560.
37. Bouchard G, Johnson D, carver T, Paigen B, Carey MC. Cholesterol gallstone formation in overweight mice establishes that obesity per se is not linked directly to cholelithiasis risk. *J Lipid Res* 2002;43:1105-1113.
38. Clarke GA, Bouchard G, Paigen B, Carey MC. Cholesterol synthesis inhibition distal to squalene upregulates biliary phospholipid secretion and counteracts cholelithiasis in the genetically prone C57L/J mouse. *Gut* 2004;53:136-142.
39. Perwaiz S, Tuchweber B, Mignault D, Gilat T, Yousef IM. Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 2001;42:114-119.
40. Bouchard G, Yousef IM, Tuchweber B. Influence of oral treatment with ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acids on estrogen-induced cholestasis in rats: effects on bile formation and liver plasma membranes. *Liver* 1993;13:193-202.
41. Marinelli RA, Pham L, Agre P, LaRusso NF. Secretin promotes osmotic water transport in rat cholangiocytes by increasing aquaporin-1 water channels in plasma membrane. Evidence for a secretin-induced vesicular translocation of aquaporin-1. *J Biol Chem* 1997;272:12984-12988.

42. Madon J, Hagenbuch B, Landmann L, Meier PJ, Stieger B. Transport function and hepatocellular localization of mrp6 in rat liver. *Mol Pharmacol* 2000;57:634-641.
43. Wang R, Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, Helgason CD, Ackerley C, Phillips MJ, Ling V. Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2011-2016.
44. Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P, Oude Elferink RP. Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J* 1999;338:393-401.
45. Ji B, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y, Horie T. Multidrug resistance-associated protein2 (MRP2) plays an important role in the biliary excretion of glutathione conjugates of 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 2002;33:370-378.
46. Dijkstra M, Kuipers F, Havinga R, Smit EP, Vonk RJ. Bile secretion of trace elements in rats with a congenital defect in hepatobiliary transport of glutathione. *Pediatr Res* 1990;28:339-343.
47. Takikawa H, Sano N, Narita T, Uchida Y, Yamanaka M, Horie T, Mikami T, Tagaya O. Biliary excretion of bile acid conjugates in a hyperbilirubinemic mutant Sprague-Dawley rat. *Hepatology* 1991;14:352-360.
48. Nezasa K, Tian X, Zamek-Gliszczyński MJ, Patel NJ, Raub TJ, Brouwer KL. Altered hepatobiliary disposition of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-

- dichlorofluorescein in *Abcg2* (*Bcrp1*) and *Abcc2* (*Mrp2*) knockout mice. *Drug Metab Dispos* 2006;34:718-723.
49. Chu XY, Strauss JR, Mariano MA, Li J, Newton DJ, Cai X, Wang RW, Yabut J, Hartley DP, Evans DC, Evers R. Characterization of mice lacking the multidrug resistance protein *mrp2* (*abcc2*). *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:579-589.
50. Verkade HJ, Wolters H, Gerding A, Havinga R, Fidler V, Vonk RJ, Kuipers F. Mechanism of biliary lipid secretion in the rat: a role for bile acid-independent bile flow? *Hepatology* 1993;17:1074-1080.
51. Verkade HJ, Havinga R, Gerding A, Vonk RJ, Kuipers F. Mechanism of bile acid-induced biliary lipid secretion in the rat: effect of conjugated bilirubin. *Am J Physiol* 1993;264:G462-G469.
52. Bouchard G, Carey MC, Paigen B. Effects of an *Abcc2* missense mutation on biliary lipid secretion and lithogenicity of bile. In: Beueurs et al, ed. *Proceedings of the FALK Symposium* 138. 2004:50-57.
53. Crocenzi FA, Mottino AD, Roma MG. Regulation of synthesis and trafficking of canalicular transporters and its alteration in acquired hepatocellular cholestasis. Experimental therapeutic strategies for its prevention. *Curr Med Chem* 2004;11:501-524.
54. Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U, Haussinger D. Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology* 1999;116:401-410.

55. Rost D, Kartenbeck J, Keppler D. Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology* 1999;29:814-821.
56. Schmitt M, Kubitz R, Wettstein M, vom DS, Haussinger D. Retrieval of the mrp2 gene encoded conjugate export pump from the canalicular membrane contributes to cholestasis induced by tert-butyl hydroperoxide and chloro-dinitrobenzene. *Biol Chem* 2000;381:487-495.
57. Schmitt M, Kubitz R, Lizun S, Wettstein M, Haussinger D. Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene-encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology* 2001;33:509-518.
58. Gerk PM, Li W, Vore M. Estradiol 3-glucuronide is transported by the multidrug resistance-associated protein 2 but does not activate the allosteric site bound by estradiol 17-glucuronide. *Drug Metab Dispos* 2004;32:1139-1145.
59. Zelcer N, Huisman MT, Reid G, Wielinga P, Breedveld P, Kuil A, Knipscheer P, Schellens JH, Schinkel AH, Borst P. Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J Biol Chem* 2003;278:23538-23544.
60. Li X, Weinman SA. Mrp2 modulates the activity of chloride channels in isolated hepatocytes. *Hepatology* 2002;36:65-71.
61. Zsembery A, Jessner W, Sitter G, Spirli C, Strazzabosco M, Graf J. Correction of CFTR malfunction and stimulation of Ca-activated Cl channels restore. *Hepatology* 2002;35:95-104.

62. Benedetti A, Strazzabosco M, Corasanti JG, Haddad P, Graf J, Boyer JL. Cl(-)-. Am J Physiol 1991;261:G512-G522.
63. Dombrowski F, Kubitz R, Chittattu A, Wettstein M, Saha N, Haussinger D. Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. Biochem J 2000;348 Pt 1:183-188.

### **Acknowledgments**

This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to GB. We are also grateful to the CIHR and Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) for their salary support to GB as well as to Cinéma Guzzo for their research stipend provided to SC. The excellent technical support of Dr. Grace Gavino is acknowledged.

## Figure Legends

### **Figure 1. Bile formation and secretion in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice under basal conditions.**

A) Total GSH secretion, B) Bile flow, C) Total BS secretion, D) PL secretion, E) Cholesterol (Chol) secretion and F) Chol/PL ratio. Bile was collected after common bile duct cannulation. Bile for GSH analysis was sampled in the first 10 minutes of bile collection while bile for BS, chol and PL assays was taken in the second 10 minutes of the basal period. Analyses were performed as described in Materials and Methods. N=8-9 mice per group. \* denotes significant differences between *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup>.

### **Figure 2. BS concentration in serum and liver of *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice under basal conditions.**

BS concentration in A) serum and B) liver. BS were quantified by recycling assay using 3- $\alpha$ -OH-steroid dehydrogenase, as described in Materials and Methods. N=4 mice per group. No statistical significance was found.

### **Figure 3. Hepatic expression and canalicular targeting of ABCC2 and ABCB11 in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice under basal conditions.**

A) ABCC2 and B) ABCB11 expression levels in homogenates, BCM and IM as well as the BCM/IM ratio (reflecting pericanalicular targeting). Western blot analysis was performed using antibodies against ABCC2 (EAG15) and ABCB11 (antiserum IW), C) Expression level of GAPDH in the liver and of DDPIV in the BCM (and IM) as markers of loading. BCM and IM were isolated from liver homogenates as described

in Materials and Methods. N=3 mice per group. \* denotes significant differences between *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup>.

**Figure 4. Bile formation and secretion in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice in response to TCA infusion.**

Changes in A) BS secretion, B) BS secretion until reaching the SRm, C) Bile flow, and D) GSH secretion during step-wise increasing doses of TCA infusion (1.25, 2.50 and 3.75  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot 100\text{ g}$  body weight). Inserts within the graphs represent the total secretory rate or total bile flow. Bile was collected during TCA infusion. Bile for GSH analysis was sampled in the first 10 minutes of each TCA infusion dose, while bile for BS assays was taken in the second 10 minutes of each TCA infusion dose. Analyses were performed as described in Materials and Methods. N=8-9 mice. \* denotes significant differences between *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup>.

**Figure 5. BS concentration in serum and liver and BS hepatobiliary targeting in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice after TCA infusion.**

BS concentration in A) serum, B) liver, and C) bile as well as the D) bile/(bile+liver) ratio. BS were measured by recycling assay using 3- $\alpha$ -OH-steroid dehydrogenase as described in Materials and Methods. N=3-4 mice per group for serum and liver, and N=8-9 mice per group for bile. \* denotes significant differences between *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup>.

**Figure 6. Hepatic expression and canalicular targeting of ABCC2 and ABCB11 in *Abcc2*<sup>+/-</sup> mice after TCA infusion.**

A) ABCC2 and B) ABCB11 expression levels in homogenates, BCM and IM as well as the BCM/IM ratio (reflecting pericanalicular targeting) in tissues collected after step-wise increasing doses of TCA. Western Blot analysis was performed using antibodies against ABCC2 (EAG15) and ABCB11 (antiserum IW). C) Expression level of GAPDH in the liver and of DDPIV in the BCM and IM as markers of loading. BCM (and IM) were isolated from liver homogenates as described in Materials and Methods. N= 3 mice per group. \* denotes significant differences between *Abcc2*<sup>+/-</sup> and *Abcc2*<sup>+/+</sup>.

**Figure 7. Hypothetical model of the potential mechanistic pathway linking ABCC2 and its expression level to the initiation of a cholestatic liver disease.**

Potentially cholestatic agents being taken up by the liver (step 1) are directed to the canalicular pole and, whether or not they are substrates for ABCC2 transport, bind to the ABCC2 allosteric binding site (step 2). This interaction leads ABCC2 to activate a canalicular Cl<sup>-</sup> channel (step 3), which could activate Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger<sup>61</sup> (step 4). Such a process is inducing cell volume and pH changes<sup>62</sup> (step 5), which, at a critical setpoint, reaches a level initiating the endocytosis of canalicular transporters<sup>5, 58, 63</sup> (step 6). Introgression of the canalicular transporters decreases secretory capacities and initiates the cholestatic response (step 7). This hypothetical scheme is initially dependent on ABCC2 activity, explaining why its absence can efficiently block the initiation of cholestasis<sup>21-26</sup>. This pathway also explains why the ABCC2

expression level has a significant impact on the tolerance threshold of hepatocytes to cholestatic agents (or at least TCA) because the increased ABCC2 level can activate more Cl channels, or activate them more quickly, and thereby lead more rapidly to the setpoint level of changes in cell volume or intracellular pH triggering the introgression of transporters. OA= organic anions.  $\Delta V$ = intracellular volume change.  $\Delta pH$ = pH change.

Figure 1

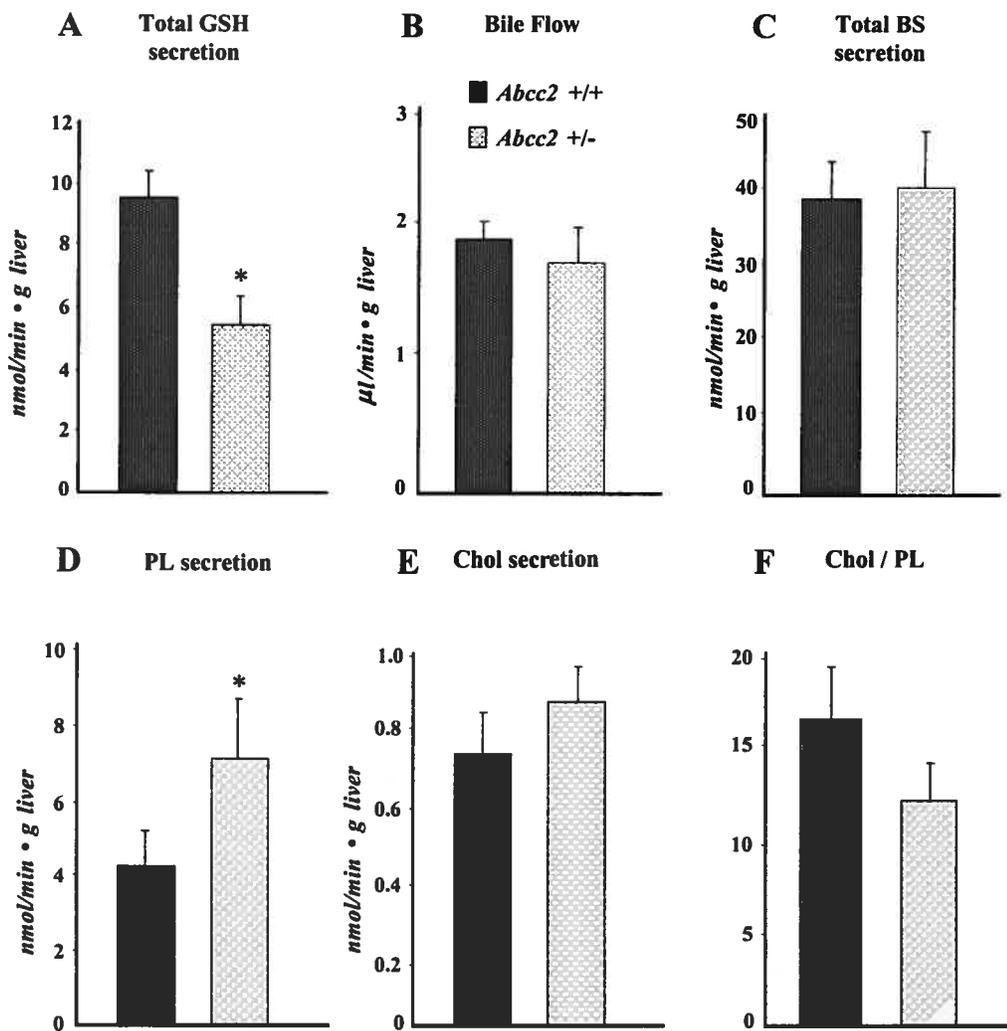


Figure 2

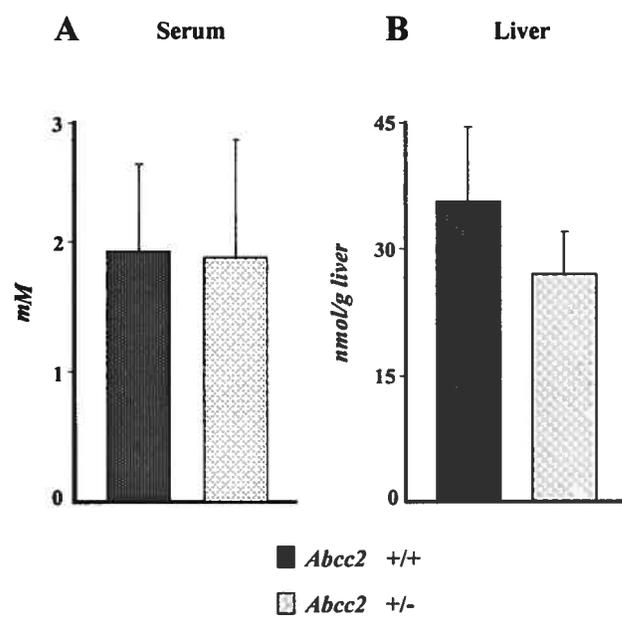


Figure 3

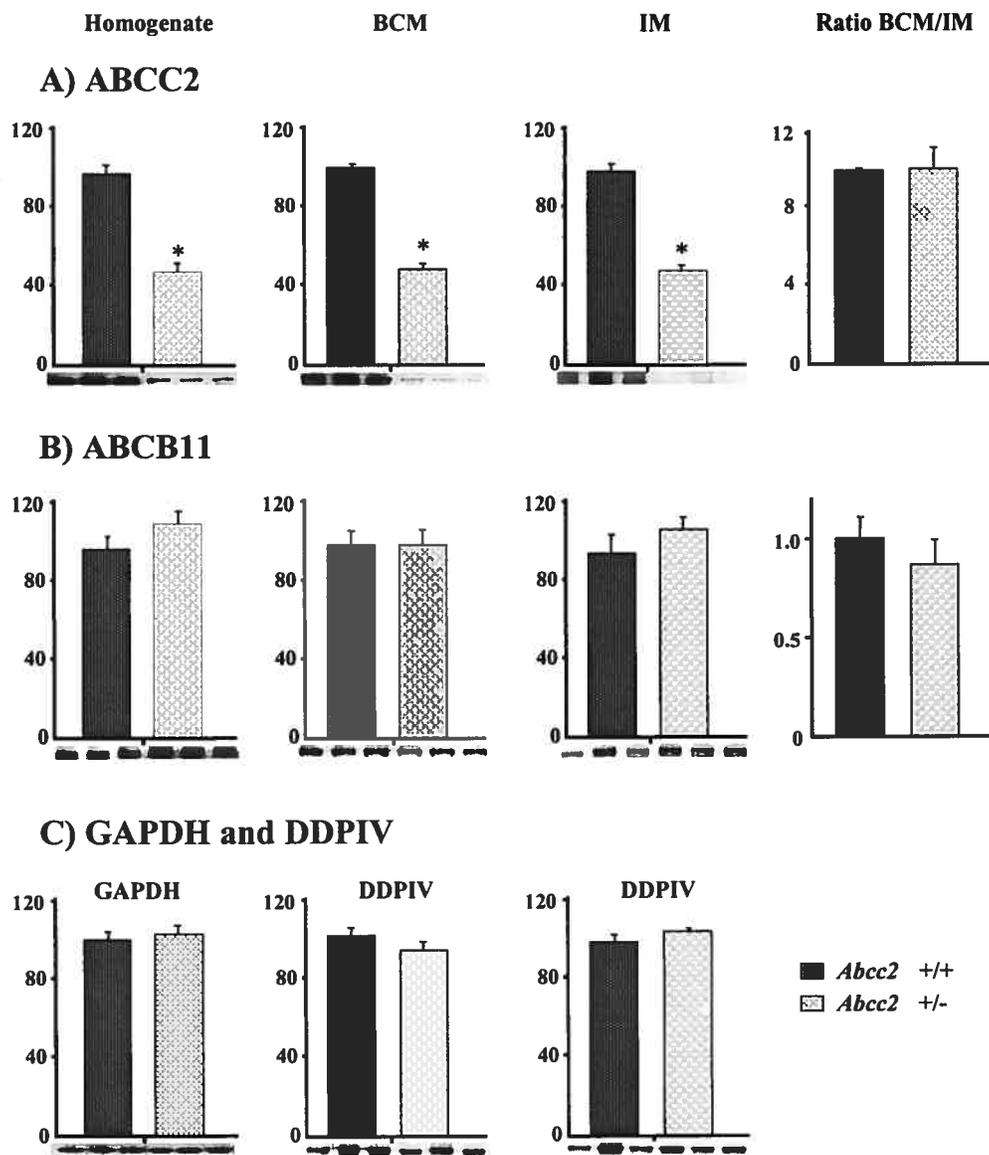


Figure 4

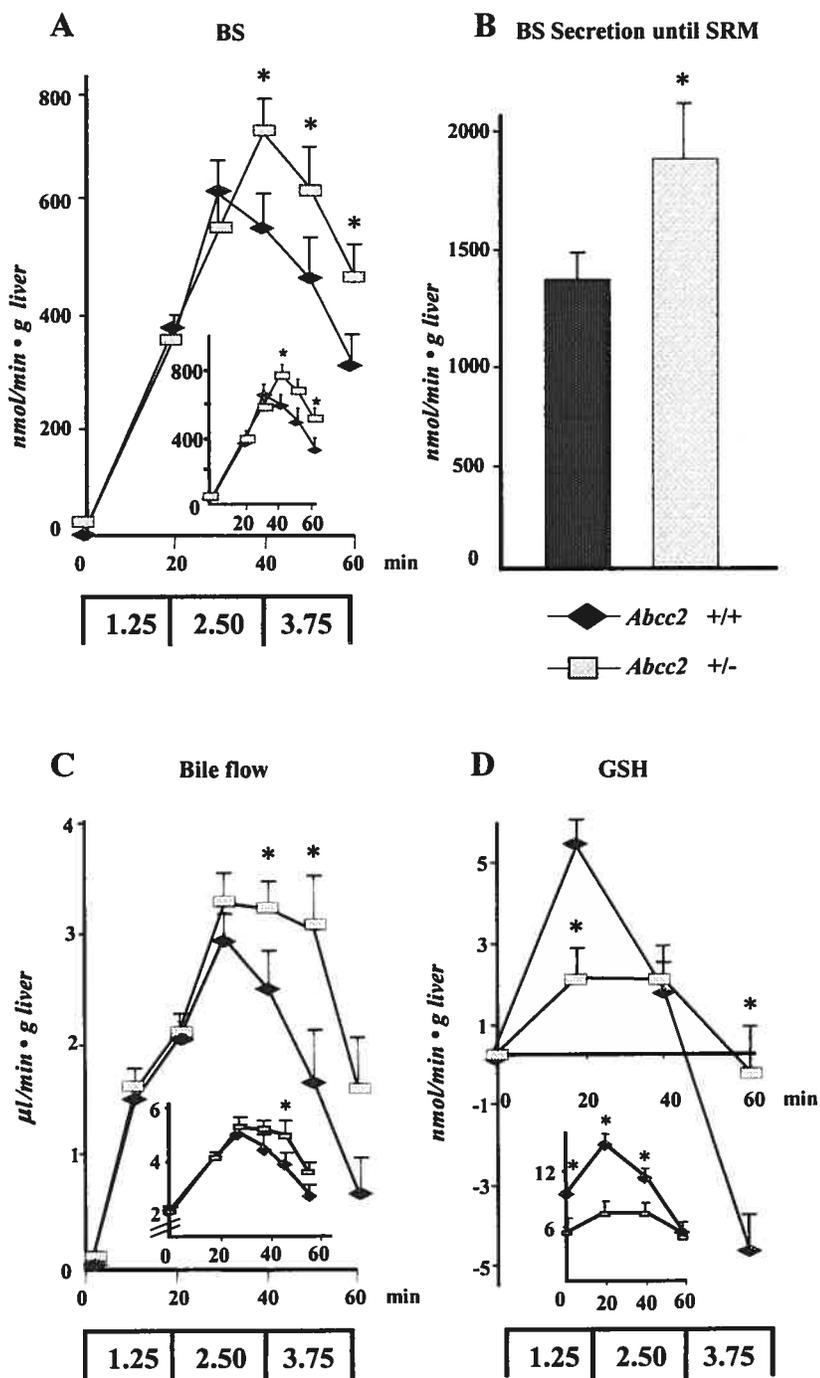


Figure 5

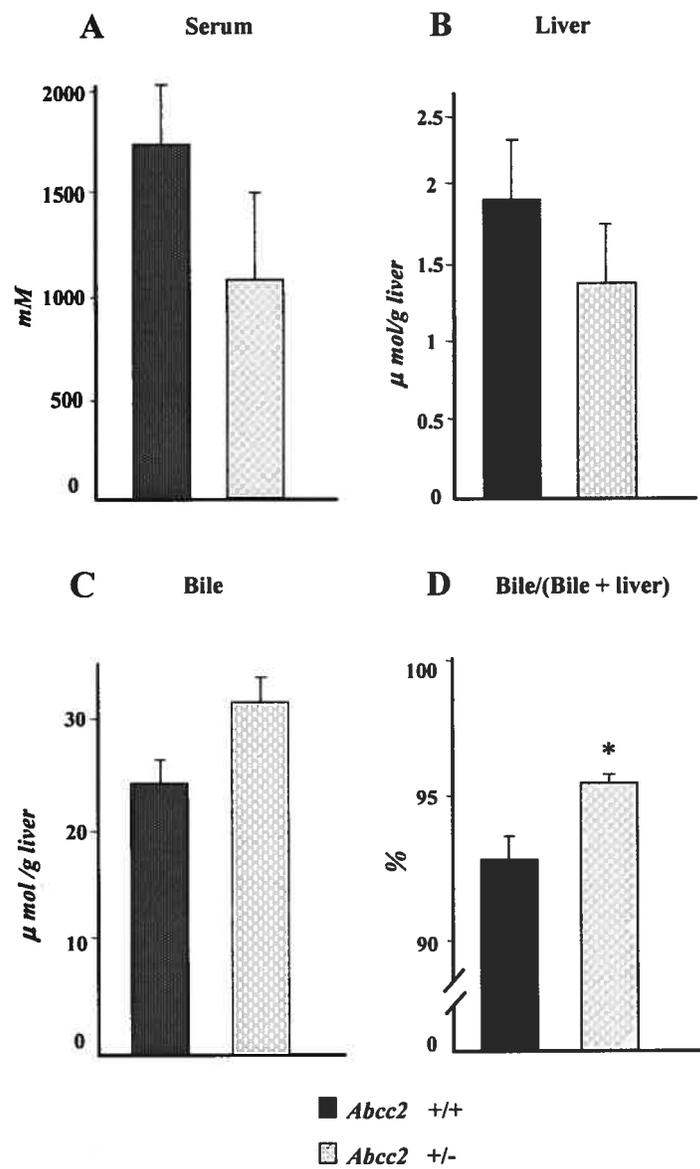
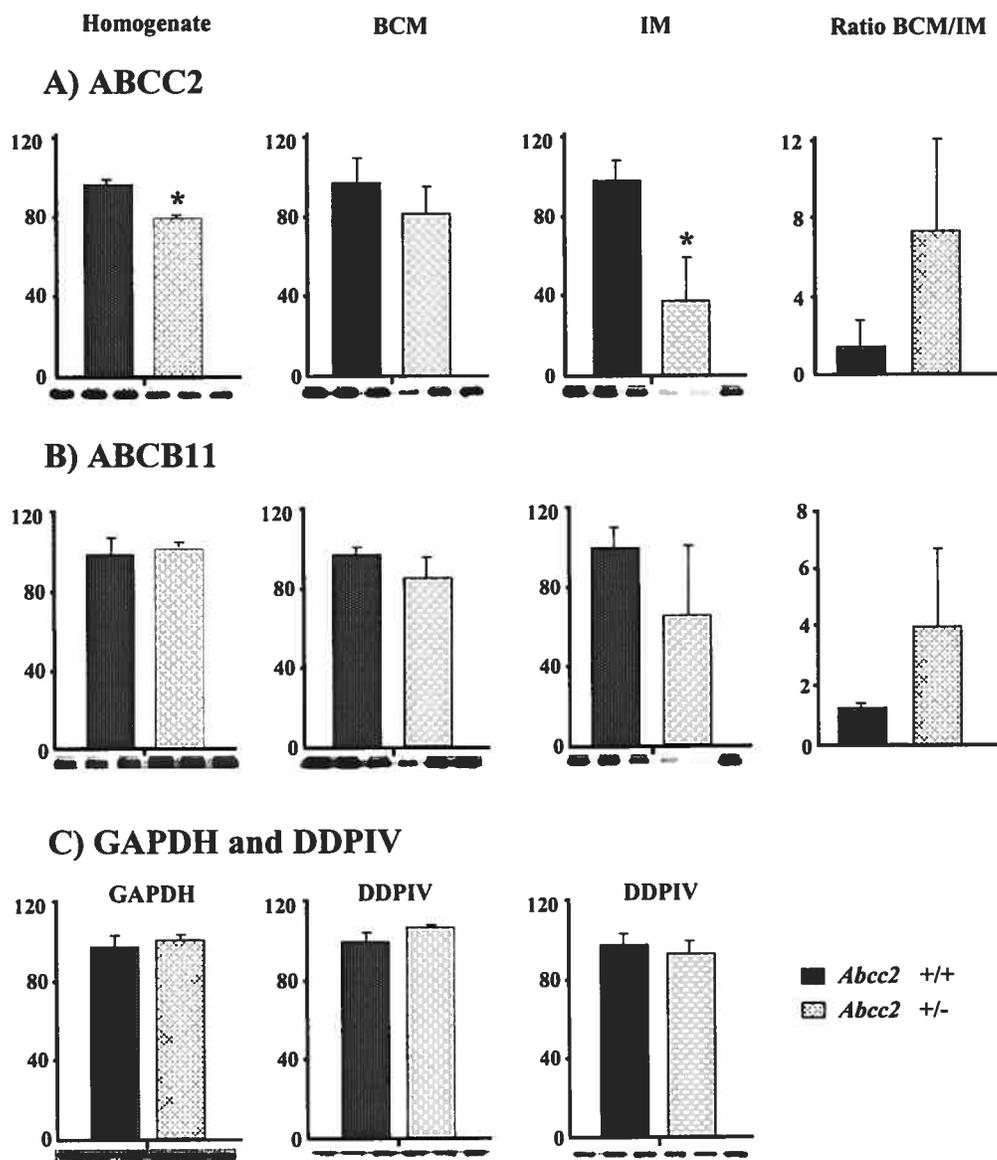


Figure 6





## CHAPITRE 3: Discussion

### 3.1 Introduction

La sécrétion biliaire est une fonction hépatique primordiale au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Une diminution ou un arrêt de la sécrétion biliaire s'accompagnant de dommages hépatiques caractérisent la cholestase intrahépatique (Crocenzi et *al*, 2004). Primaire ou secondaire, la cholestase est l'une des maladies hépatiques des plus communes et qui peut mener à de sévères conséquences, incluant la défaillance hépatique (Trauner et Boyer, 2003). Bien que certaines cholestases soient d'origine purement génétique, une large proportion de ces pathologies semble dépendante de l'interaction entre les gènes et l'environnement. Dans ces cas, les variantes génétiques (qui demeurent majoritairement à identifier) sont considérées comme étant capables de mener à une plus grande sensibilité aux facteurs environnementaux (Trauner et Boyer, 2003, Elantora et *al*, 2003 et Pauli-Magnus et *al*, 2004 et revue de littérature section 1.6.3). Les principaux facteurs environnementaux actuellement identifiés regroupent un large éventail de conditions, incluant des médicaments, des toxines, des composés alimentaires et des situations physiologiques particulières (exemple : grossesse) (Oude Elferink, 2003 et Trauner et Boyer, 2003). Bien que tous ces facteurs n'agissent probablement pas via un seul mécanisme, ils semblent tous perturber l'homéostasie des SB et induire une toxicité hépatique (Trauner et Boyer, 2003). Il est aussi notable que, dans les limites des connaissances actuelles, une intériorisation des transporteurs canaliculaires (et donc une diminution de leur capacité de transport à la bile) semble impliquée dans un grand nombre de cholestases acquises (Schmitt et *al*, 2000, Mottino et *al*, 2002, Crocenzi et *al*, 2003a, Trauner et *al*, 1998b, Kubitz et *al*, 1999), par un processus dont la régulation demeure particulièrement obscure. Toutefois, certains travaux supportent que le transporteur canaliculaire ABCC2/Abcc2 puisse être impliqué de manière significative dans le développement de la cholestase puisque son expression semble essentielle tant pour l'intériorisation des transporteurs que pour le développement de la cholestase dans plusieurs modèles expérimentaux (Crocenzi et

*al*, 2003a, Sano *et al*, 1993 et Huang *et al*, 2000). Des travaux antérieurs du laboratoire d'accueil ont de plus soulevé l'hypothèse que des variantes génétiques modifiant le niveau d'activité d'Abcc2 puissent être un déterminant génétique modulant la sensibilité à la cholestase (Bouchard *et al*, 2004). Contrairement à l'absence d'expression d'ABCC2, qui semble un rare phénomène chez l'humain (Hashimoto *et al*, 2002), de grandes variations dans le niveau d'expression et d'activité de cette protéine, régulée par de nombreux composés et démontrant un haut taux de polymorphismes génétiques, sont toutefois attendues (Hirouchi *et al*, 2004). Conséquemment, l'objectif de cette étude était d'évaluer si le niveau d'expression du transporteur Abcc2 affecte la sensibilité au développement de la cholestase intrahépatique lors d'une insulte exogène. Pour ce faire, nous avons participé à la construction d'un modèle de souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> et utilisé ce modèle afin d'étudier directement l'effet du niveau d'expression d'Abcc2 sur la cholestase intrahépatique expérimentalement induite par une infusion de doses élevées et croissantes de TC. Nos résultats démontrent clairement qu'Abcc2 module significativement la réponse à cet agent cholestatique et nous mènent à proposer une exploration du rôle d'ABCC2 dans la cholestase humaine, tout comme de nouveaux concepts mécanistes. Avant d'élaborer sur ces résultats, nous désirons toutefois initialement discuter de la validation de notre modèle expérimental ainsi que de l'impact du niveau d'expression d'Abcc2 sur la formation de la bile, un autre domaine qui demeurait quasi-inexploré.

### **3.1.1 Validation du modèle expérimental.**

Nous avons utilisé un modèle de souris chez lequel le gène d'*Abcc2* a été inactivé par l'élimination de 1kB du promoteur et de l'exon 1 et 2 (Bouchard *et al* en préparation, voir la figure 1 de l'annexe). Le suivi de la présence de l'allèle endogène ainsi que de l'allèle mutée ont été initialement effectués par buvardage de Southern puis par amplification PCR (Bouchard *et al*, en preparation, voir la figure 1 et 2 de l'annexe). Toutefois, afin de nous assurer que notre manipulation avait un impact réel sur le niveau d'expression d'Abcc2, nous avons suivi par buvardage de Western le niveau

d'expression d'*Abcc2* et démontré que la souris hétérozygote présente la moitié du niveau d'expression hépatique de la protéine sous étude (voir la figure 3 de l'article), validant ainsi l'efficacité de notre approche et la justesse de ce modèle pour répondre à notre question expérimentale.

Afin d'obtenir un reflet fonctionnel de la variation du niveau d'expression, nous avons aussi analysé la sécrétion biliaire du GSH, un composé sécrété dans la bile par *ABCC2/Abcc2* selon des constantes d'affinité supportant le rôle limitant de la protéine de transport (Paulusma et al, 1999). Tout comme pour le niveau d'expression, la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> démontre une sécrétion biliaire de GSHt correspondant à environ 50% de la souris sauvage (voir la figure 1 de l'article), un phénomène aussi précédemment rapporté dans l'étude antérieure examinant le rôle d'une hémi-expression d'*Abcc2* sur la fonction biliaire (effectuée chez le rat) (Paulusma et al, 1999). Bien que l'impact d'une hémi-expression puisse être variable selon les substrats d'*Abcc2*, nous pouvons ici valider que l'activité physiologique d'*Abcc2* semble réduite de manière parallèle au niveau d'expression de la protéine.

### **3.2 Effet du niveau d'expression d'*Abcc2* sur la formation de la bile et l'homéostasie (partielle) des SB en condition basale.**

Au meilleur de notre connaissance, une seule étude (Paulusma et al, 1999) a exploré et de manière très limitée (sécrétion biliaire du GSH et de la bilirubine), les conséquences d'une hémi-expression d'*Abcc2* sur la fonction biliaire. Notre travail permettait donc, dans un modèle murin (comparativement au travail précédent effectué chez le rat), de mieux définir le rôle de niveau d'expression d'*Abcc2* sur la formation de la bile. En addition au GSH (supra), nous nous sommes plus particulièrement concentrés à examiner l'impact sur la sécrétion de la bile (débit biliaire) ainsi que sur la sécrétion des principaux composés biliaires. Ces derniers sont reconnus comme étant impliqués dans les pathologies biliaires majeures, la cholestase et la cholélithiase, mais avec un focus particulier sur les SB et leur homéostasie. Étant donné la présence d'une certaine littérature sur l'impact de

l'absence d'expression d'*Abcc2* sur la formation de la bile, nous examinerons nos résultats en fonction de cette littérature, qui est toutefois principalement dérivée de la littérature chez le rat (rats EHBR, TR<sup>-</sup> et GY). En fait, lors de l'initiation de nos travaux, aucun modèle murin porteur d'un gène d'*Abcc2* invalidé n'était disponible. Toutefois, deux compagnies pharmaceutiques ont aussi développé un tel modèle et certaines publications ont récemment été présentées, établissant certaines bases de l'impact d'absence d'*Abcc2* chez la souris (Chu et al, 2006 et Nezasa et al, 2006).

### 3.2.1 Débit biliaire.

Dans notre étude, nous avons initialement remarqué que le niveau d'expression d'*Abcc2* n'affecte pas significativement le débit biliaire entre les souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> et *Abcc2*<sup>+/-</sup> malgré que celui de la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> soit légèrement plus faible (voir la figure 1 de l'article). Cette légère baisse du débit s'explique probablement par une diminution du débit biliaire indépendant des SB (DBISB), généré en grande partie via le GSH, composé dont la sécrétion biliaire est réduite de 50% chez la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup>. Un tel phénomène a déjà été proposé pour expliquer la quantité totale de bile formée chez le rat TR<sup>-</sup> et Wistar (Ballatori et Rebbeor, 1998). Plus précisément, ces recherches ont montré que les rats EHBR (Ji et al, 2002) et GY (Dijkstra et al, 1990) ont un débit biliaire correspondant à 40% du rat SD (diminution de 60%) et Wistar respectivement alors que le débit biliaire est diminué de 50% chez le rat TR<sup>-</sup> en comparaison au rat Wistar (Jansen et al, 1985), diminution qui a été associée à l'absence de sécrétion de GSH (environ 0.1-1% de la sécrétion du rat sauvage) (Takikawa et al, 1991 et Dijkstra et al, 1990). De plus, une étude récente ayant comme modèle une souris knock-out pour le gène *Abcc2* a constaté que le débit biliaire était diminué de 41% par rapport à celui de la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> (Nezasa et al, 2006). Ces recherches montrent que les rats et les souris *Abcc2*<sup>-/-</sup> ont une diminution semblable du débit biliaire par rapport aux animaux normaux avec peut-être un effet légèrement plus accentué chez le rat. Selon les données discutées, il semble possible que le débit biliaire dépendant du GSH contribue de manière légèrement moins

importante au flux biliaire total chez la souris que chez le rat. En fait, des variations dans les diverses composantes du flux biliaire sont observées entre les différentes espèces. Une plus grande fraction du débit biliaire est indépendante des SB chez le rat alors que chez l'humain, une plus grande proportion du débit biliaire est dépendante des SB (Hofmann, 1994). Ces variations peuvent en partie être associées aux taux de sécrétion des divers composés osmotiquement actifs tout comme au taux de dégradation biliaire du GSH (via la GGT) ainsi qu'au profil d'acide biliaire (Ballatori et Rebbeor, 1998 et Verkade et al, 1993). En considérant les résultats de l'étude chez la souris *Abcc2*<sup>-/-</sup>, une diminution de l'ordre de 20% chez la souris +/- aurait pu être attendue alors que nous avons obtenu une diminution de 10%. Étant donné le degré de variation dans la sécrétion basale entre les souris d'un même groupe, nos résultats nous semblent en fait globalement correspondre aux résultats attendus. Nous concluons donc que la présence d'*Abcc2* (et du GSH dans la bile), même réduite de 50%, permet à la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> d'avoir un débit biliaire normal ou presque normal contrairement aux rats et souris chez lesquels *Abcc2* a été inactivé.

### 3.2.2 Sécrétion des principaux lipides biliaires.

Nos résultats démontrent que le niveau d'expression d'*Abcc2* n'affecte pas la sécrétion biliaire des SB dans notre modèle de souris puisque aucune différence n'est retrouvée entre les souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> et *Abcc2*<sup>+/-</sup> (voir la figure 1 de l'article). Une telle observation n'est pas inattendue puisque les SB retrouvés en condition physiologique normale ne sont pas transportés par *Abcc2* (Akita et al, 2001). Nos résultats sont hautement compatibles à ceux retrouvés chez les patients atteints du SDJ (humain *ABCC2*<sup>-/-</sup>), lesquels montrent une excrétion normale des SB dans la bile (Oude Elferink et Groen, 2002). Ils sont aussi en accord avec les résultats obtenus chez la souris (bien qu'une tendance à la hausse non significative ait été observée chez la souris <sup>-/-</sup>) (Chu et al, 2006) et avec une large proportion des résultats obtenus chez le rat <sup>-/-</sup> (Verkade et al, 1993a et 1993b et Jansen et al, 1985). Notons toutefois que chez cette espèce, des résultats contradictoires sont retrouvés dans la littérature. Certaines recherches, incluant des travaux effectués avec la même

souche de rat, rapportent une légère diminution de la sécrétion des SB (Takikawa et al, 1991 et 1993, Hoshino et al, 1994 et Jansen et al, 1987). Il nous semble donc probable que la seule élimination de l'expression d'*Abcc2* ne cause pas de variation de la sécrétion des SB, mais puisse faciliter, en présence de facteurs à déterminer, une diminution de la sécrétion des SB. Nous concluons qu'en analogie avec une large proportion de la littérature obtenue en absence totale d'expression d'*Abcc2*, une diminution du niveau d'expression d'*Abcc2* n'a pas d'impact physiologique direct sur le taux de sécrétion basal des SB. Notons de plus que la composition du profil des SB dans la bile est aussi semblable entre les souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> et *Abcc2*<sup>+/-</sup> (voir la figure 3 de l'annexe), ce qui est tout à fait similaire aux données obtenues chez le rat GY (Verkade et al, 1993a).

Il est bien connu que la sécrétion des lipides biliaires (PL et Chol) semble, en conditions normales, couplée à celle des SB. Plusieurs AO<sup>-</sup>/GSH (directement ou via le DBISB) sont toutefois capables de produire un phénomène de «découplage» en inhibant la sécrétion biliaire des PL et du Chol sans altérer celle des SB (Verkade et al, 1993b). En fait, certaines des observations les plus intéressantes à l'égard de ce «découplage» ont été obtenues avec le modèle du rat n'exprimant pas *Abcc2*. Ces études ont montré que, contrairement aux rats exprimant *Abcc2*, les rats *Abcc2*<sup>-/-</sup> démontraient une absence de découplage de la sécrétion des lipides biliaires de celle des SB (ou un léger effet) suite à l'administration exogène de certains AO<sup>-</sup> qui seraient normalement sécrétés dans la bile par *Abcc2* (Takikawa et al, 1993 et Verkade et al, 1990). Cela a été interprété comme supportant l'hypothèse d'une action inhibitrice des AO<sup>-</sup> dans les voies biliaires. Il a été suggéré que les AO<sup>-</sup>/GSH aient une interaction avec les SB, une fois sécrétés dans la bile, empêchant ces derniers de stimuler la libération des PL et du Chol de leurs transporteurs respectifs, limitant ainsi la vitesse de transport (Verkade et al, 1990).

Dans notre modèle, nous avons observé que le niveau d'expression d'*Abcc2* influence la sécrétion biliaire des PL et légèrement la sécrétion du Chol par une augmentation significative de la sécrétion des PL et par une tendance à

l'augmentation de la sécrétion du Chol chez la souris hétérozygote (voir la figure 1 de l'article). Cette différence peut probablement s'expliquer par le phénomène de découplage de la sécrétion du Chol et des PL de celle de la sécrétion des SB. En effet, la sécrétion biliaire de la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> contient une concentration plus faible en  $\text{AO}^-/\text{GSH}$  que la bile de la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup>, ce qui pourrait limiter leur interférence avec l'action proposée des SB dans la lumière canaliculaire. Cette hypothèse nous semble aussi supportée par nos observations suggérant une expression hépatique inchangée des transporteurs du Chol (anticorps contre *Abcg8*) et des PL (anticorps C219 contre *Abcb4*, *Abcb1* et *Abcb11*) au sein de nos deux groupes (voir la figure 4 de l'annexe). Cependant, à cause du manque de spécificité de l'anticorps C219, on ne peut conclure avec certitude que les deux groupes expriment la même quantité d'*Abcb4* à la membrane canaliculaire. Nous aimerions mentionner que des résultats analogues à ceux obtenus dans notre étude ont aussi été observés dans le modèle du rat n'exprimant pas *Abcc2*. Ainsi, une sécrétion biliaire similaire de Chol et de SB mais une sécrétion biliaire de PL significativement plus élevée chez le rat GY comparativement au rat contrôle ont été remarqués (Verkade et al, 1993b). Ce phénomène n'a toutefois pas été observé chez les rats EHBR (Takikawa et al, 1993). Il pourrait être possible que la présence d'autres  $\text{AO}^-$  (sécrétés par un transporteur autre qu'*Abcc2*) puisse être ici impliquée. Nous concluons donc que le niveau d'expression d'*Abcc2* est suffisant pour moduler le couplage entre les PL (ainsi que du Chol dans une moindre mesure) et les SB. Sur la base des résultats obtenus chez le rat EHBR, nous désirons toutefois aussi conclure que ce phénomène peut probablement être minimisé par des conditions physiologiques actuellement non contrôlées, dont potentiellement la présence d' $\text{AO}^-$  qui ne sont pas sécrétés par *Abcc2*.

### 3.2.3 Concentration hépatique et sérique des SB

En homologie avec les résultats biliaires, le niveau d'expression d'*Abcc2* n'altère pas l'homéostasie des SB, évalué par la teneur sérique et hépatique de ces derniers dans

des conditions de base (voir la figure 2 de l'article). En accord avec nos résultats, le niveau des SB endogènes dans le sérum est normal chez les patients atteints du SDJ (Oude Elferink et Groen, 2002). De plus, l'étude chez la souris knock-out pour le gène *Abcc2* a rapporté qu'aucune différence significative avec la souris contrôle n'est trouvée au niveau des SB sériques (Chu et *al*, 2006). Contrairement à ces résultats, certains travaux effectués chez les rats GY et EHBR supportent une légère élévation des SB sériques (Kuipers et *al*, 1988, Takikawa et *al*, 1991). Il est donc intéressant de noter une concordance plus importante entre la souris et l'humain sur ce paramètre. Aucune publication ne semble, au meilleur de nos connaissances, avoir exploré le rôle d'*Abcc2* sur le teneur hépatique des SB.

### **3.2.4 Expression et localisation intracellulaire de transporteurs canaliculaires**

En fonction de l'importance du niveau d'expression et de la localisation intracellulaire des transporteurs canaliculaires dans la détermination de leur capacité de transport, nous avons suivi le niveau d'expression global, mais aussi la distribution canaliculaire et péricanaliculaire d'*Abcc2* et d'*Abcb11* (le principal transporteur des SB), reflet de la disponibilité des transporteurs qui est régulée par son ciblage/intériorisation des/vers les vésicules péricanaliculaires (Crocenzi et *al*, 2004 et section 1.5.2 de la revue de littérature). Nous avons observé que le niveau d'expression d'*Abcc2* ne module pas le ciblage péricanaliculaire/canaliculaire. La moitié du niveau d'expression normal d'*Abcc2* est retrouvée tant dans les BCM que les IM (leur ratio demeurant identique à celui observé chez la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup>) (voir la figure 3 de l'article). Nous avons de plus observé, en concordance avec nos résultats physiologiques ci-dessus exprimés, que le niveau d'expression d'*Abcc2* ne modifie pas le niveau d'expression d'*Abcb11* (dans un homogénat) ni sa localisation au niveau des BCM et des IM du foie. Une seule autre étude a aussi montré un niveau d'expression hépatique d'*Abcb11* identique chez les souris knock-out pour *Abcc2* et contrôles (Nezasa et *al*, 2006).

En résumé, nous avons démontré qu'une variation de 50% du niveau d'expression d'*Abcc2* ne perturbe pas l'homéostasie des AB et ne s'associe pas au développement de pathologie hépatique. Toutefois, nous avons observé qu'une variation dans le niveau d'expression d'*Abcc2* était associée à un changement proportionnel de la sécrétion biliaire du GSH et à une modulation significative du couplage des lipides biliaires, particulièrement via une régulation du taux de sécrétion biliaire des PL. Bien que n'étant pas hépatotoxiques, les conséquences de ces variations pourraient avoir des impacts physiologiques, les variations du taux de GSH modulant le niveau d'antioxydants délivrés dans la lumière intestinale alors que les variations des niveaux de PL biliaires affectent la solubilisation maximale du Chol dans la bile. Il demeure toutefois à explorer si ces variations sont suffisamment importantes pour mener à des conséquences pathophysiologiques néfastes.

### **3.3 Effet du niveau d'expression d'*Abcc2* sur la réponse à l'infusion de TC et la sensibilité au développement de la cholestase intrahépatique.**

#### **3.3.1 Réponse hépatobiliaire.**

Afin de vérifier notre hypothèse principale, c'est-à-dire que le niveau d'expression d'*Abcc2* peut influencer la susceptibilité à développer une cholestase intrahépatique lors d'une insulte exogène, nous avons soumis nos souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> et *Abcc2*<sup>+/-</sup> à une infusion de doses croissantes de TC. Ce modèle de cholestase est très bien caractérisé comme étant capable de stimuler initialement le débit biliaire et la sécrétion des SB (cholérèse) jusqu'au taux de sécrétion maximum (SRM). Contrairement aux autres AO<sup>-</sup> qui démontrent alors une sécrétion soutenue, le débit biliaire ainsi que la sécrétion des SB ne peuvent être maintenus et la diminution du débit biliaire et de la capacité sécrétoire en résulte, causant rapidement une toxicité hépatique (cholestase). Ce modèle a souvent été utilisé chez le rat (Kitani et Kanai, 1982, Barnwell et al, 1987 et Fukumoto et al, 1994) et permet d'établir en une seule manipulation le degré de sensibilité du foie à la cholestase. Nous avons choisi d'infuser trois doses croissantes de TC.

À la plus faible dose de TC, l'administration du SB induit une stimulation rapide du taux de sécrétion biliaire des SB ainsi que des composés classiquement associés avec cette stimulation (débit biliaire, sécrétion des lipides et du GSH biliaire) (voir la figure 4 de l'article et la figure 5 de l'annexe). De la même façon que chez le rat n'exprimant pas *Abcc2* (rat EHBR) (Takikawa et al, 1991, Hoshino et al, 1994), le niveau de sécrétion des SB ainsi que leur effet cholérétique semblent totalement indépendants du niveau d'expression d'*Abcc2*. L'augmentation du débit biliaire et du taux de sécrétion biliaire des SB et du débit biliaire est en effet similaire entre nos deux groupes de souris.

L'infusion de la dose intermédiaire de TC a produit, tel qu'attendu, l'atteinte du SRM chez la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> et initié une inhibition de la sécrétion des SB ainsi que de la sécrétion biliaire de tous les composés étudiés (voir la figure 4 de l'article). Le débit biliaire initie aussi une chute évidente. En clair contraste, la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> a poursuivi une augmentation linéaire de sa sécrétion de SB, atteignant un niveau significativement plus élevé que la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup>. Nous pouvons donc conclure que le niveau d'expression d'*Abcc2* a un impact significatif sur la réponse cholestatique au TC, puisque seule la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> démontre l'atteinte du SRM et une inhibition de sa fonction biliaire.

Nous avons toutefois poursuivi l'expérience en administrant de façon continue une dose plus importante de TC. La souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> a, dans ces conditions, démontré la réponse classique (voir la figure 4 de l'article) observée chez le rat (Kitani et Kanai, 1982, Barnwell et al, 1987 et Fukumoto et al, 1994), c'est-à-dire une inhibition de plus en plus importante de sa sécrétion biliaire. L'augmentation de la dose chez la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> a, cette fois, mené à l'établissement de la cholestase, qui se développa à ce point à un rythme similaire à celui observé chez la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> (pente de la diminution similaire).

À la fin de l'infusion, le foie de la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> a sécrété plus de SB dans la bile que celui de la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup>. De plus, la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> a tendance à avoir une concentration de SB sérique et hépatique plus faible que la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup>. Le ratio bile/ (bile + foie), représentant le ciblage des SB dans la bile, indique aussi que la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> a une meilleure sécrétion des SB dans la bile (voir la figure 5 de l'article). Ces résultats démontrent aussi que le niveau d'expression d'*Abcc2* affecte la distribution des SB et suggèrent que la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> ait une meilleure capacité de sécrétion (détoxication) et un meilleur ciblage des SB vers la bile que la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> après l'infusion de TC.

Nous concluons donc que, dans notre modèle, le niveau d'expression d'*Abcc2* n'est pas un déterminant du développement ou non de la cholestase, mais bien de la capacité de résistance du foie à notre insulte exogène. Ainsi, la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> atteint un SRM à une dose plus élevée de TC et à un temps d'infusion plus long. Elle maintient aussi plus longtemps sa sécrétion maximale des SB avant que la cholestase ne se développe. Clairement, la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> est résistante à la cholestase à la dose qui déclenche le processus cholestatique chez la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup>, mais développe la même pathologie à une dose plus élevée de TC. Nous avons donc démontré que, dans nos conditions, le niveau d'expression d'*Abcc2* module la sensibilité à laquelle le foie ne peut maintenir une sécrétion biliaire normale et initie un processus cholestatique.

Ces résultats sont en fait très différents de travaux ayant exploré la sensibilité à la cholestase chez des rats (aucune étude chez la souris à ce jour) n'exprimant pas *Abcc2*. En effet, dans le modèle du foie isolé et perfusé de rat, une infusion dans des doses croissantes de TC (0.11 à 0.33  $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g foie}$ ) a été appliquée résultant en l'atteinte d'un plateau pour le débit biliaire et la sécrétion biliaire des SB chez le rat EHBR alors que chez le rat contrôle, ces paramètres commencent à diminuer indiquant le début de la cholestase (Hoshino et al, 1994). Dans ce même article, une autre cholestase est induite *in vivo* avec l'administration de TCDCA (0.22  $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g foie}$ ), résultant en une cholestase chez les rats contrôles (*Abcc2*<sup>+/+</sup>) alors que les rats EHBR (*Abcc2*<sup>-/-</sup>) atteignent encore un plateau (Hoshino et al, 1994). Cette étude

supporte en fait que l'absence d'*Abcc2* semble protéger de la cholestase et, conséquemment, que la présence d'*Abcc2* puisse être essentielle au développement de la cholestase. Plusieurs études ont aussi rapporté une résistance à la cholestase induite par d'autres agents, incluant une dose cholestatique d'E<sub>2</sub>17G chez les rats contrôles (Sano *et al*, 1993, Huang *et al*, 2000, Crocenzi *et al*, 2003a). En accord avec ces études chez le rat, notre modèle de souris exprimant 100% d'*Abcc2* atteint la cholestase plus rapidement et à des doses plus faibles de TC que la souris exprimant 50% du niveau normal d'*Abcc2* (voir la figure 4 de l'article). Contrairement au rat EHBR où *Abcc2* est absent, le débit biliaire et le taux de sécrétion biliaire des SB de notre souris, exprimant 50% du niveau normal d'*Abcc2*, n'atteignent toutefois pas un plateau et diminuent de la même façon que la souris exprimant 100% d'*Abcc2*, mais à des doses plus élevées de TC. La grande différence entre le modèle de rat et notre modèle de souris est que le rat n'exprime pas *Abcc2* alors que notre souris exprime 50% du niveau normal d'*Abcc2*. Donc, même une diminution importante du niveau d'expression d'*Abcc2* de 50% ne permet pas d'atteindre le plateau, comme chez les rats EHBR, et ne peut prévenir la cholestase. Puisque le rat n'exprimant pas *Abcc2* peut être totalement résistant à la cholestase et puisque que la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> est plus résistante que la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup>, mais développe tout de même une cholestase, nous aimerions suggérer que la présence d'*Abcc2* soit nécessaire au développement de la cholestase avec les agents explorés et que son niveau d'expression soit aussi un déterminant majeur de la sensibilité du foie au développement de la cholestase. Plus précisément, nous proposons que le niveau d'expression d'*Abcc2* puisse influencer la dose (ou la concentration) à laquelle un agent au potentiel cholestatique induira la pathologie et donc, la capacité du foie à maintenir une fonction biliaire optimale (et une détoxification) en présence d'une surcharge exogène d'un agent cholestatique (TC).

Il nous semble ici toutefois important de noter qu'une autre étude, utilisant aussi le modèle EHBR, a trouvé une réponse différente à une surcharge en SB. Ainsi, une infusion en doses croissantes de TC résulte en une légère diminution du débit biliaire et de la sécrétion biliaire des SB en fin d'infusion chez le rat EHBR (Takikawa *et al*,

1991). Cependant, il est à noter que la marge d'erreur entre les animaux EHBR est très élevée rendant les résultats discutables. De plus, le rat EHBR possède un niveau de bilirubine sérique beaucoup plus élevé que celui retrouvé chez le rat contrôle et chez les rats TR. Cela cause une accumulation de bilirubine et d'autres AO<sup>-</sup> dans le foie du rat EHBR, menant à un dommage et à un foie légèrement cholestatique (Takikawa et al, 1991). Ce fait pourrait expliquer pourquoi dans cette étude, le rat EHBR est un peu moins tolérant que le rat contrôle à une surcharge en SB. Ensemble, ces résultats pourraient supporter qu'Abcc2 ait un rôle plus primordial à jouer dans le développement de la cholestase dans un foie initialement en santé.

Lors de notre revue de littérature, nous avons établi que l'intériorisation des transporteurs canaliculaires s'associe au développement de la cholestase via une diminution de la capacité de transport. Ce mécanisme de régulation s'effectue suivant un délai à court terme. L'intériorisation des transporteurs canaliculaires et/ou leur rétention dans les vésicules péricanaliculaires est considérée comme un mécanisme majeur impliqué dans l'initiation et le maintien de la cholestase (Crocenzi et al, 2004). Plusieurs études utilisant divers modèles, tels que l'E<sub>2</sub>17G (Mottino et al, 2002 et 2005 et Crocenzi et al, 2003a), les endotoxines (Vos et al, 1998 et Kubitz et al, 1999), la phalloïdine (Rost et al, 1999), le TLCA (Beuers et al, 2001 et Crocenzi et al, 2003b) et l'hyperosmolarité (Schmitt et al, 2001 et Kubitz et al, 1997), ont observé le mouvement d'intériorisation des transporteurs canaliculaires, ABCC2 et ABCB11 dans les vésicules péricanaliculaires lors de la cholestase. De manière intéressante, une étude a démontré que la résistance à la cholestase chez le rat EHBR (modèle E17G) s'associe aussi à une inhibition de l'intériorisation (ou de l'arrêt de l'insertion) d'Abcb11 (Crocenzi et al, 2003a). Ceci supporte en fait qu'Abcc2 puisse avoir un rôle déterminant à jouer dans l'initiation de l'intériorisation des transporteurs, une voie qui, tel que mentionné, semble relativement commune à plusieurs agents cholestatiques. En assumant un tel rôle d'Abcc2, nous avons émis l'hypothèse que son niveau d'expression aurait un impact direct sur le ciblage péricanaliculaire en condition de stress avec un agent cholestatique.

### 3.3.2 Expression hépatique et ciblage canaliculaire d'Abcc2 et d'Abcb11.

Nous avons précédemment discuté que le ciblage canaliculaire d'Abcc2 et d'Abcb11 n'était pas modifié par le niveau d'expression d'Abcc2 en condition basale. Nous avons ensuite suivi l'effet du niveau d'expression d'Abcc2 sur le mouvement péricanaliculaire des transporteurs Abcc2 et Abcb11 dans notre modèle de cholestase, à la fin de la période d'infusion (voir la figure 6 de l'article). Pour ce faire, nous avons observé le niveau d'expression relatif dans les BCM et les IM et utilisé le ratio BCM/IM tel un reflet du ciblage péricanaliculaire.

Nous avons observé que le niveau d'expression d'Abcc2 semble influencer de manière importante le ciblage canaliculaire des deux transporteurs étudiés, le ratio BCM/IM étant 7 et 4 fois plus élevé chez la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> que la souris sauvage pour Abcc2 et Abcb11 respectivement. Donc, le niveau d'expression d'Abcc2 perturbe la régulation des transporteurs canaliculaires (Abcc2 et Abcb11) en modulant le transport péricanaliculaire de manière plus importante lorsque le niveau d'expression d'Abcc2 est élevé. En fonction des limites de notre devis expérimental, qui ne nous permet pas de comparer directement les variations entre les conditions basales et celles obtenues à la fin de l'infusion, nous ne pouvons pas établir clairement si les changements de ce ratio ou ciblage sont le reflet d'une intériorisation accrue ou d'une diminution de l'insertion dans la membrane. Par contre, nous pouvons conclure que cette perturbation du transport péricanaliculaire semble démontrer une certaine spécificité, le ratio BCM/IM d'une autre protéine (DDPIV) localisée sur la membrane canaliculaire demeurant identique entre nos groupes (voir la figure 6 de l'article).

Nous croyons toutefois que nos résultats supportent une intériorisation importante, qui est beaucoup plus accentuée chez la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup>. Nous basons cette interprétation sur l'observation qu'après l'infusion au TC, la quantité relative de transporteur Abcc2 exprimé dans l'homogénat et dans les BCM est similaire dans les deux groupes (rappelons qu'en condition de base la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> en exprimait la

moitié). De plus, la différence du niveau relatif d'expression d'*Abcc2* dans les IM augmente entre les deux groupes à la fin de l'infusion au TC, montrant que la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> a une quantité d'*Abcc2* à la hausse dans les IM. La diminution de l'écart dans la quantité relative de transporteurs *Abcc2* pourrait s'expliquer par deux mécanismes distincts. Premièrement, par la synthèse de nouveaux transporteurs *Abcc2* chez la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> mais cela nous semble peu plausible puisqu'il s'agit d'un mécanisme de régulation à long terme et que la cholestase est induite de façon aiguë. Le deuxième mécanisme, que nous privilégions, pourrait être une dégradation d'*Abcc2* chez la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup>, menant à une quantité hépatique semblable à la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup>. En fonction des taux beaucoup plus élevés d'*Abcc2* dans la fraction IM chez la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup>, nous aimerions proposer que le niveau d'intériorisation soit beaucoup plus élevé chez la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> et que ce dernier mène à une voie de dégradation. Cette dégradation pourrait signifier que la cholestase de la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> est beaucoup plus sévère que celle de la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup>. Cependant, au meilleur de notre connaissance, rien n'est connu au sujet de la dégradation des transporteurs lors de la cholestase.

Bien que les connaissances sur les modes de régulation du transport péricanaliculaire demeurent extrêmement limitées, certaines protéines ont été démontrées comme étant des molécules clés dans la régulation du transport péricanaliculaire pour les transporteurs étudiés. Dans le cas d'*Abcb11*, la protéine HAX-1 a été proposée jouer un rôle important dans l'endocytose d'*Abcb11* (Ortiz et al, 2004). Des résultats préliminaires dans notre modèle de souris montrent que la quantité de protéine HAX-1 est similaire dans le foie (homogénat), les BCM et les IM entre nos deux groupes, tant en conditions basales que suite à l'infusion de TC (voir la figure 6 de l'annexe). Nous ne trouvons donc aucune évidence que le niveau d'expression d'*Abcc2* affecte HAX-1, ce qui nous mène à suggérer qu'une différence dans *Hax-1* ne soit pas une cause impliquée dans l'intériorisation d'*Abcb11* dans notre modèle. Dans le cas d'*Abcc2*, une protéine a aussi été identifiée comme étant essentielle à l'ancrage d'*Abcc2* à la membrane canaliculaire, son absence résultant aussi en une absence d'expression d'*Abcc2* sur la membrane (Kikuchi et al, 2002). Cette protéine est la

radixine. Des analyses préliminaires avec un anticorps détectant le complexe ERM (comprenant la radixine) par transfert Western montrent que le niveau d'expression d'*Abcc2* n'affecte pas l'expression de ce complexe dans des conditions physiologiques basales. En fait, nos deux groupes de souris expriment une quantité semblable de protéines ERM dans leur foie, tant au niveau de l'homogénat que dans les fractions BCM et IM (voir la figure 7 de l'annexe). Cependant, après l'infusion de TC, la quantité d'ERM est deux fois plus élevée dans l'homogénat du foie de la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> que dans celui de la souris *Abcc2*<sup>+/-</sup> (voir la figure 7 de l'annexe). Cette distribution est aussi maintenue dans les BCM et IM. En assumant encore une fois que notre protocole est de trop courte durée pour une synthèse protéique importante, nous pourrions proposer que ces résultats supportent que certaines protéines du complexe ERM soient dégradées chez la souris exprimant initialement moins d'*Abcc2* en présence d'une surcharge en TC. En fonction des connaissances actuelles, cette observation est difficilement conciliable avec nos résultats, qui nous portaient à considérer qu'une diminution de la radixine chez le groupe exprimant initialement une plus grande quantité d'*Abcc2* pourrait être impliquée (diminution de la radixine menant à un retrait de la membrane). Ces résultats devront être confirmés mais nous laissent croire que nos connaissances actuelles sur la radixine et son interaction avec le ciblage péricanaliculaire d'*Abcc2* pourraient être plus complexes que celles identifiées. Toutefois, le changement majeur observé au cours de la réponse à notre agent cholestatique entre nos souris exprimant initialement différents niveaux d'*Abcc2* nous porte à proposer que des études plus approfondies sur la relation entre la radixine et *Abcc2* lors de stress cholestatique pourraient se révéler très intéressantes au niveau de la compréhension de mécanismes impliqués dans la régulation péricanaliculaire du mouvement des transporteurs.

En résumé, nous croyons avoir clairement établi que le niveau d'expression d'*Abcc2* contrôle la sensibilité à la cholestase induite par le TC, un haut niveau d'expression précipitant le développement de la cholestase. Nos résultats supportent aussi que cette modulation du niveau de sensibilité à l'agent cholestatique soit associée à une régulation différentielle, dépendante du niveau d'expression d'*Abcc2*, du mouvement

péricanaliculaire menant à l'intériorisation des transporteurs canaliculaires. Étant donné le rôle majeur de l'intériorisation des transporteurs canaliculaires dans un large nombre de modèles cholestatiques, il nous semble plausible qu'Abcc2 puisse aussi moduler le seuil cholestatique de plusieurs autres composés. Il nous paraît donc particulièrement important de poursuivre ces travaux afin de mieux comprendre comment Abcc2 pourrait moduler le seuil cholestatique de composés qu'il ne transporte pas et contrôler son propre mouvement péricanaliculaire mais aussi celui d'autres transporteurs. Nous aimerions toutefois conclure en proposant une hypothèse mécaniste qui permettrait d'expliquer le rôle de régulateur clé d'Abcc2 dans l'initiation de la cholestase.

### **3.4 Proposition de mécanismes potentiels pour expliquer le rôle du niveau d'expression d'Abcc2 dans la sensibilité au développement de la cholestase.**

Nous avons antérieurement discuté que les rats TR<sup>-</sup> ne développent pas la cholestase induite par l'E<sub>2</sub>17G comparativement aux rats contrôles, même à des doses très élevées qui permettent à ces rats d'avoir une concentration biliaire d'E<sub>2</sub>17G égale à celle des rats contrôles (Huang et al, 2000). Ces résultats suggèrent qu'une interaction entre l'E<sub>2</sub>17G et le transporteur Abcc2 soit nécessaire au niveau de l'hépatocyte dans le développement de la cholestase. Ce travail nous semble particulièrement important puisqu'il discrédite la possibilité d'un rôle indirect d'Abcc2, associé à la cinétique de transport de substrats (composé qui doit se retrouver dans l'espace biliaire pour exercer son action cholestatique). En fait, nous avons délibérément choisi d'utiliser un agent cholestatique qui n'est pas transporté dans la bile par Abcc2 afin de minimiser toute contribution cinétique au processus étudié. Sur la base de ces observations et de nos résultats, la question principale qui émerge est : comment Abcc2, et particulièrement son niveau d'expression, peut-il contrôler le développement de la cholestase et le moment (la dose) auquel le foie ne peut soutenir une réponse normale en présence d'un agent au potentiel cholestatique ? La réponse demeure inconnue mais, en fonction de nos résultats supportant un rôle de niveau d'expression d'Abcc2 dans la régulation du ciblage péricanaliculaire et de la

littérature soutenant que des perturbations de ce ciblage contribuent de manière importante au développement de la cholestase induite par une large gamme de composés cholestatiques, elle nous semble particulièrement importante. Sur la base de la littérature existante, nous tenterons ici d'élaborer une hypothèse sur le mécanisme potentiel impliqué.

#### **3.4.1 Considération 1 : Abcc2 possède différents sites de liaison.**

Plusieurs recherches ont examiné les sites d'interactions de certains substrats avec Abcc2 (Gerk et *al*, 2003, Evers et *al*, 2000, Zelcer et *al*, 2003). Les recherches de Zelcer proposent qu'Abcc2 contienne deux sites de liaison, un pour le transport du substrat et un site allostérique qui régule l'affinité du site de transport (par un changement de conformation) pour le substrat (Zelcer et *al*, 2003). Evers et ses collègues ont proposé qu'Abcc2 possède deux sites de liaison, un de haute affinité pour le GSH et de faible affinité pour des médicaments et un autre site de haute affinité pour les médicaments (sulfinpyrazone et indométacine) et de faible affinité pour le GSH (Evers et *al*, 2000). D'autre part, une étude a trouvé que l'E<sub>2</sub>17G lie deux sites spécifiques sur Abcc2, un site de transport et un site allostérique (concentration élevée) qui module son propre transport vers la bile et peut-être d'autres substrats tel que l'E<sub>2</sub>3G (Gerk et *al*, 2003). Il est donc bien connu qu'Abcc2 contient au moins deux sites distincts d'activation, un site de liaison pour le transport des AO<sup>-</sup> et un site allostérique d'activation avec divers substrats qui ne sont pas nécessairement transportés par Abcc2. L'existence de divers sites de liaison nous semble intéressante puisque le TC n'est pas transporté dans la bile par Abcc2. Il pourrait toutefois, tel d'autres agents cholestatiques, interagir avec le site de liaison non impliqué dans le transport.

### **3.4.2 Considération 2 : Abcc2 est liée à l'activité d'un canal chlore.**

Bien que basé sur très peu de travaux, il a été constaté qu'Abcc2 possède, en plus de sa fonction de transport classique, une deuxième fonction. Il s'agit d'un rôle dans l'activation de canaux  $\text{Cl}^-$ , qui semble induite lorsque la concentration intracellulaire en substrats pouvant se lier à Abcc2 est élevée (Li et Weinman, 2002). Deux autres transporteurs proches d'ABCC2, le CFTR pour «cystic fibrosis transmembrane conductance regulator» (Schwiebert et *al*, 1998) et une isoforme d'Abcc2 du lapin (van Kujck et *al*, 1996) sont aussi impliqués dans le mouvement transmembranaire du  $\text{Cl}^-$ . Li et Weinman (2002) ont plus précisément suggéré, qu'en présence d'une concentration intracellulaire élevée d'un substrat, ce dernier se lie à un site sur Abcc2 produisant un changement de conformation du transporteur qui mène à une interaction directe entre Abcc2 et un canal  $\text{Cl}^-$ . En fait, il s'agit d'une propriété unique que possède ABCC2 comparativement aux autres transporteurs canaliculaires, ce qui pourrait donc lui procurer son rôle clé dans la régulation de la sécrétion biliaire, tel que supporté par la littérature et par nos travaux. Nous émettons donc l'hypothèse que le TC ainsi que d'autres agents cholestatiques, via une liaison au site de liaison d'Abcc2 non impliqué dans son activité de transport puisse contrôler le niveau d'activité du canal chlore.

### **3.4.3 Considération 3 : L'activité des canaux $\text{Cl}^-$ est impliquée dans la régulation du volume et du pH intracellulaire.**

Il a été démontré que l'activation de canaux  $\text{Cl}^-$  peut, particulièrement dans d'autres types cellulaires, activer les échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (Zsembery et *al*, 2002). L'activation de ces canaux/échangeurs résulte en un changement dans le volume et dans le pH intracellulaire (Benedetti et *al*, 1991). Certains travaux ont aussi exposé que les mécanismes impliqués dans la régulation volumique ainsi que des modulations du pH intracellulaire semblent suffisants pour provoquer l'intériorisation des transporteurs canaliculaires (Dombrowski et *al* 2000, Schmitt et *al* 2001, Kubitz

et *al* 2005), réduisant ainsi leur nombre à la membrane canaliculaire et par conséquent, diminuant la capacité sécrétoire de l'hépatocyte. Ces travaux, surtout descriptifs, ne permettent pas à ce point d'élaborer sur les mécanismes précis impliqués, mais démontrent clairement l'existence du phénomène.

#### 3.4.4 Hypothèse unifiante.

Nous avons donc proposé (voir la figure 9 ci-dessous), puisque *Abcc2* contient deux sites distincts d'activation, un site d'activation pour le transport des  $\text{AO}^-$  et un site allostérique de liaison, que le TC (lors de son augmentation intracellulaire, étape 1) interagirait avec ce site allostérique d'activation d'*Abcc2* (étape 2). Cette interaction permettrait à *Abcc2* d'activer les canaux  $\text{Cl}^-$  (étape 3) qui, par la suite, vont activer les échangeurs  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  (étape 4). Une telle activation s'associe à un changement volumique de l'hépatocyte ainsi qu'à un changement du pH intracellulaire (étape 5), deux phénomènes impliqués dans l'endocytose des transporteurs canaliculaires (étape 6). Cette intériorisation des transporteurs canaliculaires mène à la diminution de la sécrétion biliaire (étape 7). D'où, nous proposons que ces changements de volume et de pH intracellulaire puissent être directement responsables des changements du ciblage péricanaliculaire observés lors du déclenchement de la cholestase. Ce procédé étant initialement dépendant de la présence d'*Abcc2*, il expliquerait pourquoi son absence bloque l'initiation de la cholestase. Cette hypothèse pourrait aussi expliquer pourquoi le niveau d'expression d'*Abcc2* a un impact significatif sur le seuil de tolérance de l'hépatocyte aux agents cholestatiques (au minimum à TC). En effet, le changement de volume intracellulaire ou de pH nécessaire à l'endocytose des transporteurs canaliculaires devrait être atteint plus rapidement dans un hépatocyte exprimant 100% d'*Abcc2* comparativement à un hépatocyte qui exprime 50% d'*Abcc2* puisqu'une quantité plus importante de canaux  $\text{Cl}^-$  sera activée et ce, plus rapidement. Ce mécanisme nous permet donc d'unifier les données de la littérature et d'expliquer pourquoi la souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> a une plus grande sensibilité à la cholestase.

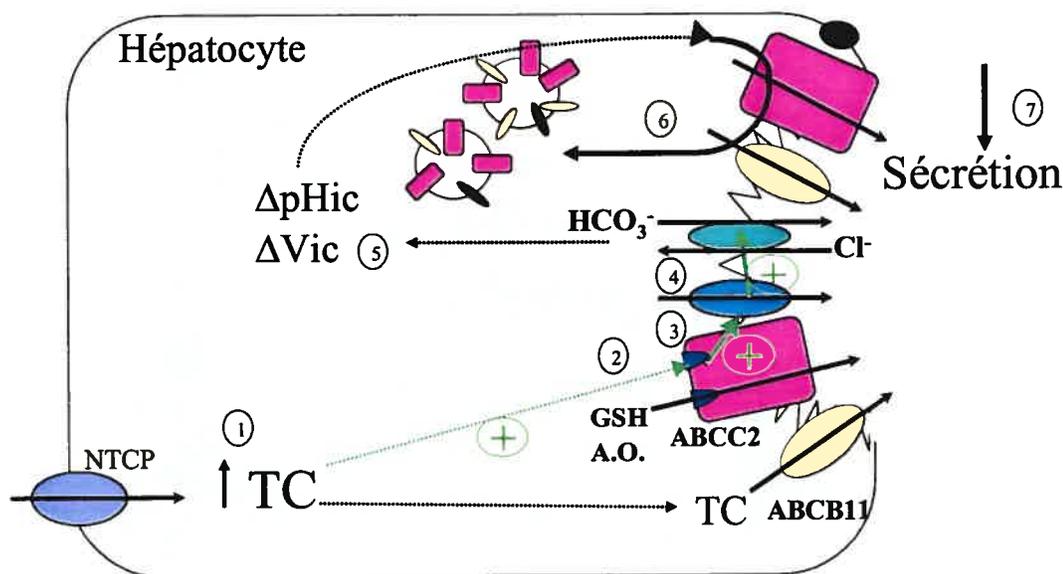


Figure 9 : Hypothèse proposée liant ABCC2 à l'initiation de la cholestase.

### 3.5 Conclusion majeure et épilogue.

Plusieurs médicaments ou substances exogènes sont capables d'induire la cholestase, menant à de sévères complications pouvant aller jusqu'au besoin d'une transplantation hépatique. Par exemple, les hormones estrogéniques (Crocenzi et al, 2003a), la glibenclamide (Stieger et al, 2000), le bosentan (Fattinger et al, 2001) et la cyclosporine A (Román et al, 1990) sont capables de moduler la sécrétion des SB et d'entraîner leur rétention résultant en une cholestase. Cette réaction cholestatique semble en fait associée à une hypersensibilité individuelle, les effets cholestatiques étant observés en doses pharmacologiques et seulement chez une faible proportion des individus. Plusieurs facteurs, dont des variations génétiques, pourraient être responsables de cette hypersensibilité. Puisque dans la plupart des modèles de cholestase acquise, l'équilibre entre le ciblage des transporteurs canaliculaires vers la membrane apicale et l'intériorisation des transporteurs canaliculaires est affecté (tout comme dans cette étude), l'intériorisation des transporteurs canaliculaires est reconnue comme un phénomène majeur impliqué dans le développement de la

cholestase. Les mécanismes régulateurs de ces mouvements sont toutefois très mal caractérisés.

Sur la base de nos travaux, nous aimerions proposer qu'Abcc2 soit un des acteurs majeurs dans cette régulation péricanaliculaire et dans l'induction de la cholestase, et plus particulièrement un acteur dont le niveau d'expression (ou d'activité) peut directement moduler les mouvements péricanaliculaires et la sensibilité du foie à la présence d'agents au potentiel cholestatique. Plus particulièrement et contrairement aux autres transporteurs canaliculaires où l'absence ou la diminution de l'expression mène ou peut mener à la cholestase, nous avons établi que plus le niveau d'expression et d'activité d'Abcc2 est élevé et plus la sensibilité à la cholestase induite par le TC sera grande. Donc, une dose plus faible de TC pourra déclencher la cholestase lorsque le niveau d'expression d'Abcc2 est élevé en comparaison avec un niveau plus bas. Par conséquent, nous concluons que le niveau d'expression et d'activité d'ABCC2 influence directement la capacité du foie à maintenir une fonction biliaire optimale en présence d'une surcharge en TC, supportant l'hypothèse qu'ABCC2 joue un rôle primaire dans le contrôle de la sensibilité et dans le développement de la cholestase acquise par son rôle de régulateur menant à l'intériorisation des transporteurs canaliculaires.

En fonction de nos résultats, il devient particulièrement important de noter que, chez l'humain, le niveau d'expression et d'activité d'ABCC2 sont attendus être très variables dû aux nombreux polymorphismes génétiques (Hirouchi et al, 2004) et médicaments consommés (Suzuki et Sugiyama, 2002). Il serait d'un grand intérêt d'examiner de plus près si ABCC2 a, comme chez les rongeurs, un rôle à jouer dans le développement de la cholestase chez l'humain et plus particulièrement dans l'hypersensibilité au développement de cholestase. La démonstration d'un tel rôle d'ABCC2 pourrait mener à une meilleure identification des individus à risque tout comme au développement de nouvelles stratégies d'interventions, qui pourraient entre autre viser à directement bloquer le site «cholestatique» d'ABCC2 si ce dernier est prouvé comme étant effectivement différent de son site de transport.

## Références

Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S et Yawo H. (1999). Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem.* 274: 17159-17163.

Agellon LB. et Torchia EC. (2000). Intracellular transport of bile acids. *Biochim Biophys Acta.* 1486: 198-209.

Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H et Sugiyama Y. (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta.* 1511: 7-16.

Ananthanarayanan M., Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ et Suchy FJ. (2001). Human salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem.* 276: 28857-28865.

Anderson JM. (1996). Leaky junctions and cholestasis: a tight correlation. *Gastroenterology.* 110: 1662-1665.

Arrese M et Accatino L. (2002). From blood to bile: recent advances in hepatobiliary transport. *Annals of Hepatology.* 1: 64-71.

Arrese M et Trauner M. (2003). Molecular aspects of bile formation and cholestasis. *Trends Mol Med.* 9: 558-564.

Asamoto Y, Tazuma S, Ochi H, Chayama K et Suzuki H. (2001) Bile-salt hydrophobicity is a key factor regulating rat liver plasma-membrane communication: relation to bilayer structure, fluidity and transporter expression and function. *Biochem J.* 359: 605-610.

Assem M, Schuetz EG, Leggas M, Sun D, Yasuda K, Reid G, Zelcer N, Adachi M, Strom S, Evans RM, Moore DD, Borst P et Schuetz JD. (2004). Interactions between Hepatic *Mrp4* and *Sult2a* as Revealed by the Constitutive Androstane Receptor and *Mrp4* Knockout Mice. *J Biol Chem.* 279: 22250-22257.

Ballatori N et Truong AT. (1992) Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J Physiol.* 263: G617-624.

Ballatori N et Rebbear JF. (1998). Roles of MRP2 and oatp1 in hepatocellular export of reduced glutathione. *Semin Liver Dis.* 18: 377-387.

Barnwell SG, Tuchweber B et Yousef IM. (1987). Biliary lipid secretion in the rat during infusion of increasing doses of unconjugated bile acids. *Biochim Biophys Acta.* 922: 221-233.

Benedetti A, Strazzabosco M, Corasanti JG, Haddad P, Graf J, Boyer JL. (1991). Cl(-)-HCO<sub>3</sub>- exchanger in isolated rat hepatocytes: role in regulation of intracellular pH. *Am J Physiol.* 261: G512-522.

Benhamou JP et Erlinger S. (2000). *Maladies du foie et des voies biliaires.* 4<sup>e</sup> édition, Médecine-Sciences Flammarion. 223 p.

Berr F, Simon FR et Reichen J. (1984). Ethynylestradiol impairs bile salt uptake and Na-K pump function of rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 247: G437-443.

Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G et Dombrowski F. (2001). Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology.* 33: 1206-1216.

Bezprozvanny I. et Maximov A. (2001) PDZ domains: More than just a glue. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98: 787-789.

Bohan A et Boyer JL. (2002). Mechanisms of hepatic transport of drugs: implications for cholestatic drug reactions. *Semin Liver Dis.* 22 : 23-136.

Bouchard G, Carey MC et Paigen B. (2004). Effects of an Abcc2 missense mutation on biliary lipid secretion and lithogenicity of bile. Dans: *Proceedings of the FALK Symposium* 138. Beuers et al, eds. pp. 50-57.

Bouchard G, Casavant S., Chao H, Lammert F, Korstanje R, Carey MC, Paigen B. Murine cholesterol cholelithiasis due to Lith2 is linked to a structural mutation in the Abcc2 gene. (En préparation).

Boyer JL. Molecular pathophysiology of membrane transport function in cholestasis. Dans: Arias MI, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D et Schafritz DA. 2001. *The liver biology and pathobiology.* Fourth edition. Lippincott Williams et Wilkins. pp. 663-677.

Boyer JL et Nathanson MH. Bile formation. Dans: Schiff, Eugene R., Sorrell, Michael F et Maddrey, Willis C. *Schiff's Diseases of the liver.* Édition 8th ed. / edited by Eugene R. Schiff, Michael F. Sorrell, Willis C. Maddrey. New York: Lippincott-Raven. pp. 119-146.

Boyer JL. Bile formation and cholestasis. (2003). Dans: *Schiff's Diseases of the liver.* Édition 9th ed. / edited by Eugene R. Schiff, Michael F. Sorrell, Willis C. Maddrey. New York: Lippincott-Raven. pp. 135-165.

Buchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T et Keppler D. (1996). cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem.* 271: 15091-15098.

Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M, Klomp LW, Lomri N, Berger R, Scharschmidt BF, Knisely AS, Houwen RH et Freimer NB. (1998). A gene encoding a P-type ATPase muted in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet.* 18: 219-224.

Cao J, Huang L, Liu Y, Hoffman T, Stieger B, Meier PJ et Vore M. (2001). Differential regulation of hepatic bile salt and organic anion transporters in pregnant and postpartum rats and the role of prolactin. *Hepatology* 33: 140-147.

Cao J, Stieger B, Meier PJ et Vore M. (2002). Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anions in pregnancy. *Am J Physiol.* 283: G757-766.

Carey MC et Duane WC. (1994). Enterohepatic circulation. Dans : Arias IM, Boyer JL, Fausto N, JaKoby WB, Schachter DA et Scafritz DA. *The liver :biology and pathobiology.* New York :Raven Press. pp. 719-767.

Cattori V, Hagenbuch B, Hagenbuch N, Stieger B, Ha R, Winterhalter KE et Meier PJ. (2000). Identification of organic anion transporting polypeptide 4 (Oatp4) as a major full-length isoform of the liver-specific transporter-1 (rlst-1) in rat liver. *FEBS Lett.* 474: 242-245.

Chagnon P, Michaud J, Mitchell G, Mercier J, Marion JF, Drouin E, Rasquin-Weber A, Hudson TJ et Richter A. (2002). A missense mutation (R565W) in cirrhin (FLJ14728) in North American Indian childhood cirrhosis. *Am J Hum Genet* 71: 1443-1449.

Chiang JYL, Kimmel R, Weinburger C et Stroup D. (2000). Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription. *J Biol Chem.* 275: 10918-10924.

Chiang JY, Kimmel R et Stroup D. (2001). Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR $\alpha$ ). *Gene.* 262: 257-265.

Chu X, Strauss JR, Mariano MA, Li J, Newton DJ, Cai X, Wang RW, Yabut J, Hartley DP, Evans DC et Evers R. (2006). Characterization of Mice Lacking the Multidrug Resistance Protein Mrp2 (Abcc2). *J Pharmacol Exp Ther.* 317: 579-589.

Courtois A, Payen L, Guillouzo A et Fardel O. (1999). Up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) expression in rat hepatocytes by dexamethasone. *FEBS Lett.* 459: 381-385.

Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EJ, Pellegrino JM, Favre CO, Rodriguez Garay EA, Mottino AD, Coleman R et Roma MG. (2001). Beneficial effects of silymarin on estrogen-induced cholestasis in the rat: a study in vivo and in isolated hepatocyte couplets. *Hepatology.* 34: 329-339.

Crocenzi FA, Mottino AD, Jingsong C, Veggi LM, Sanchez Pozzi EJ, Vore M, Coleman R et Roma MG. (2003a). Estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats. *Am J Physiol.* 285: G449-G459.

Crocenzi FA, Mottino AD, Sanchez Pozzi EJ, Pellegrino JM, Rodriguez Garay EA, Milkiewicz P, Vore M, Coleman R et Roma MG. (2003b). Impaired localisation and transport function of canalicular Bsep in tauroolithocholate induced cholestasis in the rat. *Gut.* 52: 1170-1177.

Crocenzi FA, Sanchez Pozzi EJ, Pellegrino JM, Rodriguez Garay EA, Mottino AD et Roma MG. (2003c). Preventive effect of silymarin against tauroolithocholate-induced cholestasis in the rat. *Biochem Pharmacol.* 66: 355-364.

Crocenzi FA, Mottino AD et Roma MG. (2004). Regulation of synthesis and trafficking of canalicular transporters and its alteration in acquired hepatocellular cholestasis. Experimental therapeutic strategies for its prevention. *Curr Med Chem.* 11: 501-524.

del Castillo-Olivares A. et Gil G. (2001). Suppression of sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase transcription by the short heterodimer partner: insights into the repression mechanism. *Nucleic Acids Res.* 29: 4035-4042.

Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ et Karpen SJ. (2001). The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology.* 121: 140-147.

Desmet VJ. (1994). The bile secretory apparatus. Dans: *Cholestasis : proceedings of the International Meeting on Cholestasis and Related Disorders, Florence, Italy, 23-26 March 1994 / éditeurs: Gentilini P, Arias IM, McIntyre N et Rodés J. Excerpta Medica, New York.*

Dijkstra M, Kuipers F, Havinga R, Smit EP et Vonk RJ. (1990). Bile secretion of trace elements in rats with a congenital defect in hepatobiliary transport of glutathione. *Pediatr Res.* 28: 339-343.

Dixon PH, Weerasekera N, Linton KJ, Donaldson O, Chambers J, Egginton E, Weaver J, Nelson-Piercy C, de Swiet M, Warnes G, Elias E, Higgins CF, Johnston DG, McCarthy MI et Williamson C. (2000). Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet.* 9: 1209-1217.

Dombrowski F, Kubitz R, Chittattu A, Wettstein M, Saha N, Haussinger D. (2000). Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem J.* 348: 183-8.

Donner MG et Keppler D. (2001). Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology.* 34: 351-9.

Elferink RO et Groen AK. (2002). Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim Biophys Acta.* 1586: 129-145.

Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J et Borst P. (2000). Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer.* 83: 375-383.

Falany CN, Johnson MR, Barnes S et Diasio RB. (1994). Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA: amino acid N-acyltransferase. *J Biol Chem.* 269: 19375-19379.

Fattinger K, Funk C, Pantze M, Weber C, Reichen J, Stieger B et Meier PJ. (2001). The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 69: 223-231.

Ferencs P, Zollner G et Trauner M. (2002) Hepatic transport systems. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 17: S105-S112.

Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Pojer C, Zenz R, Lammert F, Stieger B, Meier PJ, Zatloukal K, Denk H et Trauner M. (2001). Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology.* 121: 170-183.

Fuchs M. (2003). Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges. *Am J Physiol* 284: G551-557.

Fukumoto Y, Ando M, Yasunaga M, Okuda M et Okita K. (1994). Secretin prevents taurocholate-induced intrahepatic cholestasis in the rat. *J Hepatol.* 20: 750-754.

Garrett RH et Grisham CM. (2000). *Biochimie*. 2<sup>e</sup> Édition. DeBoeck Université. 1254 pages.

Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ, Stolz A, Suchy FJ et Boyer JL. (1996). Down-regulation of expression and function of the rat liver Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology*. 110: 199-209.

Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF et Meier PJ. (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem*. 273: 10046-10050.

Gerk PM, Li W et Vore M. (2004). Estradiol 3-glucuronide is transported by the multidrug resistance-associated protein 2 but does not activate the allosteric site bound by estradiol 17-glucuronide. *Drug Metab Dispos*. 32: 1139-1145.

Goodwin B et Kliewer SA. (2002a). Nuclear receptors. I. Nuclear receptors and bile acid homeostasis. *Am J Physiol*. 282: G926-931.

Goodwin, B, Redinbo MR, and Kliewer SA. (2002b). Regulation of CYP3A gene transcription by the pregnane X receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 1-23.

Graf GA, Li WP, Gerard RD, Gelissen I, White A, Cohen JC et Hobbs HH. (2002) Coexpression of ATP-binding cassette proteins ABCG5 and ABCG8 permits their transport to the apical surface. *J Clin Invest*. 110: 659-669.

Graf J. et Häussinger D. (1996). Ions transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone actions and metabolism. *J Hepatology*. 24: S53-S77

Groen AK, Bloks VW, Bandsma RH, Ottenhoff R, Chimini G, Kuipers F. (2001). Hepatobiliary cholesterol transport is not impaired in Abca1-null mice lacking HDL. *J Clin Invest*. 108: 843-850.

Guo GL, Lambert G, Negishi M, Ward JM, Brewer HB Jr, Kliewer SA, Gonzalez FJ et Sinal CJ. (2003). Complementary roles of farnesoid X receptor, pregnane X receptor, and constitutive androstane receptor in protection against bile acid toxicity. *J Biol Chem*. 278: 45062-45071.

Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lubbert H et Meier PJ. (1991). Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na<sup>+</sup>/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 10629-10633.

Hagenbuch B, Adler ID et Schmid TE. (2000). Molecular cloning and functional characterization of the mouse organic-anion-transporting polypeptide 1 (Oatp1) and mapping of the gene to chromosome X. *Biochem J*. 345: 115-120.

Hagenbuch B et Meier PJ. (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta*. 1609: 1-18.

Harris MJ et Arias IM. (2003). FIC1, a P-type ATPase linked to cholestatic liver disease, has homologues (ATP8B2 and ATP8B3) expressed throughout the body. *Biochim Biophys Acta*. 1633: 127-131.

Hashimoto K, Uchiumi T, Konno T, Ebihara T, Nakamura T, Wada M, Sakisaka S, Maniwa F, Amachi T, Ueda K et Kuwano M. (2002). Trafficking and functional defects by mutations of the ATP-binding domains in MRP2 in patients with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology*. 36: 1236-1245.

Hegedus T, Sessler T, Scott R, Thelin W, Bakos E, Varadi A, Szabo K, Homolya L, Milgram SL et Sarkadi B. (2003). C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 302: 454-461.

Hirohashi T, Suzuki H, Ito K, Ogawa K, Kume K, Shimizu T et Sugiyama Y. (1998). Hepatic expression of multidrug resistance-associated protein-like proteins maintained in Eisai hyperbilirubinemic rats. *Mol Pharmacol*. 53: 1068-1075.

Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H et Sugiyama Y. (2000). ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J Biol Chem*. 275: 2905-2910.

Hirouchi M, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Ieiri I, Ohtsubo K et Sugiyama Y. (2004). Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2. *Pharm Res*. 21: 742-748.

Hofmann AF. Bile acids. 1994. Dans: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA et Shafritz DA. *The liver: biology and pathobiology*. New York. Raven Press. pp. 677-718.

Hofmann AF. (1999). The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med*. 159: 2647-2658.

Hsia SL. (1971). Hyocholic acid and muricholic acids. Dans: *The bile acids. Chemistry, Physiology, and Metabolism*. Volume 1: Chemistry. Edité par Nair PP et Kritchevsky D. Plenum Press, New York-London. 372 pages.

Huang L, Smit JW, Meijer DKF et Vore M. (2000). Mrp2 is essential for estradiol-17 $\beta$ ( $\beta$ -D-glucuronide)-induced cholestasis in rats. *Hepatology*. 32: 66-72.

Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, de Pedro N, Royo I, Blevins RA, Pelaez F, Wright SD et Cui J. (2003). Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem*. 278: 51085-51090.

Hyogo H, Tazuma S, Nishioka T, Ochi H, Yamaguchi A, Numata Y, Kanno K, Sakomoto M, Asamoto Y, Tsuboi K, Nakai K, Yasumiba S, Sunami Y et Kajiyama G. (2001). Phospholipid alterations in hepatocyte membranes and transporter protein changes in cholestatic rat model. *Dig Dis Sci.* 46: 2089-2097.

Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T et Sugiyama Y. (1997). Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *Am J Physiol.* 272: G16-G22.

Ito S, Ieiri I, Tanabe M, Suzuki A, Higuchi S et Otsubo K. (2001). Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics.* 11: 175-84.

Itoda M, Saito Y, Soyama A, Saeki M, Murayama N, Ishida S, Sai K, Nagano M, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S et Sawada Ji J. (2002). Polymorphisms in the ABCC2 (cMOAT/MRP2) gene found in 72 established cell lines derived from Japanese individuals: an association between single nucleotide polymorphisms in the 5'-untranslated region and exon 28. *Drug Metab Dispos.* 30: 363-364.

Jacquemin E., Cresteil D., Manouvrier S. Boute O. et Hadchouel M. (1999) Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet.* 353: 210-211.

Jansen PL, Peters WH et Lamers WH. (1985). Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport. *Hepatology.* 5: 573-579.

Jansen PL, Peters WH et Meijer DK. (1987). Hepatobiliary excretion of organic anions in double-mutant rats with a combination of defective canalicular transport and uridine 5'-diphosphate-glucuronyl-transferase deficiency. *Gastroenterology.* 93: 1094-1103.

Jansen PL, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Hooiveld GJ, Koning JH, De Jager-Krikken A, Kuipers F, Stellaard F, Bijleveld CM, Gouw A, Van Goor H, Thompson RJ et Muller M. (1999). Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology.* 117: 1370-1379.

Jansen PLM, Müller M et Sturm E (2001). Genes and cholestasis. *Hepatology.* 34: 1067-1074.

Jansen PLM. et Müller M. (2003). The role of membrane transport in drug-induced hepatotoxicity and cholestasis. Dans: *Drug-induced liver disease* Kaplowitz N., DeLeve L.D. New York : Marcel Dekker.

Ji B, Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y et Horie T. (2002). Multidrug resistance-associated protein2 (MRP2) plays an important role in the biliary excretion of glutathione conjugates of 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med.* 33: 370-378.

Jung D, Podvynec M, Meyer UA et Mangelsdorf DJ. (2002). Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid-X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology.* 122: 1954-1966.

Kakyo M, Unno M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Iwasashi H, Nakai D, Seki M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H et Abe T. (1999). Molecular characterization and functional regulation of a novel rat liver-specific organic anion transporter rlst-1. *Gastroenterology.* 117: 770-775.

Kaplowitz, N. (2003). Drug-induced liver disease. Édité par Neil Kaplowitz et Laurie D. DeLeve. New York : Marcel Dekker. 773 pages.

Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R et Keppler D. (1996). Absence of canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugated export pump from the hepatocytes in the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 23: 1061-1066.

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM et Edwards PA. (2002). Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2; ABCC2) by the nuclear receptors PXR, FXR, and Car. *J Biol Chem.* 277: 2908-2915.

Keitel V, Kartenbeck J, Nies AT, Spring H, Brom M et Keppler D. (2000). Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 32: 1317-1328.

Keitel V. (2003). A common Dubin-Johnson syndrome mutation impairs protein maturation and transport activity of MRP2 (ABCC2). *Am J Physiol.* 284: G165-174.

Keppler D, Konig J. (1997). Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J.* 11: 509-516.

Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, Yonemura S, Yamagishi H, Keppler D, Tsukita S et Tsukita S. (2002). Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet.* 31: 320-325.

Kipp H et Arias IM. (2000). Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters. *Semin Liver Dis.* 20: 339-351.

Kipp H, Pichetshote N et Arias IM. (2001). Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J Biol Chem.* 276: 7218-7224.

Kipp H et Arias IM. (2002). Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *Annu Rev Physiol.* 64: 595-608.

Kitani K et Kanai S. (1982). Tauroursodeoxycholate prevents taurocholate induced cholestasis. *Life Sci.* 30: 515-523.

Kojima H, Nies AT, König J, Haggmann W, Spring H, Uemura M, Fukui H et Keppler D. (2003). Changes in the expression and localization of hepatocellular transporters and radixin in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 39: 693-702.

Kok T, Bloks VW, Wolters H, Havinga R, Jansen PLM, Staels B et Kuipers F. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-mediated regulation of multidrug resistance 2 (Mdr2) expression and function in mice. *Biochem J.* 369: 539-547.

König J, Rost D, Cui Y et Keppler D. (1999a) Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology.* 29: 1156-1163.

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

Koopen NR, Müller M, Vonk RJ, Zimniak P et Kuipers F. (1998). Molecular mechanisms of cholestasis: causes and consequences of impaired bile formation. *Biochim Biophys Acta.* 1408: 1-17.

Kubitz R, D'urso D, Keppler D, Haussinger D. (1997). Osmodependent dynamic localization of the multidrug resistance protein 2 in the rat hepatocyte canalicular membrane. *Gastroenterology.* 113: 1438-1442.

Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U et Häussinger D. (1999). Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethazone. *Gastroenterology.* 116: 401-410.

Kubitz R, Helmer A, Haussinger D. (2005) Biliary transport systems: short-term regulation. *Methods Enzymol.* 400: 542-57.

Kuipers F, Enserink M, Havinga R, van der Steen AB, Hardonk MJ, Fevery J et Vonk RJ. (1988). Separate transport systems for biliary secretion of sulfated and unsulfated bile acids in the rat. *J Clin Invest.* 81: 1593-1599

Kullak-Ublick GA, Glasa J, Boeker C, Oswald M, Gruetzner U, Hagenbuch B, Stieger B, Meier P.J., Beuers U., Kramer W., Wess G. et Paumgartner G. (1997). Clorambucil-taurocholate is transported by bile acid carriers expressed in human hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology*. 113: 1295-1305.

Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B et Meier PJ. (2000). Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis*. 20: 273-292.

Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ et Hagenbuch B. (2001). Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*. 120: 525-533.

Lam P, Wang R, Ling V. (2005). Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice. *Biochemistry*. 44: 12598-125605.

Lang F, Busch GL, Ritter M, Volkl H, Waldegger S, Gulbins E, Haussinger D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev*. 78: 247-306.

Lee JM, Trauner M, Soroka CJ, Stieger B, Meier PJ et Boyer JL (2000a). Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. *Gastroenterology*. 118: 163-172.

Lee JM et Boyer JL. (2000b). Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis*. 20: 373-384.

Li L, Meier PJ et Ballatori N. (2000). Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol Pharmacol*. 58: 335-340.

Li X. et Weinman SA. (2002). Mrp2 modulates the activity of chloride channels in isolated hepatocytes. *Hepatology*. 36: 65-71.

Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangesdorf DJ et Shan B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. 284: 1362-1365.

Marieb EN et Laurendeau G. (1993). *Anatomie et physiologie humaines*. ERPI. Chapitre 24 : le système digestif. pp 796-800.

Mauad TH, van Nieuwkerk CM, Dingemans KP, Smit JJ, Schinkel AH, Notenboom RG, van den Bergh Weerman MA, Verkruijsen RP, Groen AK, Oude Elferink RP et al. (1994). Mice with homozygous disruption of the mdr2 P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*. 145: 1237-1245.

Mayes PA. (1995). Synthèse, transport et excrétion du cholestérol. Dans : Précis de biochimie de Harold A. Harper et Robert K. Murray et al. Édition 8e éd. Presses de l'Université Laval, 1995. 919 pages.

Meier PJ. (1995). Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile. *Am J Physiol.* 269: G801-812.

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

Meier PJ et Stieger B.(2002). Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol.* 64: 635-661.

Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Harry K, Adachi M, Hagey L, Schuetz JD et Boyer JL. (2006). *Mrp4*<sup>-/-</sup> mice have an impaired cytoprotective response in obstructive cholestasis. *Hepatology.* 43: 1013-1021.

Moschetta A, vanBerge-Henegouwen GP, Portincasa P, Palasciano G et van Erpecum KJ. (2001). Cholesterol crystallization in model bile: effects of bile salt and phospholipid species composition. *J Lipid Res.* 42: 1273-1281.

Mottino AD, Cao J, Veggi LM, Crocenzi F, Roma MG et Vore M. (2002). Altered localization and activity of canalicular *Mrp2* in estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide-induced cholestasis. *Hepatology.* 35: 1409-1419.

Mottino AD, Veggi LM, Wood M, Vélez Roman JM et Vore M. (2003). Biliary secretion of glutathione in estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide-induced cholestasis. *JPET* 307: 306-313.

Mottino AD, Crocenzi FA, Pozzi EJ, Veggi LM, Roma MG et Vore M. (2005). Role of microtubules in estradiol-17 $\beta$ -D-glucuronide-induced alteration of canalicular *Mrp2* localization and activity. *Am J Physiol.* 288: G327-336.

Murray, RK. et Harper, HA. Harper's illustrated biochemistry. (2003). Porphyrins and bile pigments. Chapitre 32. Lange Medical Books/Mcgraw-Hill, 26<sup>e</sup> édition. pp 270-285.

Nezasa K, Tian X, Zamek-Gliszczynski MJ, Patel NJ, Raub TJ et Brouwer KL. (2006). Altered Hepatobiliary Disposition of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein in *Abcg2* (*Bcrp1*) and *Abcc2* (*Mrp2*) Knockout Mice. *Drug Metab Dispos.* 34: 718-723.

Nies AT, Gatmaitan Z et Arias IM. (1996). ATP-dependent phosphatidylcholine translocation in rat liver canalicular plasma membrane vesicles. *J Lipid Res.* 37: 1125-1136.

Obermayer-Straub P. et Peter Manns M.: immunological mechanisms in liver injury. Dans: Drug-induced liver disease Kaplowitz N., DeLeve L.D. 2003.

Ogura K, Choudhuri S, Klaassen CD. (2000). Full-length cDNA cloning and genomic organization of the mouse liver-specific organic anion transporter-1 (lst-1). *Biochem Biophys Res Commun.* 272: 563-570.

Ogura K, Choudhuri S, Klaassen CD. (2001). Genomic organization and tissue-specific expression of splice variants of mouse organic anion transporting polypeptide 2. *Biochem Biophys Res Commun.* 281: 431-439.

Ortiz DF, Moseley J, Calderon G, Swift AL, Li S et Arias IM. (2004). Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and regulates its abundance in the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 279: 32761-32770.

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

Oude Elferink R et Groen AK. (2002). Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim Biophys Acta.* 1586: 129-145.

Oude Elferink R. (2003). Cholestasis. *Gut.* 52: ii42-ii48.

Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD et Lehmann JM. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science.* 284: 1365-1368.

Pastore a, Federici G, Bertini E et Piemonte F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* 333: 19-39.

Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA et Meier PJ (2005). Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *J Hepatol.* 43: 342-357.

Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJR, Bakker CTM, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P et Oude Elferink RPJ. (1996). Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science.* 271: 1126-1128.

Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P et Oude Elferink RP. (1999). Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J.* 338: 393-401.

Pawlikowska L, Groen A, Eppens EF, Kunne C, Ottenhoff R, Looije N, Knisely AS, Killeen NP, Bull LN, Elferink RP et Freimer NB. (2004). A mouse genetic model for familial cholestasis caused by ATP8B1 mutations reveals perturbed bile salt homeostasis but no impairment in bile secretion. *Hum Mol Genet.* 13: 881-892.

Pikula S, Hayden JB, Awasthi S, Awasthi YC et Zimniak P. Organic anion-transporting ATPase of rat liver. I. (1994a). Purification, photoaffinity labeling, and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 269: 27566-27573.

Pikula S, Hayden JB, Awasthi S, Awasthi YC et Zimniak P. (1994b). Organic anion-transporting ATPase of rat liver. II. Functional reconstitution of active transport and regulation by phosphorylation. *J Biol Chem.* 269: 27574-27579.

Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V et Casini AF. (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol.* 66: 1499-1503.

Rahner C, Stieger B et Landmann L. (1996). Structure-function correlation of tight junctional impairment after intrahepatic and extrahepatic cholestasis in rat liver. *Gastroenterology.* 110: 1564-1578.

Redinger RN. (2003). Nuclear receptors in cholesterol catabolism: Molecular biology of the enterohepatic circulation of bile salts and its role in cholesterol homeostasis. *J Lab Clin Med.* 142: 7-20

Reichen J et Simon FR. Cholestasis. Chapitre 63. Dans: Arias MI, Jacoby WB, Popper H, Schachter D. et Schafritz D.A. 1988. *The liver: biology and pathobiology.* Second edition. Raven Press. pp 1105-1124.

Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J. et Borst, P. (2003) The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 9244-9249.

Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF et Keppler D. (2005). Substrate Specificity of Human ABCC4 (MRP4)-mediated Cotransport of Bile Acids and Reduced Glutathione. *Am J Physiol.* 290: G640-9.

Robins SJ, Fasulo JM, Robins VF et Patton GM. (1991). Utilization of different fatty acids for hepatic and biliary phosphatidylcholine formation and the effect of changes in phosphatidylcholine molecular species on biliary lipid secretion. *J Lipid Res.* 32: 985-92.

Roda A, Cappeleri G, Aldini R, Roda E et Barbara L. (1982). Quantitative aspects of the interaction of bile acids with human serum albumin. *J Lipid Res.* 23: 490-495.

Román ID, Monte MJ, González-Buitrago JM, Esteller A et Jiménez R. (1990). Inhibition of hepatocytary vesicular transport by cyclosporin A in the rat: Relationship with cholestasis and hyperbilirubinemia. *Hepatology* 12: 83–91.

Roelofsen H, Soroka CJ, Keppler D et Boyer JL. (1998). Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J Cell Sci.* 111: 1137-1145.

Rost D, Kartenbeck J et Kepler D. (1999). Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump MRP2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology.* 29: 814-821.

Russell DW et Setchell KD. (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistry.* 31: 4737-4749.

Sano N, Takikawa H et Yamanaka M. (1993). Estradiol-17 beta-glucuronide-induced cholestasis. Effects of ursodeoxycholate-3-O-glucuronide and 3,7-disulfate. *J Hepatol.* 17: 241-6.

Salvioli G, Lugli R, Pradelli JM et Gliogliotti G. (1985). Bile acid binding in plasma: the importance of lipoproteins. *FEBS Lett.* 187: 272-276.

Schiff, Eugene R., Sorrell, Michael F et Maddrey, Willis C. (2003). *Schiff's diseases of the liver.* Édition 9th ed. / edited by Eugene R. Schiff, Michael F. Sorrell, Willis C. Maddrey. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 983 pages.

Schmitt M., Kubitz R., Wettstein M., vom Dahl S. et Häussinger D. (2000). Retrieval of the mrp2 gene encoded conjugate export pump from the canalicular membrane contributes to cholestasis induced by tert-butyl hydroperoxyde and chlorodinitrobenzene. *Biol Chem.* 381: 487-495.

Schmitt M, Kubitz R, Lizun S, Wettstein M et Häussinger D. (2001). Regulation of the dynamic localization of the rat Bsep gene encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. *Hepatology.* 33: 509-518.

Schuetz JD, Connelly MC, Sun DX, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A et Fridland A. (1999). MRP4: a previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat Med.* 5: 1048–1051.

Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME et Guggino WB. (1998). Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 2674-2679.

Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G et Gonzalez FJ. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*. 102: 731-744.

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, et al. (1993). 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.

Smith AJ, de Vree JM, Ottenhoff R, Oude Elferink RP, Schinkel AH et Borst P. (1998). Hepatocyte-specific expression of the human MDR3 P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in *Mdr2* (-/-) mice. *Hepatology*. 28: 530-6.

Splinter PL, Masyuk AI, Marinelli RA et LaRusso NF. (2004). AQP4 transfected into mouse cholangiocytes promotes water transport in biliary epithelia. *Hepatology*. 39: 109-16.

Stieger B et Landmann L. (1996). Effects of cholestasis on membrane flow and surface polarity in hepatocytes. *J Hepatol*. 24: 128-134.

Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA et Meier PJ. (2000). Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology*. 118: 422-430.

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

Suzuki H. et Sugiyama Y. (2002). Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Advanced drug delivery reviews*. 54: 1311-1331.

Takikawa H, Sano N, Narita T, Uchida Y, Yamanaka M, Horie T, Mikami T et Tagaya O. (1991). Biliary excretion of bile acid conjugates in a hyperbilirubinemic mutant Sprague-Dawley rat. *Hepatology*. 14: 352-360.

Takikawa H, Sano N, Wako Y et Yamanaka M. (1993). Effects of organic anions and bile acids on biliary lipid excretion in hyperbilirubinemic mutant Sprague-Dawley rats. *J Hepatol*. 17: 247-252.

Tang X, Halleck MS, Schlegel RA et Williamson P. (1996). A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science*. 272: 1495-1497.

Thompson RJ et Strautnieks SS, (2001). Genetic defects of canalicular transport. Chapitre 26 dans Arias MI., Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D et Schafritz

DA. The liver biology and pathobiology. Fourth edition. Lippincott Williams et Wilkins. pp. 383-388.

Townsend DM, Tew KD et Tapiero H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 57: 145-155.

Trauner M., Meier P.J. et Boyer J.L. (1998a) Molecular pathogenesis of cholestasis. *New Eng J Med.* 339: 1217-1227.

Trauner M, Arrese M, Lee H, Boyer JL et Karpen SJ. (1998b). Endotoxin downregulates rat hepatic ntcp gene expression via decreased activity of critical transcription factors. *J Clin Invest.* 101: 2092-2100.

Trauner M. et Boyer JL. (2003). Bile salt transporters: Molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 83: 633-671.

Ujhazy P, Kipp H, Misra S, Wakabayashi Y et Arias IM. (2001). The biology of the bile canaliculus. Dans: Arias MI, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D. et Schafritz DA. 2001. The liver biology and pathobiology. Fourth edition. Lippincott Williams et Wilkins. Chapitre 24: pp. 361-372.

van der Meer R, Vonk RJ et Kuipers F. (1988). Cholestasis and the interactions of sulfated glyco- and tauroolithocholate with calcium. *Am J Physiol.* 254: G644-649.

van Kuijck MA, van Aubel RA, Busch AE, Lang F, Russel FG, Bindels RJ, van Os CH et Deen PM. (1996). Molecular cloning and expression of a cyclic AMP-activated chloride conductance regulator: a novel ATP-binding cassette transporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 5401-5406.

van Mil SW, van der Woerd WL, van der Brugge G, Sturm E, Jansen PL, Bull LN, van den Berg IE, Berger R, Houwen RH et Klomp LW. (2004). Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11. *Gastroenterology.* 127: 379-384.

van Mil SW, Houwen RH et Klomp LW. (2005). Genetics of familial intrahepatic cholestasis syndromes. *J Med Genet.* 42: 449-463.

Van Nieuwkerk CM, Elferink RP, Groen AK, Ottenhoff R, Tytgat GN, Dingemans KP, Van Den Bergh Weerman MA et Offerhaus GJ. (1996). Effects of Ursodeoxycholate and cholate feeding on liver disease in FVB mice with a disrupted *mdr2* P-glycoprotein gene. *Gastroenterology.* 111: 165-171.

Verkade HJ, Wolbers MJ, Havinga R, Uges DR, Vonk RJ et Kuipers F. (1990). The uncoupling of biliary lipid from bile acid secretion by organic anions in the rat. *Gastroenterology.* 99: 1485-1492.

Verkade HJ, Wolters H, Gerding A, Havinga R, Fidler V, Vonk RJ et Kuipers F. (1993a). Mechanism of biliary lipid secretion in the rat: a role for bile acid-independent bile flow? *Hepatology*. 17: 1074-1080.

Verkade HJ, Havinga R, Gerding A, Vonk RJ et Kuipers F. (1993b). Mechanism of bile acid-induced biliary lipid secretion in the rat: effect of conjugated bilirubin. *Am J Physiol*. 264: G462-469.

Vore M. (1987). Estrogen cholestasis. Membranes, metabolites, or receptors? *Gastroenterology*. 93: 643-649.

Vos TA, Hooiveld GJ, Koning H, Childs S, Meijer DK, Moshage H, Jansen PL et Muller M. (1998). Up-regulation of the multidrug resistance genes, Mrp1 and Mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, Mrp2, and the bile salt transporter, Sgpp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology*. 28: 1637-1644.

Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC et Forman BM. (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*. 3: 543-553.

Wang R., Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, Helgason CD, Ackerley C., Phillips MJ et Ling V. (2001). Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 2011-2016.

Wang R, Lam P, Liu L, Forrest D, Yousef IM, Mignault D, Phillips MJ et Ling V. (2003). Severe cholestasis induced by cholic acid feeding in knockout mice of sister of P-glycoprotein. *Hepatology*. 38: 1489-1499.

Wanless IR. Physioanatomic considerations. Dans: Schiff's Diseases of the liver. Édition 9th ed. / edited by Eugene R. Schiff, Michael F. Sorrell, Willis C. Maddrey. New York: Lippincott-Raven, pp. 17-50.

Weber AM, Tuchweber B, Yousef I, Brochu P, Turgeon C, Gabbiani G, Morin CL et Roy CC. (1981). Severe familial cholestasis in North American Indian children: a clinical model of microfilament dysfunction? *Gastroenterology*. 81: 653-662.

Wolkoff AW, Cohen LE et Arias IM. (1973). Inheritance of the Dubin-Johnson syndrome. *New Eng J Med*. 288: 113-117.

Yousef I, Mignault D et Tuchweber B. (1993). Effect of complete sulfation of bile acids on bile formation: role of conjugation and number of sulfate groups. *Hepatology*. 15: 438-445.

Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC et Hobbs HH. (2002a). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 16237-16242.

Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC et Hobbs HH. (2002b). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest.* 110: 671-680.

Zelcer N, Huisman MT, Reid G, Wielinga P, Breedveld P, Kuil A, Knipscheer P, Schellens JH, Schinkel AH et Borst P. (2003). Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J Biol Chem.* 278: 23538-23544.

Zeng H, Liu G, Rea PA et Kruh GD. (2000). Transport of amphipathic anions by human multidrug resistance protein 3. *Cancer Res.* 60: 4779-4784.

Zsembery A, Jessner W, Sitter G, Spirli C, Strazzabosco M, Graf J. (2002). Correction of CFTR malfunction and stimulation of Ca-activated Cl channels restore HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in cystic fibrosis bile ductular cells. *Hepatology.* 35: 95-104.

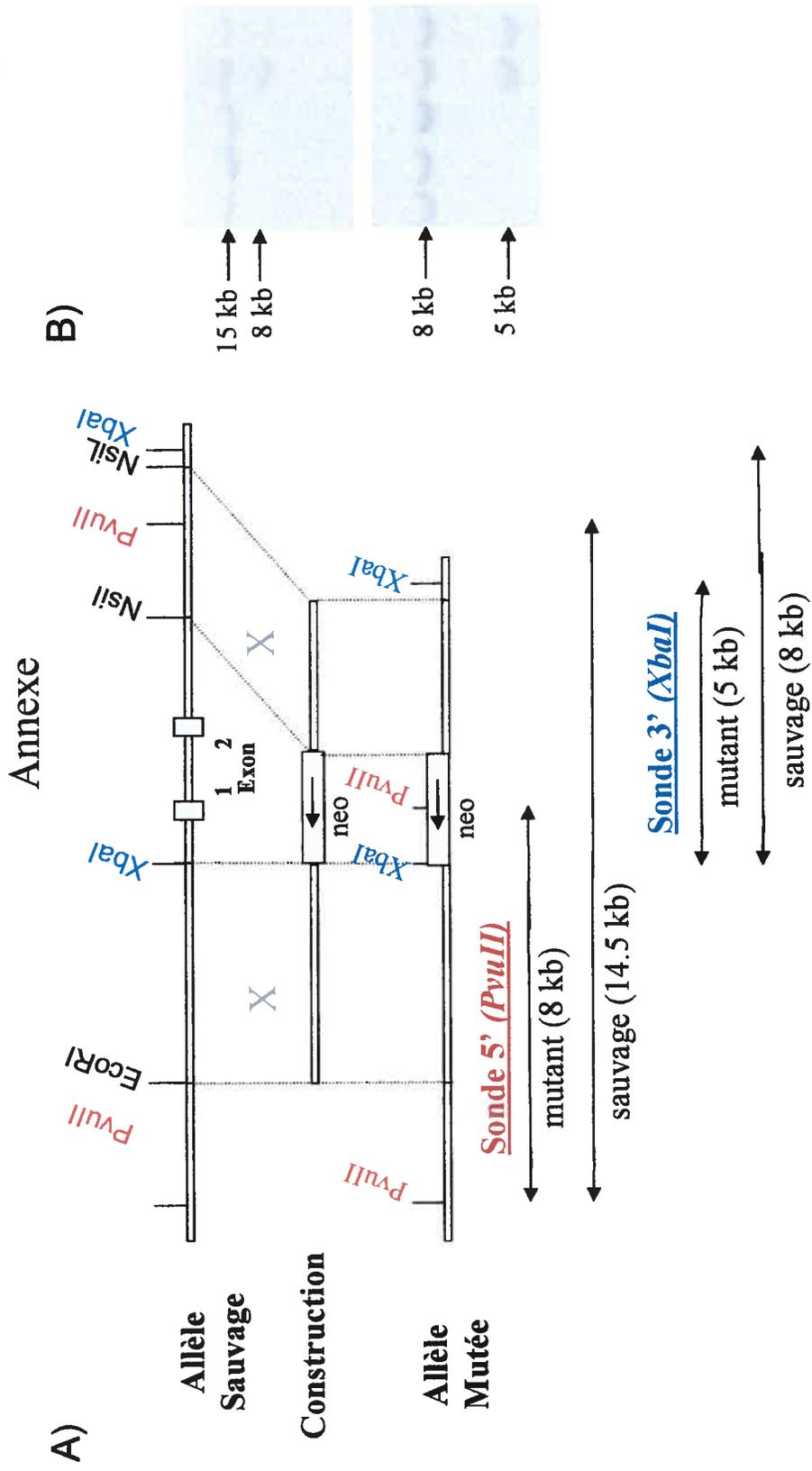


Figure 1: Construction du modèle expérimental porteur de différents niveaux d'expression d'ABCC2: A) inactivation du gène Abcc2 par l'élimination de 1kB du promoteur et des exons 1 et 2 et B) buvardage de Southern montrant la présence des allèles sauvages et mutantes.

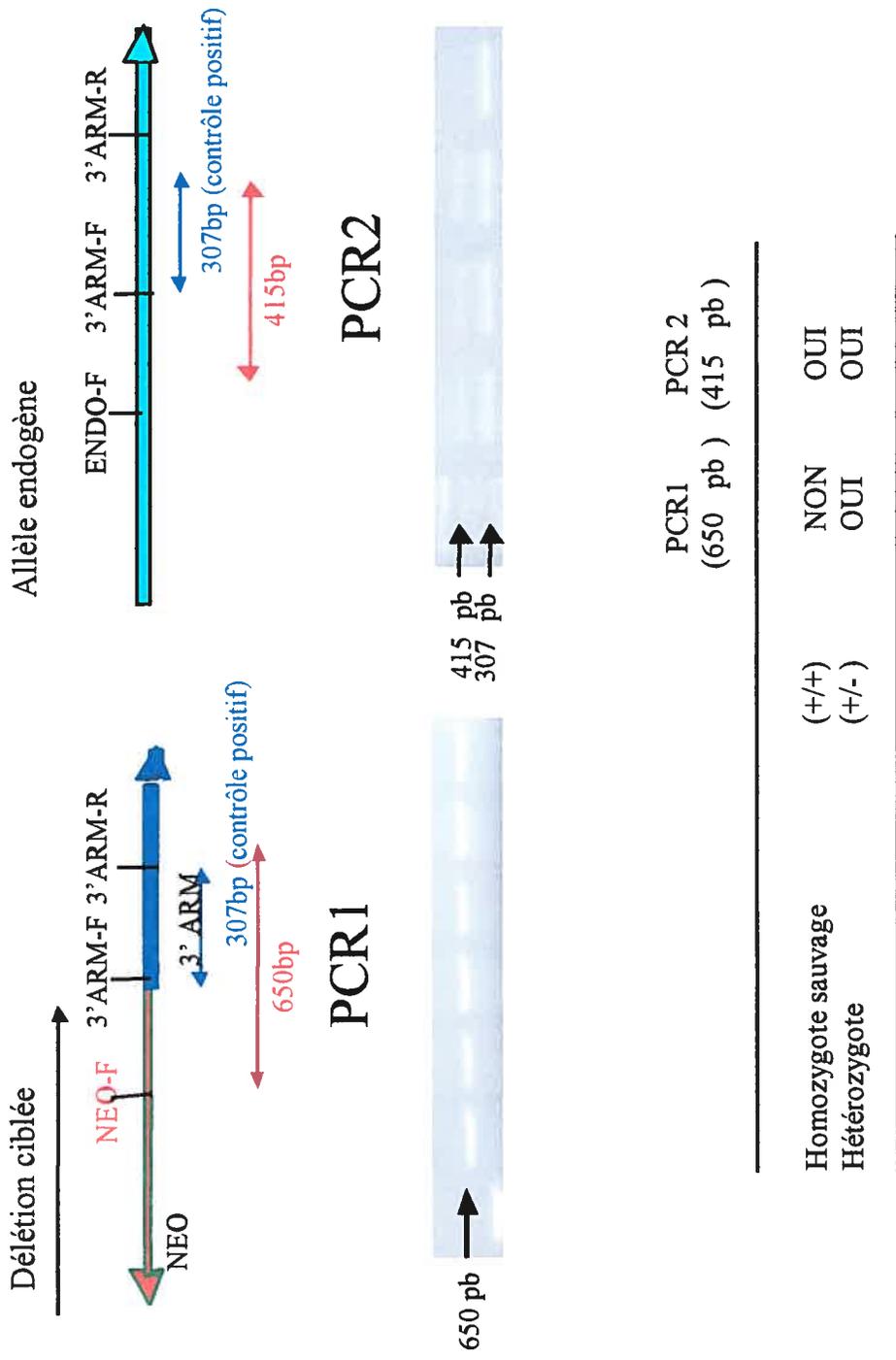


Figure 2: Stratégies de génotypage par PCR pour déterminer la présence de l'allèle sauvage ou mutante.

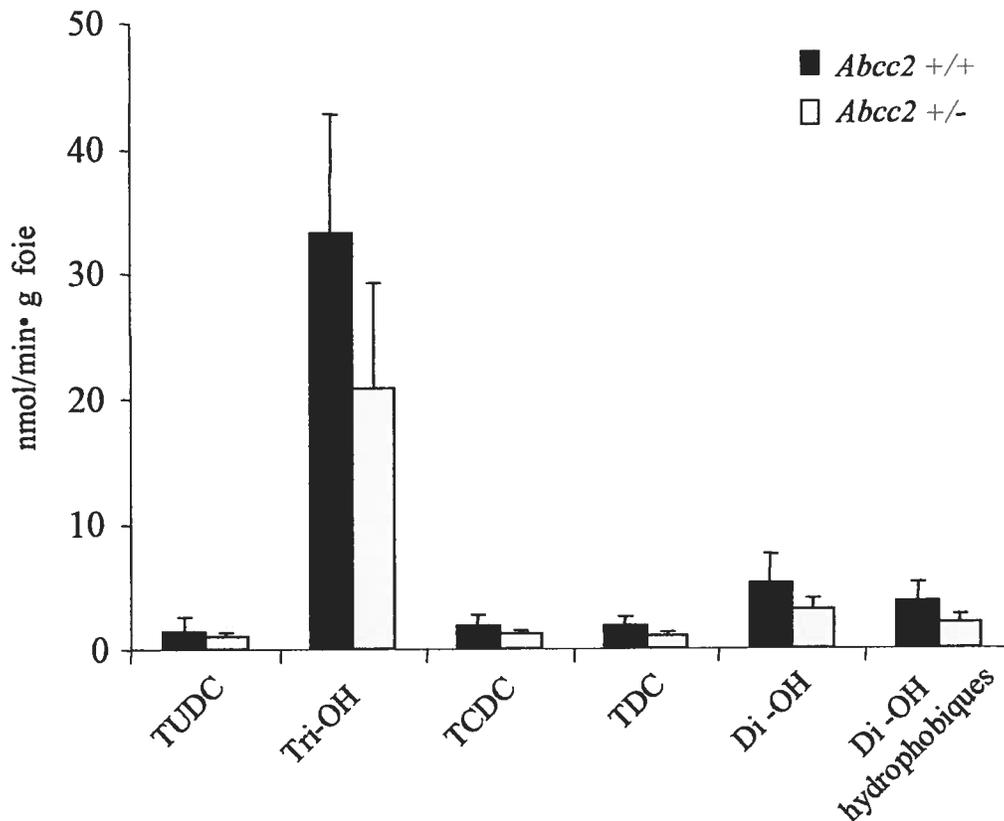


Figure 3: Profil des AB en condition basale exprimé en sécrétion. Analyse effectuée par HPLC. TUDC: Tauroursodéoxycholate, Tri-OH: AB tri-hydroxylés (incluant le TC), TCDC: Taurochénodéoxycholate, TDC: Taurodéoxycholate, Di-OH: AB di-hydroxylés et Di-OH hydrophobiques: AB di-hydroxylés hydrophobiques.

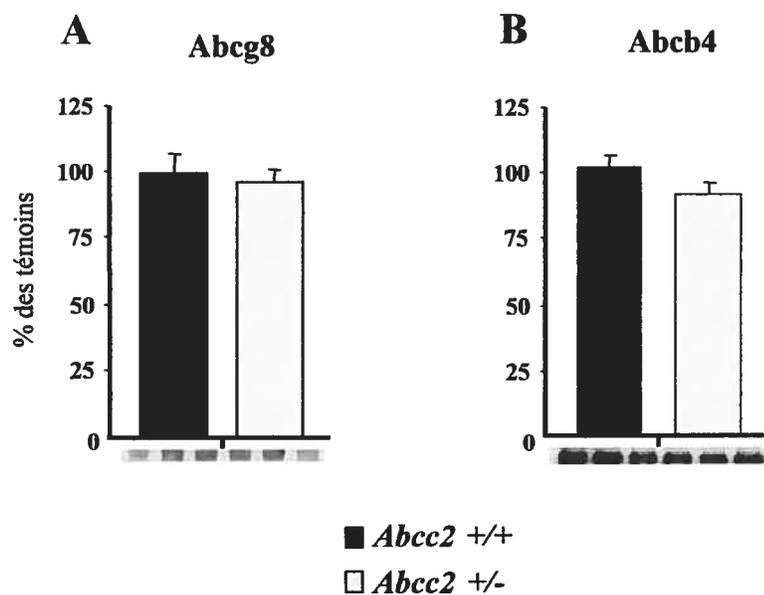


Figure 4: Expression des protéines hépatiques A) Abcg8 et B) C219. Analyse effectuée par transfert Western avec les anticorps Abcg8 (contre Abcg8 un héli-transporteur du cholestérol de Abcg5/g8) et C219 (contre Abcb1, Abcb4 et Abcb11) dans l'homogénat de foie des souris *Abcc2*<sup>+/+</sup> et *Abcc2*<sup>+/-</sup> en condition basale.

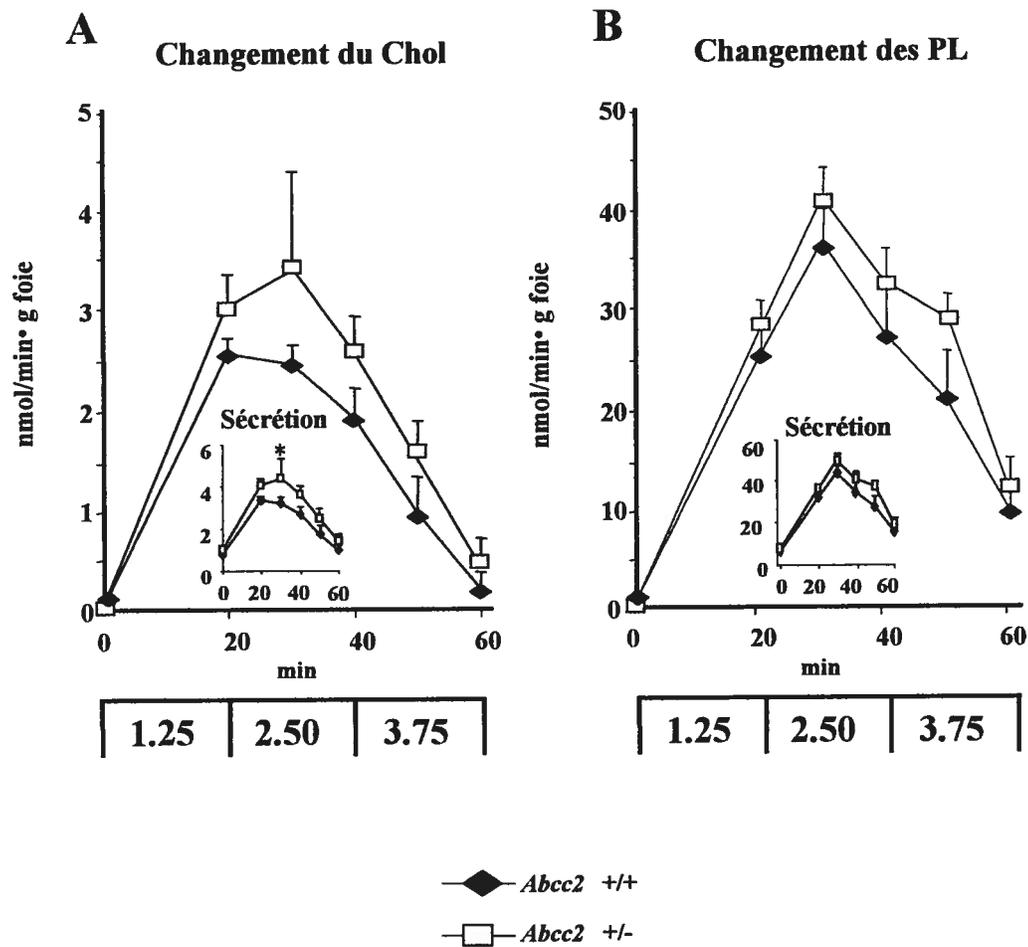


Figure 5: Taux de changement et sécrétion du A) Chol et des B) PL lors de l'infusion des doses croissantes de TC (1.25, 2.50 et 3.75  $\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g foie}$ ). La collecte biliaire a été effectuée telle que décrite dans la section matériel et méthode du chapitre 2.

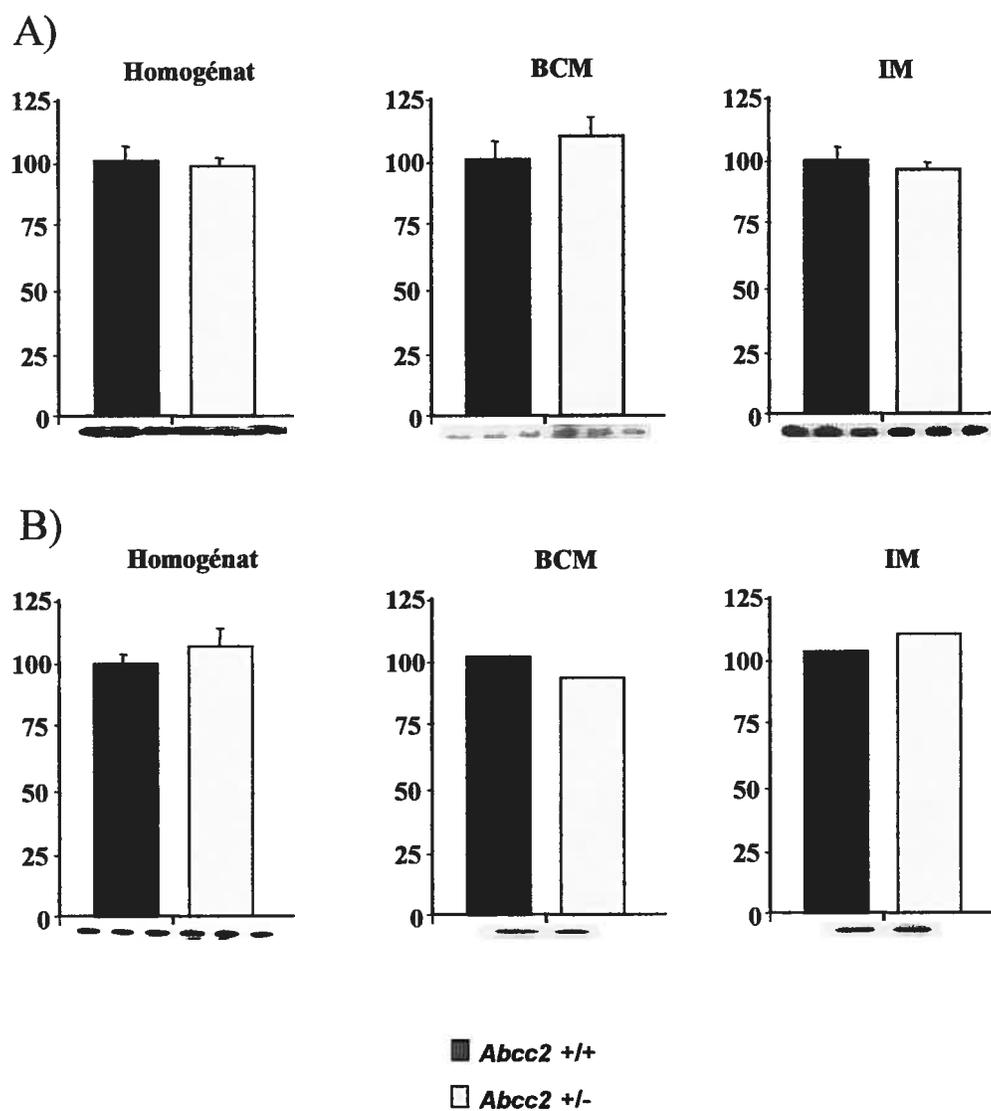


Figure 6: Analyse western des protéines HAX-1 A) en condition de base et B) d'infusion au TC. Les échantillons ont été combinés pour BCM et IM en condition d'infusion en raison de la quantité de matériel qui devenait limitante.

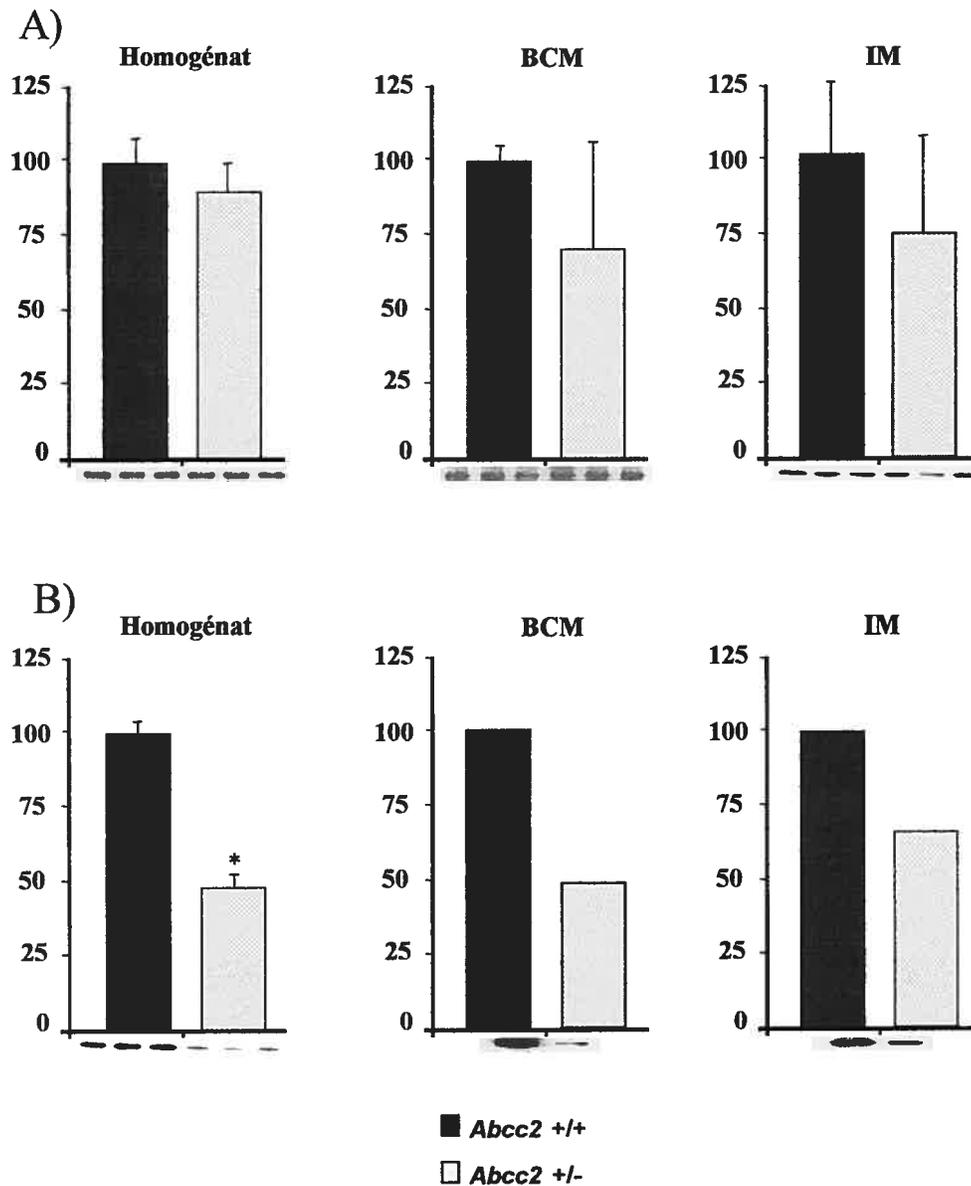


Figure 7: Analyse western des protéines ERM en condition A) de base et B) d'infusion au TC. Les échantillons ont été combinés pour BCM et IM en condition d'infusion en raison de la quantité de matériel qui devenait limitante.



Il est à noter que le titre de l'article « ABCC2 expression level modifies sensibility to acute cholestasis induced by taurocholic acid» a été modifié pour celui de «Modification of ABCC2 expression level through gene targeting exposes its role in hepatic sensitivity to acute cholestatic insult induced by taurocholic acid overload».



**DEMANDE D'AUTORISATION DE RÉDIGER PAR ARTICLES  
ANNEXE III**

**1. Identification de l'étudiant**

Stéphanie Casavant

**2. Nom de l'unité académique**

Faculté de médecine.

**3. Nom du programme**

M. Sc. Sciences biomédicales

**4. Liste des articles proposés**

Stéphanie Casavant, Ron Korstanje, Frank Lammert, Émile Levy et Guylaine Bouchard

**ABCC2 expression level modifies sensibility to acute cholestasis induced by taurocholic acid.**

L'article est en préparation et sera soumis prochainement pour une publication à la revue Hepatology. Il est à noter que toutes les expérimentations sont terminées.

**5. Signature et déclaration de l'étudiant concernant les articles**

Cet article correspond aux résultats obtenus dans le cadre du projet de recherche de ma maîtrise. J'ai donc effectué la grande majorité des travaux de recherches.  
Stéphanie Casavant

Dr Frank Lammert nous a généreusement fourni l'anticorps contre la protéine ABCC2.

Dr Ron Korstanje a terminé, alors qu'il était au Laboratoire Jackson, les croisements de notre nouveau modèle de souris (projet amorcé par ma directrice lors de son stage post-doctoral).

Dr Guylaine Bouchard (directrice) et Dr Émile Levy (co-directeur) ont développé le projet de recherche.

**6. Avis et signature du directeur de recherche**

Très favorable à la rédaction du mémoire par article, la candidate ayant effectué un travail de belle qualité méritant publication.

  
Dr Guylaine Bouchard

Nom et signature du directeur de recherche

Signature des coauteurs :

**Titre de l'article : Role of ABCC2 expression level in the cholestatic sensibility induced by taurocholic acid overload.**

A large black rectangular redaction box covers the signature area. A thin, curved line is visible above the top-left corner of the box.

---

Dr Émile Lévy, co-directeur de recherche

Signature des Co-Auteurs :

\_\_\_\_\_  
Dr. Ron Korstanje



\_\_\_\_\_  
Dr. Frank Lammert

Signature des Co-Auteurs :

[Redacted]

March 17 2006  
Dr. Ron Korstange

Dr. Frank Lammert