

2m 11. 2853.1

Université de Montréal

**L'effet de l'inactivation de *spgp*  
dans la formation biliaire chez la souris.**

Par

Myriam Salem

Département de Pharmacologie

Faculté de médecine

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

Octobre, 2000

© Myriam Salem, 2000



1.8285.1145

11/11/2001

1.8285.1145

W  
4  
U58  
2001  
v.042



11/11/2001

11/11/2001

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

**L'effet de l'inactivation de *spgp*  
dans la formation biliaire chez la souris.**

présenté par Myriam Salem

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur	Pierre Haddad
Directeur de recherche	Ibrahim Yousef
Membre du jury	Yves Théorêt

Mémoire accepté le :

*À mon guide, ma mère*

## SOMMAIRE

Le foie est autant un organe métaboliseur que sécrétoire. La bile est formée dans le foie et sécrétée au domaine canaliculaire de l'hépatocyte. La sécrétion de la bile est le résultat de l'action coordonnée de pompes membranaires qui médient le mouvement transmembranaire des molécules organiques. La sœur de la p-glycoprotéine (SPGP) est un transporteur actif retrouvé à la membrane canaliculaire de l'hépatocyte. Cette pompe a été reconnue comme faisant partie de la superfamille des transporteurs dépendants de l'ATP. Récemment, le rôle de transporteur d'acides biliaires a été attribué à cette protéine. De plus, une mutation dans le gène codant pour ce transporteur est liée à la cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 2 (CIFP 2). Afin d'investiguer les fonctions de *spgp* quant à la formation de la bile, des souris knock-out (*spgp*<sup>-/-</sup>) et hétérozygotes (*spgp*<sup>+/-</sup>) pour ce gène ont été créées par recombinaison homologue. La formation biliaire de souris des 3 différents génotypes (sauvages, hétérozygotes et homozygotes) a été étudiée.

Cette étude comporte deux parties. Dans la première, le débit biliaire, la sécrétion et la composition des acides biliaires ainsi que la sécrétion des lipides biliaires ont été investigués. Chez les souris homozygotes, le débit biliaire est légèrement diminué (de 16 %). La sécrétion des acides biliaires dans la bile est réduite de plus de 4 fois. Par contre, les acides biliaires sont accumulés dans le foie et dans le sérum où on retrouve des concentrations de 4 à 5 fois plus élevées que ce qui est retrouvé chez les souris sauvages. De plus, chez les souris *spgp*<sup>-/-</sup> on note une hausse des lipides biliaires. La bile de ces souris est caractérisée par une augmentation du pourcentage des acides muricholiques et la présence de nouveaux

acides biliaires polyhydroxylés (acides taurotétrahydroxylés). L'hydroxylation des acides biliaires agirait possiblement comme mécanisme de protection contre des dommages pouvant être induits par une accumulation de concentrations élevées d'acides biliaires hydrophobes dans le foie durant des cholestases chroniques.

Dans la seconde partie de l'expérience, nous avons étudié la sécrétion d'acides biliaires exogènes, soient l'acide taurocholique et l'acide  $\beta$ -muricholique. Ces acides biliaires sont majoritaires chez la souris. Le transport de ces acides biliaires était quasi nul chez les souris homozygotes. L'acide taurocholique était réparti majoritairement dans le foie des souris  $-/-$  ( $69,70 \pm 20,74$  %) alors qu'il était majoritairement retrouvé dans la bile des souris  $+/+$  ( $79,93 \pm 17,41$  %) et  $+/-$  ( $75,66 \pm 19,08$  %). Le phénotype des souris hétérozygotes ne présentait aucune différence significative comparativement au phénotype sauvage dans les études effectuées quant à la formation des acides biliaires et du transport d'acides biliaires exogènes.

Les souris  $spgp^{-/-}$  démontrent plusieurs signes de cholestase. Cependant, ces souris sécrètent tout de même des acides biliaires (30 % de la quantité d'acides biliaires retrouvée chez les souris  $+/+$ ). Ce résultat diffère de celui retrouvé dans la cholestase humaine associée à cette même mutation (CIFP 2) où moins de 1 % de la quantité normale d'acides biliaires est sécrétée dans la bile des patients atteints. Ces résultats suggèrent que SPGP pourrait ne pas être le seul facteur à être considéré dans la CIFP 2. De plus, d'après nos résultats,  $spgp$  serait le transporteur majeur des acides biliaires, mais d'autres transporteurs pourraient exister pour certains groupes d'acides biliaires. Ce modèle murin présente des caractéristiques intéressantes qui permettront de mieux cerner la pathologie humaine.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiii
<b><u>INTRODUCTION</u></b> .....	1
<b>1. Introduction générale</b> .....	1
1.1 Importance de la formation de la bile.....	1
1.2 Formation de la bile.....	2
<b>2. Systèmes de transport impliqués dans la formation de la bile</b> .....	7
2.1 Mécanismes de transport sinusoïdal.....	9
2.1.1 <i>Système dépendant du sodium</i> .....	9
2.1.2 <i>Systèmes indépendants du sodium</i> .....	9
2.2 Mécanismes de transport intracellulaire.....	10
2.2.1 <i>Transport en association avec des protéines</i> .....	11
2.2.2 <i>Transport médié par des vésicules</i> .....	11
2.2.3 <i>Liaison à d'autres organelles</i> .....	12
2.3 Transport canaliculaire.....	12
2.3.1 <i>La famille des transporteurs ABC</i> .....	13
2.3.1.1 <i>Les P-glycoprotéines</i> .....	14
2.3.1.2 <i>Les protéines multirésistantes</i> .....	16

<b>3. Désordres cholestatiques héréditaires associés à des mutations dans le système de transport au niveau canaliculaire.....</b>	<b>18</b>
3.1 Cholestase intermittente.....	18
3.2 Cholestase progressive.....	20
3.2.1 <i>Cholestase intrahépatique familiale progressive de type 1</i> .....	20
3.2.2 <i>Cholestase intrahépatique familiale progressive de type 2</i> .....	21
3.2.3 <i>Cholestase intrahépatique familiale progressive de type 3</i> .....	22
3.2.4 <i>Cholestase intrahépatique familiale progressive de type 4</i> .....	23
<b>4. Les souris <i>knock-out</i> et les pathologies du foie.....</b>	<b>24</b>
<b>5. Invalidation du gène <i>spgp</i>.....</b>	<b>28</b>
<b><u>OBJECTIFS</u>.....</b>	<b>30</b>
<b><u>MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>.....</b>	<b>31</b>
<b>1. Animaux.....</b>	<b>31</b>
1.1 Génération des souris <i>knock-out</i> pour le gène <i>spgp</i> .....	31
1.2 Environnement.....	33
<b>2. Expériences.....</b>	<b>33</b>
2.1 Caractérisation de l'effet de la mutation sur la formation biliaire.....	33
2.1.1 <i>Méthodologie</i> .....	33
2.1.1.1 <i>Chirurgie</i> .....	33
2.1.1.2 <i>Détermination du débit biliaire</i> .....	34
2.1.1.3 <i>Analyses du tissu hépatique</i> .....	34
2.1.1.4 <i>Analyses des acides biliaires</i> .....	35

2.1.1.5	<i>Détermination des constituants biliaires</i> .....	36
2.1.1.6	<i>Détermination des constituants sériques</i> .....	36
2.2	Caractérisation de l'effet de la mutation sur le transport d'acides biliaires exogènes.....	36
2.2.1	<i>Méthodologie</i> .....	37
2.2.1.1	<i>Chirurgie</i> .....	37
2.2.1.2	<i>Détermination du débit biliaire</i> .....	38
2.2.1.3	<i>Comptage de la radioactivité</i> .....	38
2.2.1.4	<i>Détermination des acides biliaires</i> .....	39
3.	<b>Analyses statistiques</b> .....	39
	<b><u>RÉSULTATS</u></b> .....	40
1.	<b>Création des souris par recombinaison homologue</b> .....	40
2.	<b>Caractéristiques générales</b> .....	40
3.	<b>Caractérisation de l'effet de la mutation sur la formation de la bile</b> .....	46
3.1	Caractérisation de l'effet de la mutation sur la composition en acides biliaires de la bile.....	51
3.2	Caractérisation de l'effet de la mutation sur les acides biliaires retrouvés dans le foie et dans le sérum.....	56
4.	<b>Caractérisation de l'effet de la mutation sur le transport d'acides biliaires exogènes</b> .....	58

<b><u>DISCUSSION</u></b> .....	64
<b><u>CONCLUSION</u></b> .....	72
<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	75
<b><u>ANNEXE</u></b> .....	xiv

*Targeted inactivation of Sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in non progressive but persistent intrahepatic cholestasis*

Renxue Wang, Myriam Salem, Ibrahim M.Yousef, Beatriz Tuchweber, Ping Lam, Sarah Childs, Cheryl D Hegalson, Cameron Ackerley, M. James Phillips, Victor Ling.

Proc Natl Acad Sci USA, 98 : 2011-2016.

**LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU I.	Quelques souris <i>knock-out</i> produites lors de recherches portant sur le foie.....	26
TABLEAU II.	Poids Corporel (PC) et du Foie (PF) des souris sauvages (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes (-/-) pour le gène <i>spgp</i> .....	43
TABLEAU III.	Composition du foie des souris (+/+), (+/-) et (-/-) pour le gène <i>spgp</i> .....	44
TABLEAU IV.	Paramètres plasmatiques de la fonction du foie des souris sauvages et homozygotes.....	45
TABLEAU V.	Composition des acides biliaires dans la bile de souris des 3 différents génotypes.....	53
TABLEAU VI.	Composition des acides biliaires dans le foie et le sérum de souris des 3 différents génotypes.....	57
TABLEAU VII.	Comparaison entre la mutation chez les souris ( <i>spgp</i> -/-) et chez l'homme ( <i>BSEP</i> -/-).....	74

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. Morphologie des hépatocytes et des cellules épithéliales.....	3
FIGURE 2. Systèmes de transport dans l'hépatocyte.....	8
FIGURE 3. Génération des souris <i>knock-out</i> .....	29
FIGURE 4. Recombinaison homologue entre le génome de souris sauvage et le vecteur de construction.....	32
FIGURE 5. Identification et localisation de spgp.....	42
FIGURE 6. L'analyse de la bile des 3 différents génotypes.....	47
FIGURE 7. Rapport des acides biliaires sur les lipides biliaires.....	49
FIGURE 8. Spectres des phospholipides retrouvés dans la bile des 3 différents génotypes.....	50
FIGURE 9. Composition de la bile des 3 différents génotypes.....	52
FIGURE 10. Spectre de la fragmentation de l'acide tétrahydroxylé par le GC/MS.....	55
FIGURE 11. Déplétion des acides muricholiques.....	60
FIGURE 12. Transport des acides biliaires exogènes.....	61
FIGURE 13. Distribution de l'acide taurocholique marqué dans la bile, le sang et le foie des souris des différents génotypes .....	62
FIGURE 14. Effet de l'injection d'acides biliaires exogènes sur la sécrétion biliaire.....	63
FIGURE 15. Mécanismes de transport des acides biliaires dans l'hépatocyte normal et l'hépatocyte C1FP2.....	66
FIGURE 16. Spectre de l'urine de patient atteint de cholestase néo-natale.....	69

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AB	Acides biliaires
ABC	<i>ATP-Binding-Cassette</i>
Ahr	<i>Ah receptor</i>
ALT	Alanine transférase
CA	Acide cholique
CDC	Chénodéoxycholique
CH	Cholestérol
CIFP	Cholestase intrahépatique familiale progressive
Cyp7a	<i>Cholesterol 7-<math>\alpha</math>-hydroxylase</i>
Cyp 27	<i>Sterol-27-hydroxylase</i>
DOC	Acide déoxycholique
<i>FIC1</i>	<i>Faeroe Islands Cholestasis 1</i>
GC/MS	<i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i>
GGT	Gamma-glutamyl-transférase
Il6	<i>Interleukin-6</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LC/MS/MS	<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry</i>
Lxr $\alpha$	<i>Nuclear Oxysterol receptor alpha</i>
MDR	<i>Multi-Drug Resistance protein</i>
MRP	<i>Multi-Resistance Protein</i> ou Protéines multirésistantes
ND	Non-déTECTable
NTCP	<i>Na<sup>+</sup>-dependent Taurocholate Cotransporting Protein</i>
OATP	<i>Organic Anion Transporting Polypeptides</i>
OCT	<i>Organic Cation Transporter</i>
PC	Poids corporel
PF	Poids du foie
PGP	<i>Permeability Glycoprotein</i>
PGY	<i>Permeability Glycoprotein Y</i>
PL	Phospholipides
Sf/HGF	Scatter factor/Hepatocyte Growth Factor
SPGP	<i>Sister of P-glycoprotein</i> , protéine de l'homme
<i>SPGP</i>	<i>Sister of P-glycoprotein</i> , gène de l'homme
spgp	<i>Sister of P-glycoprotein</i> , protéine de la souris
<i>spgp</i>	<i>Sister of P-glycoprotein</i> , gène de la souris
TNFR	<i>Tumor necrosis factor</i>
Urso	Ursodéoxycholique
$\beta$ -muri	Acide $\beta$ -muricholique
Muris	Acides muricholiques
Tétra	Acides tétrahydroxylé

## REMERCIEMENTS

Au terme de ma maîtrise, il m'est impossible de ne pas exprimer ma profonde reconnaissance envers mon directeur, Dr Yousef. Ses précieux conseils, sa disponibilité et son support m'ont allégé la tâche.

Merci à Dr Tuchweber pour l'esprit critique qu'elle m'a inculquée. Dr Wang, merci pour votre collaboration à mon projet.

Maurice, ton aide technique et ta bienveillance me sont inestimables.

Un merci particulier à Odette, Francine, Elizabeth et Marie-Yolaine pour vos sourires et votre serviabilité.

Joelle, ma collègue, mon amie, je ne peux imaginer ma maîtrise autrement qu'en ta compagnie.

Il n'y a pas de mots assez éloquents pour exprimer ma gratitude envers le soutien constant de chaque membre de ma famille.

Finalement, à mon fiancé, Jean-François : 'Est-ce que tu le sais?' Merci.

## **INTRODUCTION**

### **1.Introduction générale**

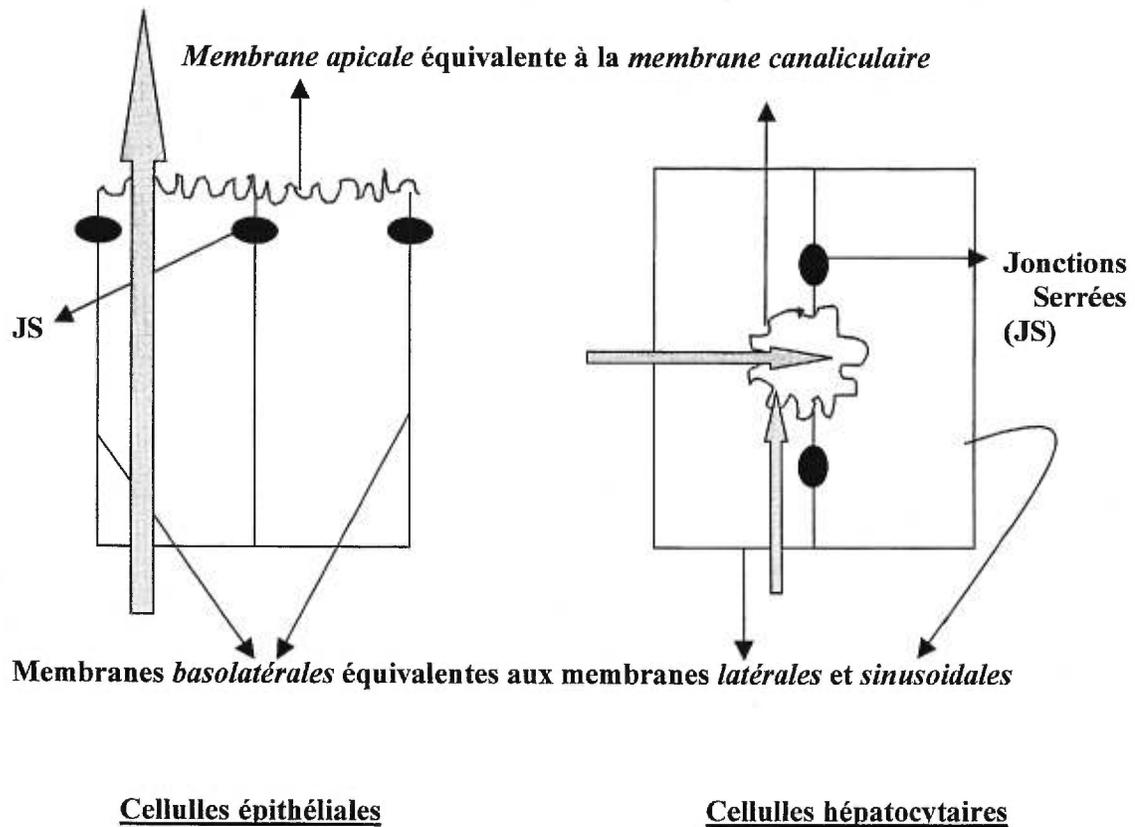
#### **1.1 Importance de la formation de la bile**

La formation de la bile est une fonction majeure et essentielle du foie des mammifères. La bile est constituée majoritairement de sels biliaires, de phospholipides, de cholestérol, de bilirubine ainsi que d'une variété de protéines. La fonction principale attribuée à la bile est l'élimination des déchets endogènes, dont la bilirubine, qui est le produit de dégradation de l'hémoglobine, et exogènes, dont les médicaments (par exemple la morphine, la sulfanilamide, qui sont respectivement un puissant analgésique et un puissant antiarythmique) et les agents toxiques (par exemple les dihaloalcane qui sont des produits cancérigènes) (Caldwell et coll., 1982). De plus, la formation de la bile est importante dans l'homéostasie du cholestérol. Le cholestérol est excrété dans la bile soit comme composé libre ou encore après sa conversion en sels biliaires primaires. Troisièmement, la bile est essentielle à la solubilisation par les sels biliaires des lipides ainsi que des vitamines liposolubles (A, D, E, K) provenant de la diète et à l'assemblage des chylomicrons (fines gouttelettes de triglycérides émulsionnées par les acides biliaires). Ces deux processus sont requis pour obtenir une absorption efficace des lipides et des vitamines liposolubles par les entérocytes dans l'intestin (Vander et coll., 1977). Ainsi le maintien de la formation biliaire est non seulement essentielle pour le bon fonctionnement du foie mais aussi pour l'organisme entier (Koopen, 1999) .

## 1.2 Formation de la bile

Les hépatocytes qui représentent le type cellulaire majeur du foie en terme quantitatif, sont le lieu de formation de la bile (Tavaloni, 1987). À l'instar des cellules épithéliales, les hépatocytes sont des cellules polarisées (Zegers et Hoekstra, 1998). Leur membrane basolatérale (ou sinusoidale) fait face au sang et leur membrane apicale (ou canaliculaire) fait face à la bile. Afin de maintenir cette polarisation dans les deux types de cellules, des jonctions serrées empêchent le mélange des composants lipidiques et protéiniques de chacun des domaines distincts. Le domaine canaliculaire de cellules hépatiques adjacentes est scellé par des jonctions serrées à travers lesquelles, à partir du sang, seuls les électrolytes et l'eau peuvent passer. Ces jonctions sont imperméables aux grosses molécules (Zegers et Hoekstra, 1998). Ainsi, afin d'être sécrétés dans la bile, la plupart des composés doivent traverser les hépatocytes. La membrane canaliculaire entoure le canalicule biliaire, le petit canal formé entre des hépatocytes adjacents (Figure 1).

La bile est sécrétée par les hépatocytes dans de nombreux petits canaux, ces canalicules se déversent dans les petits conduits biliaires qui, à leur tour, alimentent les grands conduits biliaires. Ces conduits biliaires convergent pour former la voie biliaire commune (ou encore le canal cholédoque) qui s'abouche finalement dans le duodénum (Lamers et coll., 1989). Chez les humains et les souris la vésicule biliaire se trouve en dérivation de la voie biliaire commune. Via la vésicule ou encore le canal cholédoque, la bile se déverse dans l'intestin suite à l'ingestion de lipides.



**FIGURE 1. Morphologie des hépatocytes et des cellules épithéliales**

Dans les hépatocytes, le domaine membranaire canaliculaire, qui correspond à la membrane apicale des cellules épithéliales, est ceint de deux cellules adjacentes et sert de pôle sécrétoire de la bile. Les domaines sinusoidal et latéral sont les homologues hépatiques de la surface basolatérale des cellules épithéliales et font face au sang et aux cellules avoisinantes respectivement. Les flèches pleines représentent la polarité (vers la lumière) dans les 2 types cellulaires. (Figure adaptée de Zegers, M.M.P. et Hoekstra, D., 1998)

Le foie est le site de synthèse des acides biliaires. Les hépatocytes synthétisent les acides biliaires à partir du cholestérol. Le cholestérol libre (non-estérifié), provenant soit de la biosynthèse *de novo* ou encore du cholestérol exogène capté par les récepteurs des lipoprotéines, sert de substrat à deux voies majeures d'excrétion du cholestérol; la sécrétion du cholestérol dans la bile et la biosynthèse des acides biliaires primaires tels l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique. La composition des acides biliaires varie d'une espèce à l'autre. Cependant, chez la plupart des mammifères les acides cholique et chénodésoxycholique sont les principaux acides biliaires primaires (Danielson et coll., 1973). La structure des sels biliaires peut être modifiée par des interactions avec des bactéries intestinales qui, à partir des sels biliaires primaires, forment des sels biliaires secondaires (Carey et Duane, 1994). De plus, la structure des acides biliaires peut être modifiée à nouveau, lorsque ceux-ci retournent au foie pour former les acides biliaires tertiaires (Carey et Duane, 1994). De cette manière une grande variété d'espèces de sels biliaires peut être produite. Chez la souris les acides biliaires sont constitués à 95 % des acides choliques et muricholiques (plus spécifiquement de l'acide  $\beta$ -muricholique qui provient de l'acide chénodésoxycholique modifié dans le foie) ((Danielson et coll., 1973). Les acides biliaires sont conjugués à la taurine et à la glycine avant d'être excrétés dans le canalicule biliaire (Vlahcevic et coll, 1999). Cette conjugaison est importante pour une sécrétion efficace des sels biliaires dans la bile mais elle est aussi importante quant à leur rôle dans la digestion lipidique (Hofmann et Roda, 1984). Les sels biliaires sont réabsorbés dans l'intestin par les entérocytes et retournés au foie par la veine porte afin d'être utilisés à nouveau dans la sécrétion biliaire, complétant ainsi le cycle entérohépatique (Carey et Duane, 1994). Par ce cycle, certaines substances comme les sels biliaires peuvent être dirigés à nouveau

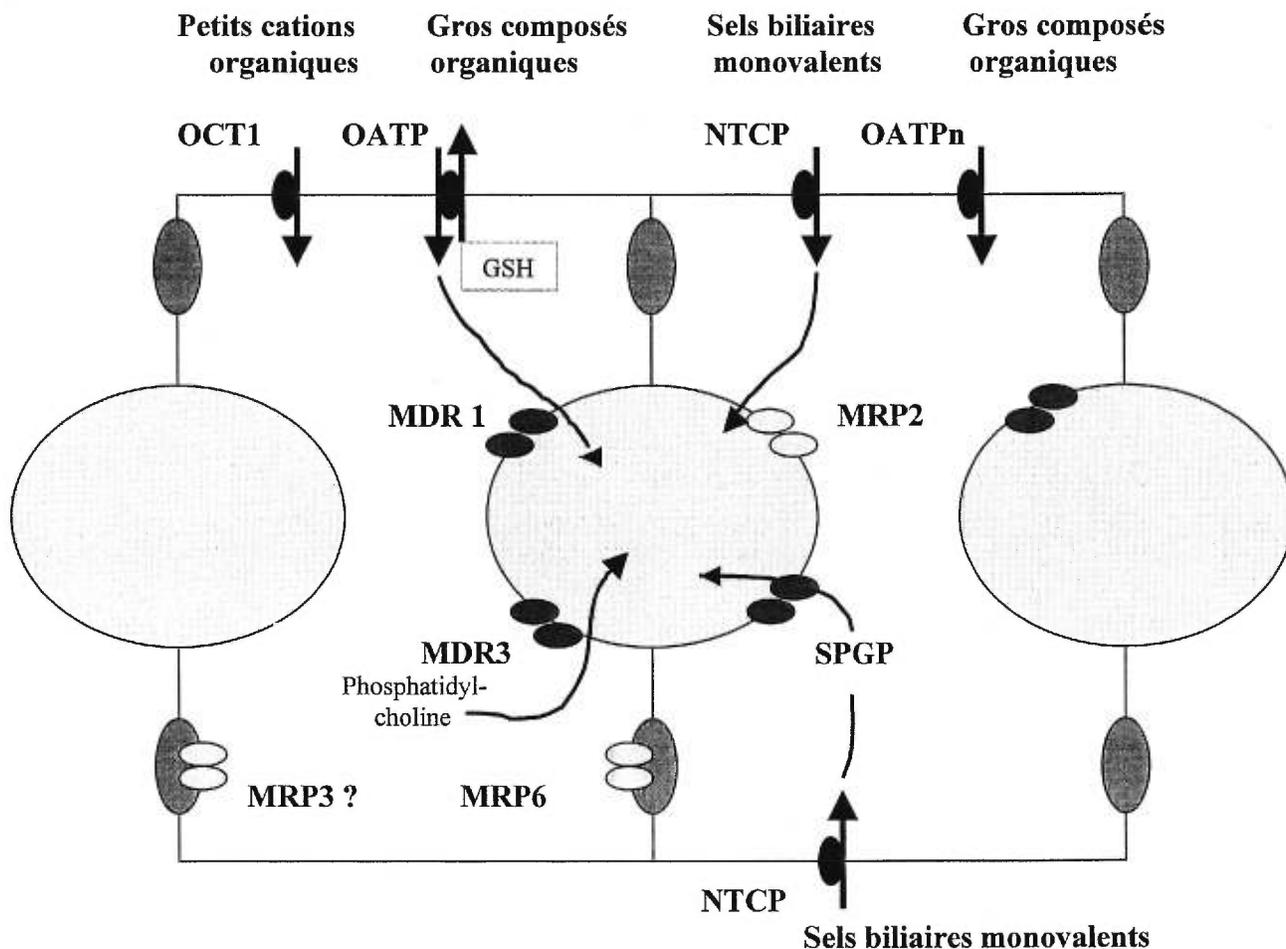
vers l'intestin et être recyclés plusieurs fois. Le transport hépatocellulaire des sels biliaires du sang à la bile est le stimulant osmotique principal du flux biliaire et ce transport vectoriel des sels biliaires est médié par différents transporteurs actifs spécifiques (Nathanson et Boyer, 1991; Meier, 1997; Müller et Jansen, 1999)

Les composants biliaires sont activement transportés dans le canalicule. Les processus de transport créent une force osmotique qui attire l'eau et quelques ions du sang à travers les jonctions serrées jusque dans le canalicule. Cette force osmotique comprend 2 composantes majeures. La première, la fraction du flux biliaire dépendante des acides biliaires, est générée par la sécrétion des acides biliaires dans le canalicule. La seconde représente ce qu'on appelle la fraction du flux biliaire indépendante des acides biliaires (Bahar et Stolz, 1999). Elle ne devient apparente que si hypothétiquement on considère la sécrétion des acides biliaires comme étant nulle. Cette fraction peut être expliquée par la sécrétion active du glutathion qui représente la force osmotique majeure de ce flux (Ballatori et Truong, 1992). Il est aussi bien connu que cette fraction du flux biliaire contribue de façon importante au débit biliaire total (Boyer, 1980). Chez le rat, cette fraction est évaluée à environ 50% du débit total et chez l'homme elle est évaluée à plus de 40 % (Boyer, 1980). Le débit biliaire indépendant des acides biliaires a été démontré chez plusieurs espèces animales (Erlinger, 1988). En plus de la sécrétion des solutés et le flux causé par l'eau, des contractions mécaniques de la membrane canaliculaire, par les filaments d'actine, augmentent le flux biliaire en resserrant le canalicule (Tsukada et coll., 1994). Le processus physiologique de la sécrétion biliaire a été étudié de manière exhaustive ces dernières années. Une altération des systèmes de transport hépatique des acides biliaires peut résulter en une accumulation de ces acides dans le

foie et éventuellement en leur débordement potentiel du foie vers la circulation systémique (Bouscarel et coll., 1999). L'accumulation dans le foie d'acides biliaires potentiellement toxiques et ayant une action détergente mène aux dommages cellulaires et au malfonctionnement hépatique.

## 2. Systèmes de transport impliqués dans la formation de la bile

Afin de maintenir la circulation entérohépatique des acides biliaires et permettre le transport d'une grande variété de composés endogènes et exogènes, le foie contient un grand nombre de protéines de transport (Meier, 1997; Müller, 2000) (Figure 2). L'extraction des acides biliaires de la circulation portale a lieu à la membrane sinusoidale (basolatérale) par un processus actif. Chez les hépatocytes de mammifères, deux systèmes de transport des acides biliaires se retrouvent à la membrane sinusoidale (Meier, 1997). Le premier dépend du sodium alors que le second fonctionne indépendamment du sodium. Ayant atteint le compartiment intracellulaire les acides biliaires le traversent grâce à des protéines de liaison intracellulaires ou encore grâce à un processus médié par les vésicules membranaires. À la membrane canaliculaire, plusieurs transporteurs dépendant de l'ATP les prennent en charge. On peut les catégoriser en 2 sous-familles (discutées en détail dans la section suivante) : les glycoprotéines de type P ou P-glycoprotéines (*Permeability glycoproteins*) et les MRP (*Multidrug Resistance Proteins*), les protéines qui confèrent la résistance à plusieurs médicaments (Müller et Jansen, 1999). D'autres transporteurs indépendants de l'ATP existent aussi comme les ecto-ATPases, ainsi qu'un certain transport dépendant du sodium qui serait réservé aux purines (Kooen, 1999). Cependant, leurs rôles ne sont pas encore tout à fait élucidés.



**FIGURE 2. Systèmes de transport dans l'hépatocyte**

L'OCT 1, l'OATP, le NTCP sont des transporteurs situés à la membrane basolatérale effectuant le transport de petits cations organiques, de composés organiques de grands poids moléculaire et d'acides biliaries monovalents respectivement. À la membrane canaliculaire sont localisés MDR 1, MRP 2 et MDR3. Ce dernier est impliqué dans le transport des phospholipides alors que SPGP, aussi retrouvé à ce niveau, est impliqué dans le transport des acides biliaries. (Figure adaptée de Müller, M, [www.med.rug.nl/mdl/slide/sld001.htm](http://www.med.rug.nl/mdl/slide/sld001.htm) (1998))

## **2.1 Mécanismes de transport sinusoïdal**

### **2.1.1 *Système dépendant du sodium***

Les acides biliaires sont activement captés à la membrane sinusoïdale par un système de transport spécifique qui permet l'entrée des acides biliaires en conjonction du sodium dans la cellule. Le gradient de sodium requis pour ce transport est généré par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase présente en abondance à la membrane sinusoïdale. Le transporteur dépendant du  $\text{Na}^+$ , le NTCP (*Na<sup>+</sup>-dependent Taurocholate Cotransporting Protein*) a été cloné chez l'homme et chez la souris (ntcp) où il est exclusivement exprimé sur la membrane basolatérale. NTCP capte majoritairement des acides biliaires trihydroxylés, conjugués à la glycine ou à la taurine. Puisque ces acides biliaires sont les plus hydrophiles et sont des espèces chargées, le transport couplé au  $\text{Na}^+$  fournit assez d'énergie pour que leur mouvement passif à travers la membrane lipidique soit défavorisé (Bahar et Stolz, 1999). La régulation à la baisse de ce transporteur, dans certaines maladies cholestatiques, résulte de la rétention de constituants biliaires et protège l'hépatocyte contre d'autres accumulations d'acides biliaires toxiques (Gartung et coll., 1996).

### **2.1.2 *Systèmes indépendants du sodium***

Le second système de transport d'anions organiques cloné chez l'homme et la souris est l'OATP (*Organic Anion Transporting Polypeptides*). L'OATP transporte des acides biliaires de manière non-spécifique (indépendamment de la charge) mais aussi un large spectre de molécules amphipatiques ayant des structures différentes. De plus, l'OATP est un transporteur bidirectionnel suggérant son implication comme

pompe dans des conditions pathologiques associées à la cholestase (Shi et coll., 1995). Il existe plusieurs isoformes d'OATP dans le foie dont les spécificités diffèrent selon les substrats. Ces transporteurs jouent un rôle très important quant à la clairance hépatique des médicaments. L'OATP 1 est le premier membre de la famille des OATP à avoir été cloné. Il médie le transport, indépendant du sodium, d'anions organiques, de sels biliaries, de conjugués stéroïdiens, de stéroïdes neutres et d'une variété de peptides (Wolkoff et coll., 1998). Ce système de transport est possible grâce au contre-transport de glutathion (sortie de glutathion de la cellule).

Les petits cations organiques sont captés par des protéines de la famille des OCT (*Organic Cation Transporter*). L'OCT 1 est un système relativement spécifique d'extraction des petits médicaments cationiques ou encore des neurotransmetteurs monoaminés comme la dopamine ou l'histamine (Koepsell, 1998).

Finalement, jusqu'à un certain point les acides biliaries (non-conjugués) peuvent traverser la membrane passivement. Cette diffusion passive est proportionnelle à l'hydrophobicité des acides biliaries (Müller et Jansen, 1999; Van Dyke et coll., 1982).

## **2.2 Mécanismes de transport intracellulaire**

Une fois qu'ils ont traversé la membrane sinusoïdale, les acides biliaries doivent atteindre la membrane canaliculaire. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour faciliter le mouvement transcellulaire des acides biliaries vers la membrane

canaliculaire. Les acides biliaires peuvent être transportés à travers la cellule associés à plusieurs protéines (Stolz et coll., 1987), grâce à des vésicules liées aux microtubules (Erlinger, 1996) ou encore associés à d'autres organelles (Bouscarel et coll., 1999)

### ***2.2.1 Transport en association avec des protéines***

Les acides biliaires peuvent être transportés à travers la cellule en association avec de petites protéines cytosoliques comme la glutathion S-transférase, la 3 $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase ainsi que des protéines qui peuvent se lier à divers anions organiques, y compris les acides biliaires, mais qui préfèrent les acides gras (Bahar et Stolz, 1999). Le rôle de ces protéines n'est pas complètement connu mais au moins deux fonctions ont été proposées. En premier lieu, la liaison à ces protéines peut minimiser le reflux des acides biliaires à travers la membrane sinusoïdale et diriger les acides biliaires vers une voie spécifique. En second lieu cette liaison peut diminuer la toxicité liée aux acides biliaires intracellulaires (Bouscarel et coll., 1999).

### ***2.2.2 Transport médié par des vésicules***

Cette hypothèse est controversée (Reynier et coll., 1992) mais Erlinger a proposé en 1996 que les acides biliaires traversent l'espace intracellulaire grâce à des vésicules associées aux microtubules. Ceci découle d'une étude qui démontre une réduction de la sécrétion d'acides biliaires dont l'acide taurocholique, lorsqu'on perturbe la formation de microtubules avec des concentrations élevées de vinblastine

ou de colchicine (Crawford et coll., 1988; Dubin et coll., 1980; Haussinger et coll., 1993). Les expériences avec ces inhibiteurs de microtubules démontrent que la sécrétion des lipides biliaires dépend du transport vésiculaire. Cependant ni la nature ni la route du transport intracellulaire de ces vésicules n'est élucidé avec certitude (Zegers et Hoekstra, 1998). Les microtubules pourraient être impliqués dans l'insertion des vésicules dans la membrane canaliculaire.

### **2.2.3 Liaison à d'autres organelles**

En plus de leur interaction avec des protéines cytosoliques les acides biliaires peuvent aussi être liés à des organelles comme les mitochondries, les microsomes, l'appareil de Golgi, les vésicules dérivées du Golgi et du réticulum endoplasmique (Bouscarel et coll., 1999). Le rôle exact de ces organelles et d'autres comme les lysosomes dans le transport vectoriel des acides biliaires à travers les hépatocytes n'est pas encore connu.

## **2.3 Transport canaliculaire**

La sécrétion canaliculaire des acides biliaires représente l'étape limitante du transport des acides biliaires du sang vers la bile (Erlinger, 1993). Cette sécrétion a d'abord été considérée comme étant dépendante du potentiel électrique entre le cytoplasme de l'hépatocyte et la lumière canaliculaire (Meier et coll., 1984). Cependant, le gradient de concentration des acides biliaires dans le canalicule est trop élevé pour que leur sécrétion ne soit due qu'à cette caractéristique de la

membrane (Arias et coll., 1993). Adachi et coll. (1991) ainsi que Nishida et coll., (1991) ont été les premiers à démontrer, dans des travaux effectués séparément, l'existence d'un système de transport actif primaire (directement dépendant de l'hydrolyse d'ATP) et spécifique pour la sécrétion canaliculaire des acides biliaires. Ils ont démontré que la capture de l'acide taurocholique par les membranes vésiculaires canaliculaires de rats peut être fortement stimulée par l'addition d'ATP. Cette observation a par la suite été confirmée dans les membranes de foie humain par Wolters et coll. en 1992.

Les acides biliaires sont donc excrétés dans la bile au pôle canaliculaire de l'hépatocyte et ce, contre un grand gradient de concentration (Meier et coll., 1984) estimé à 100 à 1000 fois la concentration d'acides biliaires retrouvée dans le cytoplasme (Carey et Duane, 1994). Plusieurs transporteurs ont été, par la suite, identifiés, comme étant impliqués dans l'excrétion canaliculaire des constituants biliaires. La force motrice de la sécrétion de la bile dans le foie est largement due à des protéines faisant partie de la famille des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) qui résident dans la membrane canaliculaire et effectuent le transport ATP-dépendant des acides biliaires, des phospholipides et des anions organiques qui ne sont pas des acides biliaires (Ortiz et coll., 1999).

### **2.3.1 La famille des transporteurs ABC**

La famille des transporteurs ABC est la plus grande identifiée jusqu'à maintenant, plus de 400 membres ont été caractérisés (incluant 47 encodés dans le génome humain) (Strautnieks et coll., 1998; Müller, 2000). Des mutations dans cette

famille de transporteurs ont été associées à diverses maladies (Allikmets et coll., 1996). Les transporteurs ABC ont tous en commun un domaine intracellulaire liant l'ATP et quelques domaines transmembranaires qui déterminent la spécificité du type de molécule transportée (Dean et Allikmets, 1995). La majorité des protéines appartenant à la superfamille des ABC catalysent la translocation dépendante de l'ATP de substrats endogènes et exogènes à travers des membranes biologiques. Cette superfamille se sous-divise en deux grandes sous-familles à la membrane canaliculaire, les PGP et les MRP (Müller et Jansen, 1999).

#### 2.3.1.1 *Les P-glycoprotéines (Pgp)*

Les Pgp constituent une famille de protéines de transport ayant la capacité de transporter une grande variété de composés (lipides, cations organiques, polypeptides) et surtout des médicaments utilisés dans le traitement de divers cancers comme la vincristine, la vinblastine, le paclitaxel, et le tamoxifène (Lecureur et coll., 2000). Ce large spectre de substrats reflète l'existence d'isoformes de Pgp qui ont évolué vers divers rôles. La sous-famille des Pgp comporte les produits des gènes humains MDR1 et MDR3 ainsi que leurs homologues *mdr1a*, *mdr1b* et *mdr2* chez les rongeurs (ces derniers sont pourvus de 2 gènes *mdr1*). Les cliniciens oncologistes ont été les premiers à observer le phénomène de résistance aux médicaments. En effet, les cellules tumorales traitées avec des médicaments anticancéreux ont tendance à développer une résistance même contre des agents cytotoxiques auxquels elles n'ont pas été exposées. Ceci peut être dû à la surexpression d'une certaine protéine ou encore à une mutation dans certaines protéines qui permet aux cellules cancéreuses de survivre malgré la présence

d'agents cytotoxiques (Ling, 1997). MDR1, comme certains autres membres de la famille des transporteurs ABC, joue un rôle protecteur en favorisant l'extrusion de xénobiotiques à travers la membrane cytoplasmique en modifiant la localisation de substrats potentiellement toxiques (Ling, 1997). MDR1 transporte la plupart des composés hydrophobes (basiques) sans spécificité structurale ainsi que certains anions métaboliques et des médicaments cationiques chargés de façon permanente. Son rôle quant à la formation de la bile n'est pas tout à fait déterminé. Cependant, MDR1 serait responsable du transport des phospholipides à chaînes courtes dans la membrane canaliculaire (Van Helvoort et coll., 1996). MDR1 est exprimé dans le foie mais aussi dans le cerveau et l'intestin grêle (Oude Elferink et coll., 1995a; Nies et coll., 1996). Le transporteur MDR3 et son homologue murin *mdr2* sont responsables du transport de la phosphatidylcholine du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane canaliculaire. Une mutation dans ce transporteur mène à la cholestase progressive familiale de type 3 dont il sera question plus loin. MDR3 ne confère pas de résistance aux cellules cancéreuses (Oude Elferink et coll., 1995b).

Récemment, un autre membre de la famille des Pgp, *spgp*, a été cloné, en partie par Childs et coll. (1995), du foie de cochon. Gerloff et coll. (1998) ont ensuite cloné la séquence entière de *spgp* à partir du foie de rat. Le gène de rat n'est exprimé qu'à la membrane canaliculaire (Strautnieks et coll., 1998). Green et coll. (2000) ont fonctionnellement exprimé *spgp* murin dans 2 systèmes distincts et ont confirmé que celui-ci agissait comme un transporteur d'acides biliaires. Ce transporteur est similaire entre différentes espèces, comme le rat, la souris et l'homme. Cependant, la composition en sels biliaires de la bile diffère significativement entre ces espèces, chacune ayant ses propres mécanismes de synthèse des sels biliaires (Mazer et Carey,

1984). De tous les gènes de mammifères, *SPGP* montre le plus d'homologie pour *PGYI* et *PGYIII*, dont les produits sont appelés p-glycoprotéines. De ceci découle le nom attribué à *SPGP* soit '*Sister of P-glycoprotéin*' (Strautnieks et coll., 1998). Ce gène est aussi connu sous le nom de *BSEP* (*Bile Salt Export Pump*). Une mutation dans le transporteur *SPGP* est liée au type 2 de la cholestase intrahépatique familiale progressive (Strautnieks et coll., 1998). In vitro, Strautnieks et coll., (1998) ont démontré que *spgp* (rat) transporte des conjugués d'acides biliaires de mammifères pour lesquels il a une haute affinité. En plus de la cholestase intrahépatique de type 2, *SPGP* serait impliqué dans un certain nombre de désordres cholestatiques incluant la cholestase de la grossesse et la cholestase induite par des médicaments (Strautnieks et coll., 1998).

#### 2.3.1.2 *Les protéines multirésistantes (MRP)*

Contrairement aux P-glycoprotéines, les protéines multirésistantes transportent activement des anions organiques conjugués (Kusuhara et coll., 1998). Le transport d'agents chimiothérapeutiques non-conjugués semble nécessiter le co-transport de glutathion. Il existe plusieurs isoformes du transporteur *MRP* soit *MRP1*, *MRP2*, *MRP3*, *MRP4*, *MRP5* et *MRP6* (Kool et coll., 1997). *MRP1* est localisé dans les membranes latérales de cellules hépatocytaires adjacentes et son expression est basse dans les hépatocytes normaux. *MRP2* (aussi appelé *cMOAT* et *cMRP*) permet la sécrétion des conjugués sulfatés glucuronidés et des conjugués avec le glutathion. Il est responsable du flux qui ne dépend pas des acides biliaires. Il permet l'excrétion d'un grand nombre de composés dont la pravastatine (Yamazaki et coll., 1996), l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les antagonistes de

l'endothéline et les médicaments utilisés dans le traitement du cancer comme le méthotrexate. Cependant, même si MRP2/mrp2 médie l'excrétion canaliculaire d'une vaste variété de conjugués anioniques amphipatiques divalents (Oude Elferink et coll., 1995b; Keppler et König, 1997), il ne transporte pas d'acides biliaires primaires comme l'acide taurocholique ou glycocholique (Oude elferink et coll., 1995a; Madon et coll.,1997). Le syndrome de Dubin-Johnson qui cause de l'hyperbilirubinémie due à une diminution de la sécrétion des glucuronides de bilirubine (Kartenbeck et coll., 1996; Paulusma et coll., 1997; Wada et coll., 1998) est associé à une délétion d'un seul nucléotide de ce transporteur.

Ortiz et coll. (1999) ont depuis peu suggéré l'implication de MRP 3, cloné chez le rat, dans le transport des acides biliaires au niveau canaliculaire. Cependant , la localisation de ce transporteur n'est pas encore tout à fait élucidée puisque König et coll. (1999), ont suggéré la localisation au niveau basolatéral de ce transporteur, chez l'homme. Les autres isoformes de cette famille sont encore sous investigation afin de les situer au niveau cellulaire mais aussi pour caractériser leurs rôles respectifs.

### **3. Désordres cholestatiques héréditaires associés à des mutations dans le système de transport au niveau canaliculaire**

La cholestase peut se définir comme étant un manque de production de bile ou de flux biliaire dans l'intestin (Strautnieks et coll., 1998). La production normale de bile requiert le transport de ses constituants dans le canalicule biliaire. La cholestase peut se produire à cause d'un processus moléculaire spécifique qui serait défectueux ou serait la cause secondaire d'une anomalie structurale tel qu'un dommage à l'hépatocyte ou un dommage au canalicule biliaire (Strautnieks et coll., 1998). Les cholestases dont il sera question en détail ci-dessous sont présumément causées par des défauts dans des processus moléculaires spécifiques et ne sont pas la cause secondaire d'une anomalie structurale.

#### **3.1 Cholestase intermittente**

La première forme de cholestase, la cholestase récurrente bénigne ou encore le syndrome de Summerskill, a été décrite en 1959 (Summerskill et Walshe, 1959). Elle se manifeste par des épisodes, de durées variables, allant de quelques semaines à plusieurs mois. Ceux-ci cessent spontanément et ne progressent pas vers des lésions chroniques du foie ni vers une cirrhose malgré les crises récurrentes (Erlinger, 1999). L'activité sérique de la gamma-glutamyl transférase (GGT) est normale ou peu augmentée lors de ces épisodes mais on remarque une hausse considérable d'acides biliaires sériques au début de chaque épisode (Van Berge et coll., 1974). Durant les attaques les patients sont atteints de jaunisse sévère, de prurit, de stéatorrhée et perdent du poids.

L'implication du gène *FIC1* (*Faeroe Islands Cholestasis 1*), situé sur le bras long du chromosome 18 en position 18q21-22 (Houwen, et coll., 1994), dans la cholestase récurrente bénigne a été décrite en 1994. Ce même gène est aussi impliqué dans la cholestase familiale progressive de type 1 (CIFP 1) dont il sera question plus loin (Bull et coll., 1998). Dans le cas de CIFP 1, les mutations mènent à l'abolition complète de l'activité du gène, alors que dans la forme moins sévère de cholestase, la cholestase récurrente bénigne intermittente, les mutations ne mènent qu'à une inactivation partielle de l'activité du gène (Erlinger, 1999). L'enzyme codée par ce gène est un membre de la famille des ATPase de type P, qui ne font pas partie de la famille des transporteurs ABC. Elle appartient à une large famille encodant majoritairement des pompes transportant des ions comme la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase et la  $\text{Ca}^{++}$ ATPase.

La fonction de *FIC1* est incertaine et le lien entre ce gène et la cholestase n'est pas encore clair. Dans le foie, la protéine n'est pas fortement exprimée et est localisée dans les cholangiocytes et non dans les hépatocytes (Mutero et coll., 1998). Son rôle probable est la translocation des aminophospholipides (phosphatidyl sérine et phosphatidyl éthanolamine) du feuillet externe au feuillet interne de la membrane plasmique. Plusieurs hypothèses sont émises par Erlinger (1999) quant à la perte de fonction d'une telle enzyme. Une des hypothèses suggérées est que le déficit en aminophospholipides peut compromettre la fonction des transporteurs canaliculaires ou peut être indispensable à l'insertion correcte des transporteurs canaliculaires, notamment celui des acides biliaires. Tang et son équipe (1996) suggèrent que l'ATPase de type P soit un transporteur d'ions, ou même d'acides biliaires. Ils spéculent sur le rôle de la protéine ATPase de type P suggérant une possible

implication de celle-ci dans le débit des acides biliaires. Cependant, les observations morphologiques seules ne peuvent suffir à justifier cette hypothèse. D'ailleurs Luther et coll. (1997) démontrent une très faible expression de l'ecto-ATPases dans des hépatocytes de rat où le transport de taurocholate dépendant de l'ATP est élevé. Ces résultats suggèrent donc l'existence de protéines dépendant de l'ATP autre que l'ATPase de type P.

### **3.2 Cholestase progressive**

La cholestase intrahépatique familiale progressive (CIFP) représente un groupe de maladies héréditaires, autosomales récessives, caractérisées par une diminution du flux biliaire (Strautnieks et coll., 1998). La CIFP est un groupe hétérogène de maladies avec diverses manifestations cliniques et diverses étiologies incluant des défauts au niveau du transporteur hépatocanaliculaire des acides biliaires ou des phospholipides ainsi que des défauts dans la synthèse d'acides biliaires. C'est une maladie du foie affectant les enfants en bas âge. En plus de la cholestase, elle est caractérisée par un taux normal ou élevé de gamma-glutamyl-transférase (Jansen et coll., 1999).

#### **3.2.1 Cholestase intrahépatique familiale progressive de type 1**

CIFP 1 ou encore la maladie de Byler, a été décrite en 1969 (Clayton, et coll., 1969). Elle se caractérise par un retard de croissance, par une hépatosplénomégalie, par un prurit sévère et par une stéatorrhée. Ces deux dernières manifestations apparaissent dès la première année, alors que la fibrose qui accompagne la maladie

est progressive (Erlinger, 1999). Cette maladie débute par des épisodes cholestatiques intermittents qui sont similaires à ceux retrouvés en cholestase récurrente bénigne et partage le même locus sur le chromosome 18 que cette dernière. Par contre, la CIFP 1 progresse ensuite vers une cholestase permanente avec de la fibrose et de la cirrhose nécessitant une transplantation hépatique dans les 10 premières années de la vie. De manière caractéristique, l'activité de la GGT sérique n'y est pas accrue alors que la concentration des acides biliaires sériques est grandement augmentée (Erlinger, 1999; Jansen et Müller, 2000).

### ***3.2.1 Cholestase intrahépatique familiale progressive de type 2***

La CIFP 2 se manifeste encore plus sévèrement que le premier. Le gène muté attribué à cette maladie a été récemment localisé sur le chromosome 2 en position 2q24 (Strautnieks et coll., 1996). Spgp, qui est le produit du gène, a été cloné chez le rat puis chez l'homme et ensuite chez la souris. Spgp de la souris possède 94% d'homologie avec celle du rat et 89% d'homologie avec celle de l'homme. Cette protéine, de 1321 acides aminés, est spécifique au foie et est localisée au domaine canaliculaire de la membrane hépatocytaire et appartient à la superfamille des transporteurs ABC (Jansen et coll., 1999). Jansen et son équipe (1999) ont démontré que chez les patients de type 2, SPGP n'est pas présente et que tous ces patients avaient une mutation dans le gène *SPGP*. Comme chez les patients atteints de CIFP de type 1 l'activité sérique de la GGT est normale. Cependant, contrairement à la CIFP 1 les patients sont en état de jaunisse permanente et la maladie progresse rapidement vers une cholestase persistante qui requiert une transplantation du foie. Les personnes atteintes de cette maladie ont une correction complète du phénotype

suite à une transplantation hépatique et n'ont pas de manifestations extrahépatiques. Ainsi, ils ont un phénotype concordant avec un défaut restreint au transport des acides biliaires à la membrane canaliculaire (Strautnieks et coll., 1998). Les patients ne répondent pas au traitement habituel qui consiste en l'administration de l'acide ursodéoxycholique. L'administration d'un acide biliaire exogène confirme que le défaut primaire chez ces patients est situé au niveau du transport canaliculaire puisque chez ceux-ci aucune sécrétion d'acides biliaires exogènes n'est observée alors qu'on remarque une augmentation de la concentration des acides biliaires sériques.

### ***3.2.1 Cholestase intrahépatique familiale progressive de type 3***

La CIFP 3 se caractérise par un prurit moins intense que celui retrouvé dans les deux premières formes de cholestase progressive. D'ailleurs les symptômes de cette maladie se présentent à un âge plus avancé que pour les types 1 et 2 mais la transplantation hépatique est éventuellement nécessaire (Erlinger, 1999; Jansen et Müller, 2000). Une autre distinction entre ce type particulier et les 2 précédents est que le niveau sérique de gamma-glutamyl-transférase (GGT) est particulièrement élevé chez les patients atteints de la maladie. Il a été récemment reconnu comme étant dû à une déficience de l'enzyme *mdr2* chez la souris, et *MDR3* chez l'homme sur le chromosome 7q21, qui est la flippase responsable de transférer la phosphatidylcholine du côté interne vers le côté externe de la membrane canaliculaire (Smith et coll., 1998). *MDR3/mdr2*, comme la SPGP est une glycoprotéine de type P. Le transport des acides biliaires n'est pas affecté par l'absence de la protéine *mdr2* comme l'ont démontré Smith et son équipe en 1998

lors d'une étude effectuée sur des souris invalidées pour ce gène. Cela entraîne de graves conséquences puisque normalement la toxicité des acides biliaires est atténuée par la présence de phosphatidylcholine qui est absente chez les patients CIFP3. Ainsi les monomères d'acides biliaires sont hautement toxiques pour les hépatocytes et les cholangiocytes de patients CIFP3. Chez les humains, cette toxicité est plus grave que chez les souris invalidées du gène *mdr2* (*mdr2*<sup>-/-</sup>) puisque leurs acides biliaires monohydroxylés sont plus toxiques que les acides muricholiques retrouvés dans la bile de souris. CIFP3 est classée comme un désordre cholestatique même s'il n'y a pas de diminution du débit biliaire qui accompagne la maladie. Celle-ci cause au foie un type cholestatique de dommage qui est dû à la toxicité de la bile des patients atteints.

### ***3.2.1 Cholestase intrahépatique familiale progressive de type 4***

Un quatrième type de CIFP est causé par des défauts de la synthèse même des acides biliaires (Clayton et coll., 1987; Setchell et coll., 1988a). Il y aurait alors formation d'intermédiaires toxiques qui causent la cholestase en interagissant avec le transporteur hépatique des acides biliaires.

#### **4. Les souris *knock-out* et les pathologies du foie**

Plusieurs études ont démontré l'importance des souris KO comme outil pour découvrir la fonction physiologique ou même l'importance de certaines protéines. De plus, en ce qui concerne les études axées sur le foie, l'analyse des souris KO a permis de faire plusieurs découvertes majeures (Smith et Oude Elferink, 1999; Oude Elferink et coll., 1995b). Cependant, même si cette technique est de plus en plus utilisée, il faut se rappeler que la production de telles souris est laborieuse et n'est réussie que si un certain nombre de critères sont rencontrés. La protéine impliquée ne doit pas avoir de rôle vital durant l'embryogenèse ni durant le développement du fœtus puisqu'ainsi aucun animal viable ne serait obtenu. Préférentiellement, le gène dans lequel la mutation va être insérée doit avoir une fonction tissu-spécifique, car si la protéine est exprimée de façon ubiquitaire et si sa fonction est vitale dans plusieurs tissus, l'animal va souffrir d'une pathologie sévère ou ne sera peut-être pas viable. Dans de tels cas, il sera difficile de discriminer entre une conséquence primaire ou secondaire de la mutation. De plus, la fonction qui devra être caractérisée devrait préférentiellement être médiée par un seul produit de gène. Finalement, il est possible que la mutation ne donne pas lieu à aucun phénotype (Kazama et coll., 1995; Torres-Rosado et coll., 1993). Dans ce cas, deux explications sont envisageables. Premièrement, il est possible que la fonction de la protéine ne soit pas apparente sous des conditions utilisées en laboratoire mais qu'*in vivo* ou suite aux conditions correctes de stress imposées le phénotype deviendrait évident. Cependant, il n'est possible de découvrir les bonnes conditions de stress que si l'on connaît auparavant le rôle physiologique de la protéine. Deuxièmement, comme il a déjà été mentionné, il est possible que le phénotype ne soit pas évident à cerner s'il y a redondance

fonctionnelle entre différents produits de gènes. Le phénotype dans ce dernier cas ne pourra être mis en évidence que si l'on mute toutes les protéines pouvant remplir la fonction que l'on désire abolir.

On peut scinder les souris KO, produites dans le champ de recherche relié aux maladies hépatiques, en 2 groupes distincts : le premier groupe de souris KO présente des défauts affectant le développement (Hilberg et coll., 1993) et la régénération du foie (Beg et coll., 1995; Oda et coll., 1997; Cressman et coll., 1996) alors que le second groupe de souris KO créées concerne plutôt les gènes impliqués dans le fonctionnement du foie. Ceci résulte par exemple en dérèglements du métabolisme (homéostasie du cholestérol), de la détoxification, du transport biliaire (Smith et Oude Elferink, 1999). Plusieurs souris ont été créées ayant une mutation au niveau de protéines impliquées dans l'homéostasie du cholestérol comme les *Lxra*<sup>-/-</sup> (Peet et coll., 1998), *Cyp7*<sup>-/-</sup> (Schwarz et coll., 1996), *Cyp 27*<sup>-/-</sup> (Rosen et coll., 1998) et plusieurs autres (Van Ree et coll., 1994; Kuipers et coll., 1996; Goldstein et coll., 1989; Herz et coll., 1988). Concernant le transport biliaire, la souris KO *mdr2*<sup>-/-</sup> a eu un grand impact (Smith et coll., 1993), car ce gène muté code pour le transporteur des phospholipides d'un côté à l'autre de la membrane canaliculaire. Depuis peu la souris KO, *spgp*<sup>-/-</sup>, où le transporteur des acides biliaires n'est pas exprimé, a été générée (Wang et coll., 2001). Le Tableau I contient quelques exemples de souris KO.

**TABLEAU I. Quelques souris 'knock-out' produites lors de recherches portant sur le foie.**

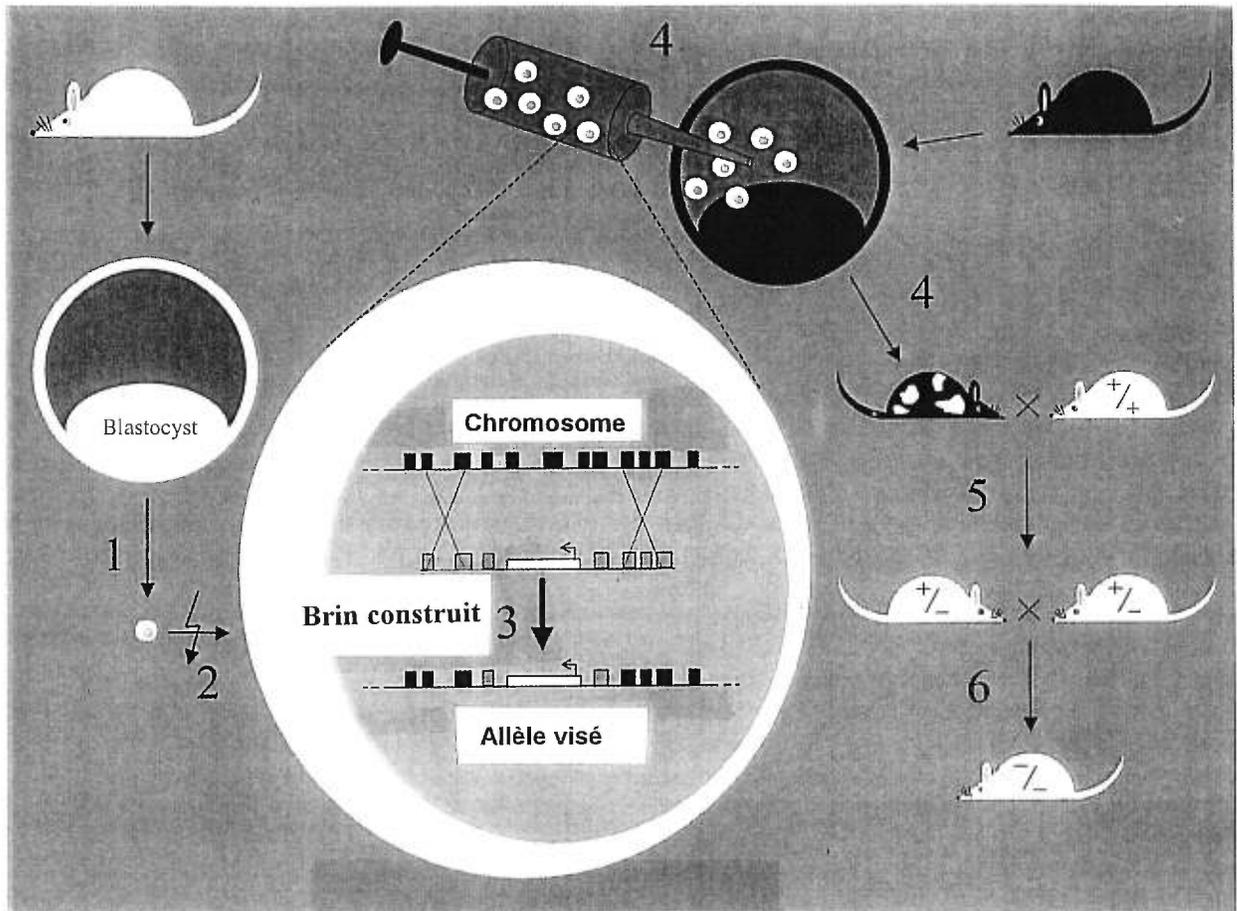
<b>Fonction du foie atteinte</b>	<b>Souris produites</b>	<b>Phénotype</b>
<b>Développement du foie</b>	<i>Ahr</i> (-/-)	Effet sur le développement embryonnaire du foie
	<i>c-met</i> (-/-)	
	<i>c-jun</i> (-/-)	
	<i>RelA</i> (-/-)	
	<i>SEK1</i> (-/-)	
	<i>Sf/HGF</i> (-/-)	
<b>Regénération du foie</b>	<i>Il6</i> (-/-)	Effet sur la régénération du foie
	<i>TNFR1</i> (-/-)	
	<i>TNFR 2</i> (-/-)	Aucun effet sur la régénération du foie
<b>Fonctionnement du foie</b> (métabolisme, détoxification, homéostasie du cholestérol)	<i>Cyp 7α</i> (-/-)	Effets sur l'homéostasie du CH et sur la formation biliaire
	<i>Cyp 27</i> (-/-)	Synthèse réduite des AB et maintien des niveaux de cholestérol
	<i>Lxra</i> (-/-)	Effet sur l'homéostasie du cholestérol
	<i>Mdr1</i> (-/-)	Réduction de l'excrétion de médicaments
	<i>Mdr2</i> (-/-)	Réduction de l'excrétion des lipides biliaires

(Tableau adapté de Smith, A.J. et Oude Elferink, R.J.P., 1999)

L'identification et le clonage d'un certain nombre de protéines clés impliquées dans le transport biliaire fournissent d'importants outils quant au diagnostic de certains types de syndromes cholestatiques et permettent le développement de traitements adéquats. Ainsi, pour les cholestases héréditaires, la thérapie est limitée aux interventions palliatives jusqu'à ce que les vraies causes soient définies. Ces dernières années les souris KO sont devenues de plus en plus populaires grâce aux études ayant démontré leur impact dans les découvertes menant à la compréhension de la fonction physiologique et de l'importance de certaines protéines.

## **5. Invalidation du gène *spgp* chez la souris**

Les souris KO sont générées suite à une mutation dirigée dans le gène d'intérêt en utilisant la recombinaison homologe. Un brin spécifique est construit (ou vecteur de construction) à partir d'un fragment de l'ADN génomique embryonnaire (de la même souche de souris que celle dans laquelle la recombinaison aura lieu) dans lequel une partie essentielle du gène est remplacée par un marqueur sélectif. Le brin construit est introduit dans des cellules embryonnaires de souris par électroporation (Smith et Oude Elferink, 1999). La recombinaison homologe entre ce brin construit et le chromosome résulte en une perturbation d'un des allèles du gène. La sélection de clones résistants et l'identification des recombinants homologues se font par *southern blot* ou analyse par PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Les cellules ayant un seul allèle (du gène d'intérêt) perturbé sont injectées dans des blastocytes murins donnant lieu à des souris chimériques qui seront en partie dérivées des cellules originales des blastocytes et en partie des cellules embryonnaires injectées. Ces souris sont par la suite croisées avec des souris sauvages (+/+) pour donner lieu à la seconde génération de souris F2, qui sera constituée à 50 % de souris +/+ et à 50 % de souris +/- . Un croisement entre 2 souris hétérozygotes de la F2 donne lieu, selon les lois de Mendel, à 25 % de souris sauvages, 25 % de souris homozygotes (les 2 allèles du gène visé sont non-fonctionnels) et 50 % de souris hétérozygotes dont un seul allèle est fonctionnel) (Figure 3).



**FIGURE 3. Génération des souris *knock-out***

Représentation schématique de la génération des souris *knock-out*. Les cellules embryonnaires sont dérivées de blastocystes de souris blanches (1). Dans ces cellules on introduit par électroporation (2) un brin construit. Celui-ci est généré à partir d'un fragment génomique du gène d'intérêt (dérivé de la même souche de souris que les cellules embryonnaires) dans lequel une partie de la section codante est remplacée par un marqueur sélectif. (3) La recombinaison homologue entre le brin construit et le chromosome va remplacer une partie d'une des allèles du gène d'intérêt par un marqueur sélectif. (4) Les cellules embryonnaires identifiées comme étant hétérozygotes sont injectées dans un blastocyste de souris noire donnant lieu à une souris chimérique et dont la couleur résulte du mélange des 2 premières. (5) Les souris chimériques croisées aux souris sauvages donnent naissance à des souris hétérozygotes. (6) Les souris homozygotes sont issues du croisement de 2 souris hétérozygotes.

(Figure tirée de Smith, A.J. et Oude Elferink, R.P.J., 1999)

## OBJECTIFS

Le transport actif des acides biliaires à travers la membrane canaliculaire, un processus vital pour la fonction du foie, semble être médié par la SPGP/spgp. Les mutations dans le gène *SPGP* ont été intimement associées à une maladie sévère affectant les enfants, la Cholestase Intra-hépatique Familiale Progressive de type 2 (CIFP2) (Strautnieks et coll., 1998). La souris *knock-out* pour ce gène a récemment été créée (Wang et coll., 2001).

En général, cette étude vise à la physiologie hépatique des souris dont le gène *spgp* a été muté par recombinaison homologe. Les objectifs spécifiques sont, en premier lieu, d'élucider les fonctions de *spgp* quant à la formation de la bile chez les souris homozygotes (où les deux allèles du gène sont mutés) et hétérozygotes (où un seul allèle du gène est muté) et en second lieu d'étudier le transport d'acides biliaires exogènes chez ces deux groupes.

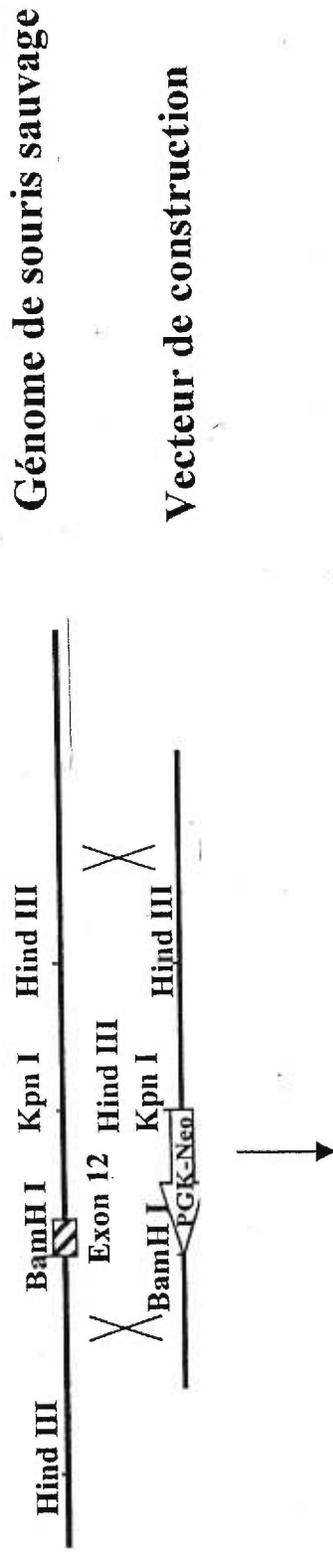
Cette étude constitue un premier pas afin de comparer le modèle murin aux aspects connus du phénotype de la pathologie humaine reliée à cette mutation, soit la CIFP 2.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 1. Animaux

#### **1.1 Invalidation du gène *spgp* chez la souris.**

Des souris dont le gène *spgp* a été inactivé sur les deux allèles (homozygotes, -/-), sur un allèle (hétérozygotes, +/-) ainsi que leurs témoins (sauvages +/+), ont été générés (Wang et coll., 2001), via recombinaison homologue et fournis par le Dr. Victor Ling (BC Cancer Research Institute). En résumé, deux lignées de cellules embryonnaires (TL-1 ou E14K) provenant de la souche de souris 129Sv/Ev ont été utilisées. L'ADN génomique du gène murin *spgp* a été isolé d'une librairie du phage  $\lambda$  grâce à une sonde d'ADN complémentaire de *spgp* de rat. La génération du vecteur de construction a été obtenue grâce à un des clones génomiques obtenus auquel un fragment additionnel de 1,6 kilobases a été ajouté dans la portion N-terminale (une cassette résistante à la néomycine a été insérée dans le domaine de liaison N-terminal de *spgp*) (Figure 4). Le brin ainsi construit a été linéarisé grâce à l'enzyme de restriction Sst 1 et a été introduit dans les lignées cellulaires TL-1 et E14K, par électroporation, à 340 volts et à une capacitance de 250  $\mu$ F. Quatre des onze lignées cellulaires créées ont été utilisées ultérieurement pour produire les souris chimériques. Les souris mutantes hétérozygotes de chaque génération ont été croisées avec des souris C57Bl/6 (sauvages, +/+). Les souris homozygotes ont été obtenues grâce au croisement de souris hétérozygotes.



**FIGURE 4. Recombinaison homologue entre le génome de souris sauvage et le vecteur de construction**

Le vecteur de construction a été introduit dans des cellules de embryonnaires (TL-1 ou E14k) de souris sauvages. La recombinaison homologue entre le brin construit contenant une cassette de résistance à la néomycine (PGK-Neo) va remplacer une partie du gène *spgp* soit la région codante de Walker (454-478 acides aminés) de la portion N-terminale du domaine de liaison à l'ATP.

L'expression du gène *spgp* a été vérifiée par Western Blot selon les techniques standards (Childs et coll., 1995). Des souris adultes de la génération F3 à F5, de 2 à 6 mois ont été utilisées pour cette étude.

## **1.2 Environnement**

Les animaux ont été gardés dans un environnement où la température ainsi que la lumière sont contrôlées. L'eau et la nourriture étaient fournies *ad libitum*. Les souris étaient mises à jeûn durant les 24 heures précédant la chirurgie.

## **2. Expériences**

### **2.1 Caractérisation de l'effet de la mutation sur la formation biliaire**

Dans cette première partie de l'étude les animaux ont été anesthésiés et leurs vésicules biliaires canulées. La bile a été récoltée, le débit biliaire calculé, le sang collecté et le foie retiré à des fins d'analyses ultérieures.

#### **2.1.1 Méthodologie**

##### *2.1.1.1 Chirurgie*

Les souris ont été anesthésiées par une injection intrapéritonéale de 4  $\mu$ l/g de poids corporel de Xylaket (Ketamine 100 mg/ml, produit de M.T.C. Pharmaceuticals, Cambridge, Ontario et Xylazine 100 mg/ml, produit de Bayer Inc., Etobicoke, Ontario). 1  $\mu$ l/g additionnel a été administré lorsque les souris démontraient des signes de regain de sensation. L'abdomen des souris a été incisé et une canule PE 10 a été insérée dans la vésicule biliaire suite à une ligature du canal cholédoque. La température corporelle a été maintenue à 37 °C tout au long de l'expérience en utilisant une sonde rectale et une lampe chauffante. La chirurgie animale a été effectuée selon les normes canadiennes en matière de traitement des animaux.

### 2.1.1.2 Détermination du débit biliaire

La bile a été récoltée pendant 30 minutes (période basale), dans des tubes eppendorfs pré-pesés maintenus dans la glace, pour être ensuite congelée à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le débit biliaire a été déterminé gravimétriquement avec une densité de 1 g/ml de bile.

### 2.1.1.3 Analyses du tissu hépatique

Le foie a été excisé, congelé dans l'azote liquide et entreposé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à ce qu'il soit utilisé. Afin de déterminer les constituants hépatiques, les foies ont été homogénéisés dans une solution saline à 0,9 % pendant 2 minutes à l'aide d'un polytron. Les tissus (homogénats de 10 %) ont été par la suite soumis à une extraction de Folch et Lees (1957). Les phospholipides ont été mesurés par une analyse phosphorique selon la méthode de Bartlett (1959) suite à une digestion par l'acide perchlorique. Les déterminations du cholestérol libre et total dans les homogénats de foie ont aussi été faites suite à une extraction de Folch. Ces mesures ont été obtenues grâce à des trousseaux de Boehringer-Mannheim (Mannheim, Allemagne) utilisant, respectivement, les méthodes de la cholestérol estérase/oxydase, et de la cholestérol oxydase. La quantité de cholestérol ester a été calculée en effectuant la différence entre le cholestérol total et libre. La quantification des triglycérides hépatiques a aussi été obtenue grâce à un kit fourni par Boehringer-Mannheim (Mannheim, Allemagne). Les acides biliaires totaux dans le foie ont été mesurés et identifiés à partir des homogénats de foie selon la méthode décrite dans la section suivante. Les protéines ont été quantifiées suivant la méthode de Lowry et coll. (1951). L'ADN a été quantifié grâce à la méthode de Labarca et Paigen (1980).

#### 2.1.1.4 *Analyses des acides biliaires*

Les acides biliaires totaux dans le foie ont été, en premier lieu, hydrolysés en milieu alcalin puis méthylés en utilisant le 2-2-diméthoxypropane, le méthanol, et l'acide chlorhydrique. Les acétates d'esters méthylés des acides biliaires ont finalement été formés en utilisant l'acide acétique, l'anhydride acétique et l'acide perchlorique selon la méthode décrite par Dionne et coll. en 1994. Les acides biliaires ont par la suite été quantifiés, grâce à un chromatographe à gaz (Hewlett Packard 5896) connecté à un détecteur de masse sélectif (Hewlett Packard 5971 A) en utilisant un mode d'impact d'électrons. La quantification des acides biliaires a été réalisée suivant les corrections faites selon la réponse du détecteur face aux différents acides biliaires purs utilisés comme témoins (Dionne et coll., 1994). Ces derniers étaient tous des sels de sodium et ont été obtenus de Calbiochem-Behring Corporation (La Jolla, Californie) à une pureté d'au moins 99 %. L'acide 5 $\beta$ -cholanique a été utilisé comme standard interne. Les acides biliaires ont été identifiés grâce à une banque de données programmée contenant des spectres d'acides biliaires standards. Les acides biliaires du foie ont été identifiés et quantifiés en second lieu par la chromatographie liquide combinée en tandem avec deux spectromètres de masse (LC/MS/MS). Les acides biliaires ont été préalablement extraits avec une colonne C<sup>18</sup> (octadécyle) à phase renversée. Les acides biliaires ont par la suite été analysés par le suivi simultané des ions fille et parent pour l'identification des conjugués taurine et glycine (Perwaiz et coll., 2001). La limite de détection est de 1 ng et la réponse est linéaire jusqu'à 100 ng.

#### 2.1.1.5 Détermination des constituants biliaires

Les phospholipides retrouvés dans la bile ont été mesurés enzymatiquement par la phospholipase D et la choline oxidase avec une trousse obtenue de Wako chemicals GmbH (Richmond, Virginie). Les acides biliaires totaux dans la bile ont été quantifiés comme il a été précédemment décrit par GC/MS et LC/MS/MS alors que le cholestérol biliaire a été identifié et quantifié par GC/MS.

#### 2.1.1.6 Détermination des constituants sériques

Le sang a été obtenu à partir de l'aorte abdominale. Afin d'évaluer les possibilités de dommage au foie, les enzymes sériques comme la gamma-glutamyl transférase, et l'aspartate aminotransférase ainsi que la bilirubine totale ont été déterminées par les trousse obtenues de Sigma Diagnostics (St-Louis, Missouri). Les acides biliaires sériques ont été analysés et quantifiés comme il a été décrit précédemment par le LC/MS/MS.

### 2.2 Caractérisation de l'effet de la mutation sur le transport d'AB exogènes

La première partie de l'expérience a permis de déterminer que les acides biliaires taurocholique et muricholique étaient les acides biliaires majeurs retrouvés dans la bile des souris homozygotes pour le gène *spgp*. Ainsi, dans la deuxième partie de l'expérience, le transport de ces acides biliaires a été évalué. La bile basale a été

récoltée durant 30 minutes comme cela a été décrit dans la section précédente. Suite à cela, les acides biliaires exogènes ont été injectés dans la veine jugulaire de souris anesthésiés. Suivant l'injection, la bile a été récoltée pendant 60 minutes par aliquots de 15 minutes. Le sang a été collecté et le foie excisé.

## **2.2.1. Méthodologie**

### *2.2.1.1 Chirurgie*

Suite à la période basale, 2 groupes de souris ont été formés, chaque groupe contenait au moins 3 animaux de chaque génotype (+/+), (+/-) et (-/-). Le premier groupe a reçu une injection dans la veine jugulaire droite donnée en bolus de 3.5  $\mu$  moles/100g de poids corporel de taurocholate de sodium (produit de Calbiochem-Behring Corporation, La Jolla, Californie) (10  $\mu$  moles/ml dissous dans une solution de 3,5 % albumine-0,9% saline). L'acide taurocholique marqué au  $^{14}\text{C}$  (50  $\mu$  Ci/ $\mu$  mole, produit de Dupont Inc., Boston, Massachusetts) a été utilisé comme marqueur. Entre 50000 et 60000 CPM, soit de 0.45 nmoles/ $\mu$ l à 0.54 nmoles/ $\mu$ l ont été injectés par souris. Le second groupe a reçu, quant à lui, une injection dans la veine jugulaire droite donnée en bolus de 3,5  $\mu$  moles/100g de poids corporel d'acide  $\beta$ -muricholique (produit de Steraloids, Inc., Wilton, New Hampshire), 10  $\mu$  moles/ml dissout dans une solution de 3,5 % albumine-0.9% saline. L'acide  $\beta$ -muricholique ( $\beta$ -muri) n'étant pas marqué radioactivement, des études effectuées sur des souris sauvages ont permis de déterminer la période où le pool d'acides biliaires ne contenait plus d'acides muricholiques. La déplétion du pool en

acides muricholiques correspondait à la période basale donc l'injection de l'acide  $\beta$ -muri a été donnée suite au 30 minutes de récolte de bile basale.

#### 2.2.1.2 Détermination du débit biliaire

Suite à l'injection des acides biliaires exogènes, la bile a été collectée sur glace dans des eppendorfs pré-pesés pendant 60 minutes par aliquots de 15 minutes pour être ensuite congelée à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Le débit biliaire a été déterminé comme il a été décrit auparavant.

#### 2.2.1.3 Comptage de la radioactivité

La radioactivité totale dans  $10\ \mu\text{l}$  de bile a été comptée en ajoutant  $15\ \text{ml}$  du cocktail à scintillation (produit de Amersham Canada Limited, Oakville, Ontario) à l'aide d'un compteur à scintillation Canberra Packard (1500 Tri Carb) équipé d'un standard externe. Les contenants ont été comptés pendant 2 minutes et les résultats ont été obtenus en CPM. Le nombre de total de CPM retrouvé dans la bile est calculé de la manière suivante : nombre de CPM par  $\mu\text{l}$  obtenu de l'échantillon de bile de départ multiplié par la quantité de bile totale recueillie durant la première demie-heure de collecte suivant l'injection de l'acide taurocholique. Le pourcentage de radioactivité qui se retrouve dans la bile est quant à lui obtenu en divisant le nombre de CPM total que contient la bile par le nombre de CPM injecté à la souris multiplié par 100. La radioactivité dans le sang a été comptée en ajoutant à  $100\ \mu\text{l}$  de sang entier,  $1,2\ \text{ml}$  de solubilisateur de tissus (Solvable, produit de Dupont, Boston, Massachusetts). Après 20 minutes à  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $0,4\ \text{ml}$  de peroxyde de Benzoile (produit de Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, Ontario) ont été ajoutés. Les contenants ont été laissés durant la nuit à  $50^{\circ}\text{C}$ . Suite à la solubilisation,  $15\ \text{ml}$  du cocktail à scintillation ont été ajoutés aux contenants afin de permettre le comptage. La quantité totale de CPM retrouvée dans le sang est calculée en multipliant le nombre de CPM retrouvé par  $\mu\text{l}$  de sang par la quantité totale de sang,

assumant que celle-ci est équivalente à 10 % du poids corporel de la souris. Le pourcentage de la radioactivité qui se retrouve dans le sang devient le rapport, entre la quantité totale de CPM dans le sang et la quantité totale injectée à la souris, multiplié par 100. La radioactivité dans le foie a été comptée suite à la digestion de 0,2 g de foie avec 2 ml de Solvable, 0,1 ml d'eau distillée et 60  $\mu$ l d'acide acétique glacial pendant une nuit à 50 °C et à l'ajout de 15 ml de cocktail à scintillation. Le nombre total de CPM dans le foie est calculé de la manière suivante : nombre de CPM par g obtenu de l'échantillon de foie de départ multiplié par le poids total du foie. Ce nombre total de CPM retrouvé dans le foie est par la suite divisé par le nombre total de CPM injecté à la souris et multiplié par 100 obtenant ainsi le pourcentage de radioactivité retrouvée dans le foie.

#### 2.2.1.4 *Détermination des acides biliaires*

Les acides biliaires excrétés dans la bile, suite à l'injection d'acides biliaires exogènes ont été quantifiés de la manière décrite précédemment.

### **3. Analyses statistiques**

Toutes les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  l'écart type. Les différences entre les groupes ont été analysées par le test *t* de Student. Les valeurs sont considérées significatives lorsque le niveau de probabilité alpha est plus petit que 0,05 ( $p < 0.05$ ).

## **RÉSULTATS**

### **1. Création des souris par recombinaison homologue**

Les souris homozygotes pour le gène *spgp* ont été générées par recombinaison homologue en faisant une délétion de l'exon 12 du gène qui encode une partie de la région N-terminale qui contient le site de liaison à l'ATP du transporteur. La Figure 4 schématise la mutation produite dans le laboratoire du Dr Ling et la Figure 5 confirme l'absence de la protéine chez les homozygotes.

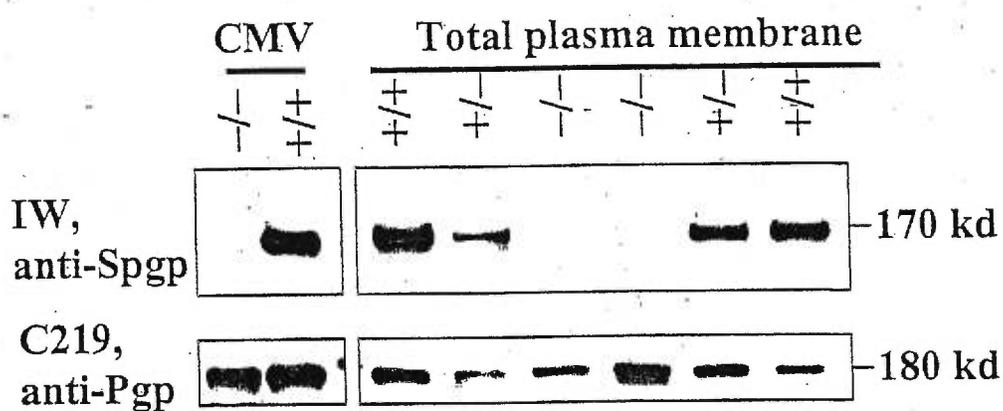
### **2. Caractérisation basale**

À la naissance les souris homozygotes ont un poids de 20% inférieur à celui des souris sauvages (Wang et coll., 2001, cet article est retrouvé en annexe), Tout au long de leur vie elles maintiennent un poids un peu plus bas que la normale. Cependant, l'aspect le plus évident, qui les distingue nettement des souris sauvages et hétérozygotes, est l'hépatomégalie dont elles souffrent. En effet, les souris homozygotes ont un rapport poids du foie/poids corporel environ 2 fois plus élevé que les souris normales et hétérozygotes (Tableau II).

La composition du foie a été étudiée afin de distinguer quels constituants du foie sont augmentés chez les souris homozygotes. Or, comme le démontre le Tableau III la composition du foie des souris homozygotes ne diffère pas quant à la quantité de lipides et de protéines présents. De plus, l'ADN n'étant pas augmenté par rapport aux souris sauvages, il est difficile d'attribuer l'hépatomégalie à une hausse du nombre de cellules hépatiques. Cependant la quantité d'acides biliaires retrouvée

dans le foie des souris homozygotes est significativement plus élevée (environ 5 fois) que celle retrouvée chez les souris hétérozygotes et sauvages.

Les indicateurs de la fonction du foie comme la bilirubine, la GGT ou encore l'alanine transférase (ALT) ne démontrent aucune variation entre les trois différents génotypes (Tableau IV).



**FIGURE 5. Identification et localisation de spgp**

La protéine spgp est absente des vésicules membranaires canaliculaires isolées de souris homozygotes et de la membrane plasmique totale. Spgp est facilement détectable chez les souris  $+/+$  et  $+/-$ . L'antisérum IW est spécifique à spgp alors que l'anticorps monoclonal C219 détecte pgp et spgp.

**TABLEAU II. Poids Corporel (PC) et du Foie (PF) des souris sauvages (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes (-/-) pour le gène spgp.**

Génotype	n	PC (g)	PF (g)	PF / 100g PC
+/+	7	32,93 ± 5,93	1,35 ± 0,56	4,03 ± 1,23
+/-	20	28,87 ± 5,46	1,14 ± 0,32	3,94 ± 1,01
-/-	18	29,07 ± 3,90	2,24 ± 0,46 **	7,71 ± 1,29 **

NOTE. Les valeurs représentent des moyennes ± l'écart type. Différence significative par rapport aux témoins (+/+) ( \*\* p<0.005).

**TABLEAU III. Composition du foie des souris (+/+), (+/-) et (-/-) pour le gène spgp.**

	+/+	n	+/-	n	-/-	n
<b>Lipides</b> (mg/g foie)						
Acides biliaires $\square$	47,22 $\pm$ 33,15	4	108,42 $\pm$ 61,47	3	228,91 $\pm$ 106,26 *	7
Triglycérides	31,36 $\pm$ 6,71	3	38,14 $\pm$ 11,90	12	22,77 $\pm$ 10,52	8
Cholestérol Total	11,84 $\pm$ 1,49	3	12,62 $\pm$ 3,67	12	12,26 $\pm$ 4,36	8
Cholestérol esterifié	10,34 $\pm$ 1,93	3	10,32 $\pm$ 3,43	12	10,36 $\pm$ 4,44	8
Cholestérol libre	1,51 $\pm$ 0,60	3	2,30 $\pm$ 0,58	12	1,90 $\pm$ 0,48	8
Phospholipides	16,47 $\pm$ 4,78	3	15,85 $\pm$ 4,60	12	11,11 $\pm$ 2,06 *	8
<b>Protéines</b> (mg/g foie)	110,93 $\pm$ 28,89	3	115,62 $\pm$ 21,78	12	102,45 $\pm$ 5,82	8
<b>ADN</b> (mg/g foie)	5,48 $\pm$ 1,02	3	4,38 $\pm$ 1,56	12	3,18 $\pm$ 0,87 **	8

$\square$  Ces valeurs sont exprimées en  $\mu\text{g/g}$  de foie

NOTE. Les valeurs représentent des moyennes  $\pm$  l'écart type. Différence significative par rapport aux témoins (+/+) (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ ).

**TABLEAU IV. Paramètres plasmatiques de la fonction du foie des souris sauvages et déficientes pour spgp.**

Génotype	Bilirubine (mg/dl)	n	GGT (unités/ml)	n	ALT (unités/ml)	n
+/+	0,21 ± 0,16	7	0,45 ± 0,22	9	9,03 ± 4,01	7
-/-	0,28 ± 0,28	5	0,36 ± 0,11	5	11,99 ± 6,57	3

NOTE. Les valeurs représentent des moyennes ± l'écart type. Aucune différence significative n'a été détectée entre les différents génotypes.

### **3. Caractérisation de l'effet de la mutation sur la formation de la bile**

Étant donné l'abolition de l'activité de *spgp*, considéré comme codant pour le transporteur majeur des acides biliaires, la caractérisation de la formation de la bile des souris homozygotes est essentielle afin de comparer le génotype connu au phénotype attendu. Les différents paramètres pouvant caractériser la sécrétion de la bile sont retrouvés dans la Figure 6.

Le débit biliaire a été mesuré chez les différents génotypes. Nous constatons effectivement une légère diminution (d'environ 16 %) du débit chez les homozygotes par rapport aux sauvages ( $7,74 \pm 6,39$  vs  $9,13 \pm 3,12$   $\mu$  l/min/100g PC) qui n'est cependant pas significative. Aucune différence significative n'est détectée entre le débit biliaire des souris hétérozygotes ( $8,07 \pm 3,28$   $\mu$  l/min/100g PC) par rapport aux souris sauvages.

La sécrétion des acides biliaires est, quant à elle, fortement réduite. La sécrétion basale (entre 0 et 30 minutes suivant la canulation de la vésicule) des acides biliaires provenant des souris homozygotes est égale à 30 % de la valeur obtenue chez les souris sauvages et hétérozygotes ( $84,58 \pm 67,94$  pour les  $-/-$  vs  $349,00 \pm 195,26$  pour les  $+/+$  et  $337,14 \pm 308,26$  nmoles/min/100g PC pour les  $+/-$ ).

Afin d'étudier l'effet de la mutation sur la sécrétion des lipides biliaires, la sécrétion basale du cholestérol et des phospholipides a été mesurée (Figure 6). Une augmentation marquée de la sécrétion de ces lipides biliaires a été détectée chez les souris *spgp*<sup>-/-</sup>. La sécrétion des phospholipides est deux fois plus élevée par rapport aux souris sauvages alors que la sécrétion du cholestérol y est six fois plus élevée. Cependant la grande variabilité expérimentale fait que la différence de sécrétion des phospholipides n'a pas atteint le seuil de signification statistique.

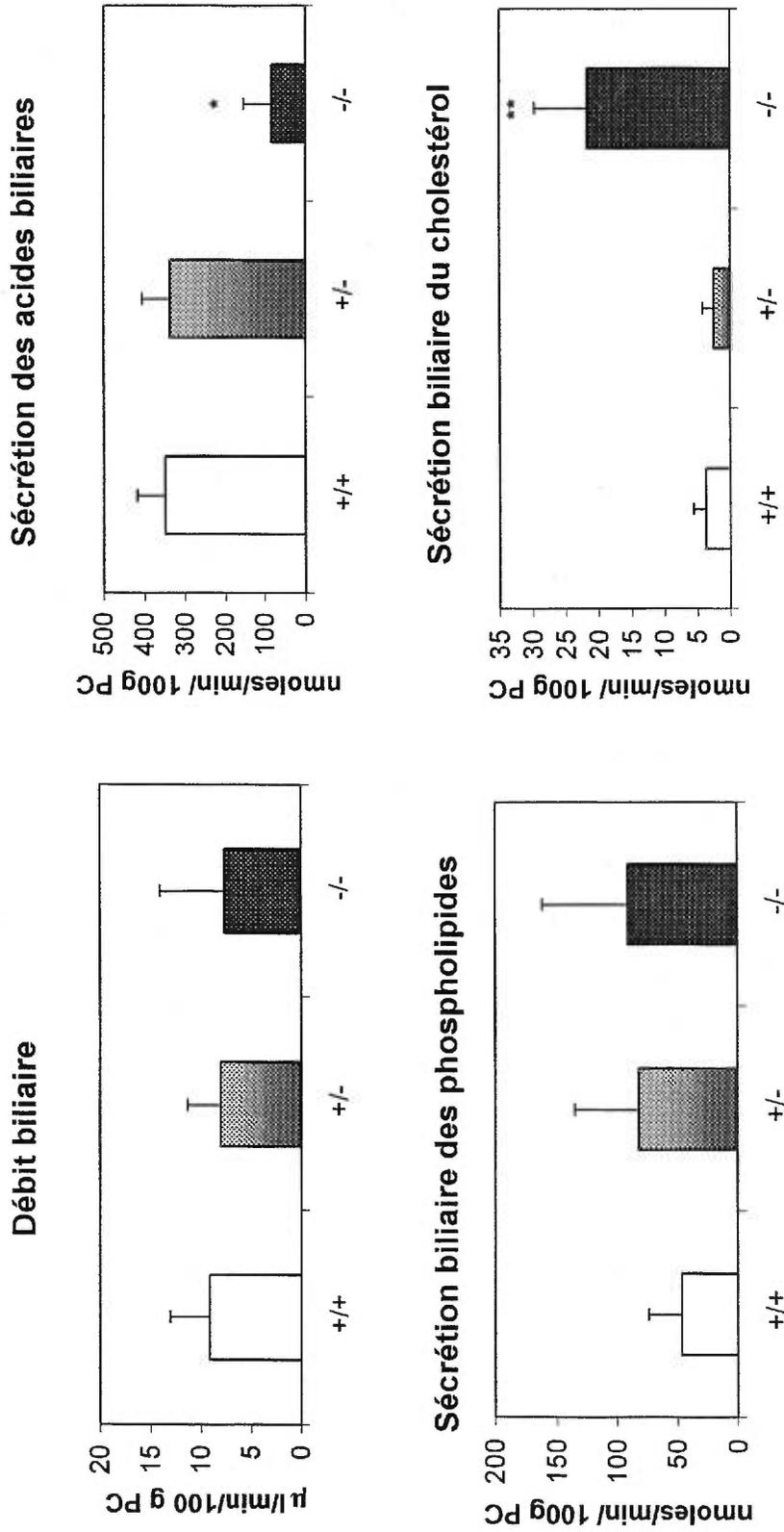
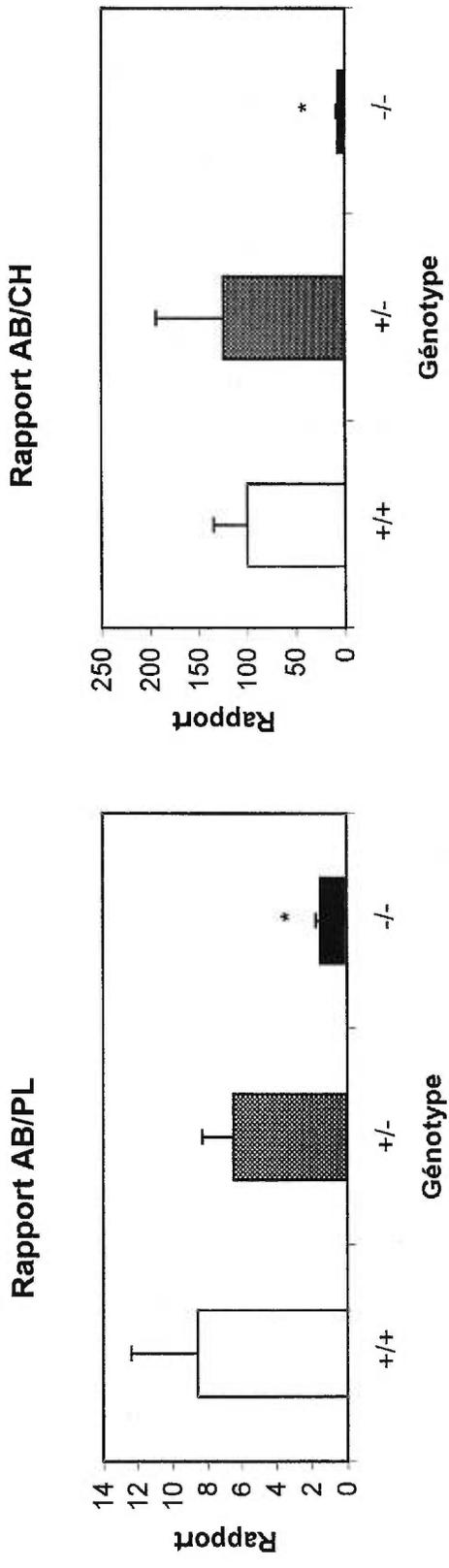


FIGURE 6. L'analyse de la bile des 3 différents génotypes.

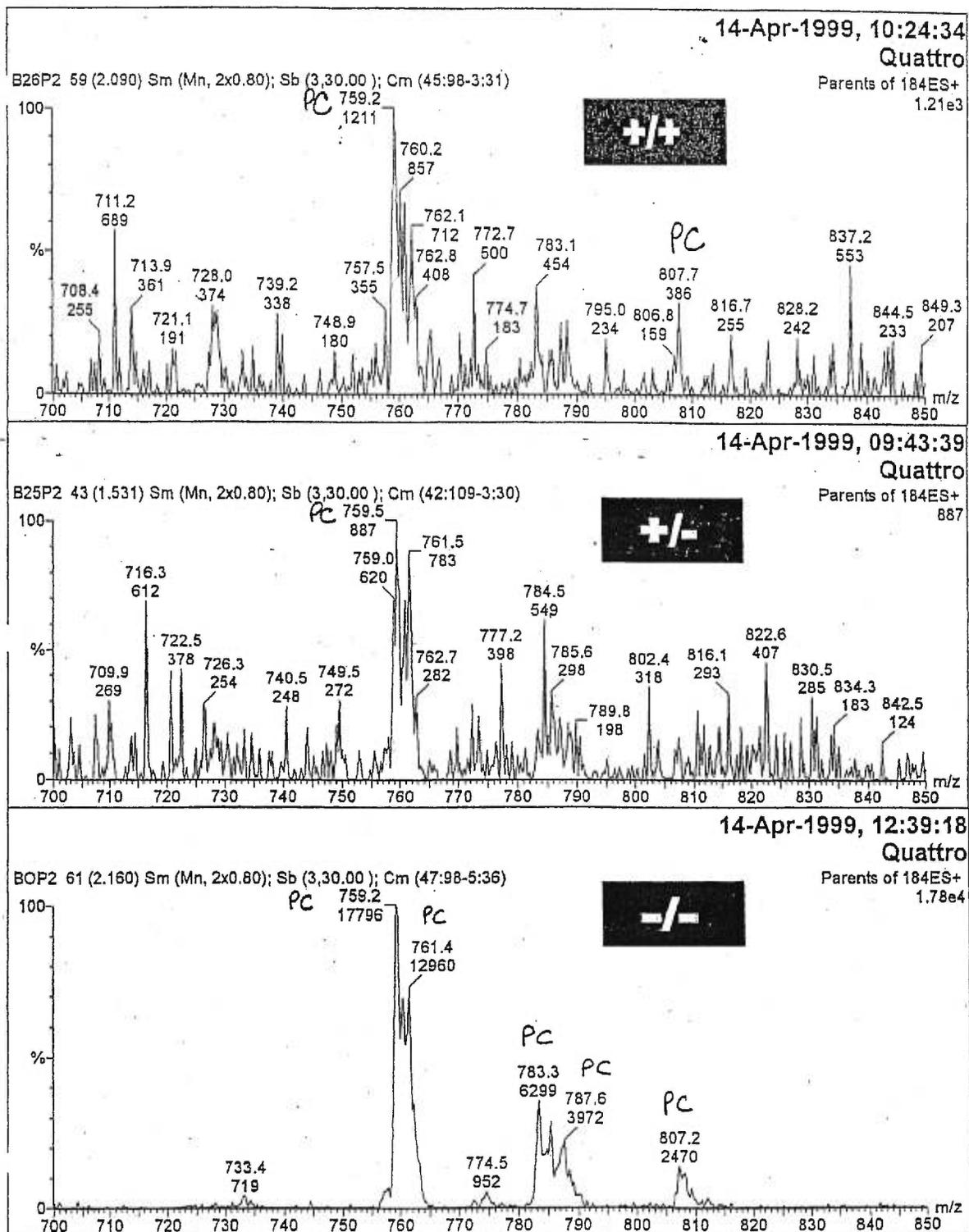
La bile a été récoltée et analysée comme cela a été décrit dans la section Matériels et Méthodes. Les données représentent des moyennes  $\pm$  l'écart type pour le débit biliaire, la sécrétion des acides biliaires, la sécrétion du cholestérol et la sécrétion des phospholipides biliaires pour 5 à 12 souris par génotype. Différence significative par rapport aux témoins (+/+) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ ).

Comme l'illustre la Figure 7 les rapports des acides biliaires sur le cholestérol et sur les phospholipides sont cependant très éloquents quant à cette différence entre les souris *spgp*<sup>-/-</sup> et les souris sauvages. Le profil quant à la sécrétion des lipides biliaires ne diffère pas entre les souris hétérozygotes et les sauvages. Cette augmentation des phospholipides biliaires n'est pas due à l'apparition de nouvelles espèces de phospholipides chez les souris mutées comme cela a été constaté grâce au LC/MS/MS (Figure 8).



**FIGURE 7. Rapport des acides biliaires sur les lipides biliaires.**

Rapports des acides biliaires (AB) de la bile sur les phospholipides (PL) et sur le cholestérol (CH) biliaire quantifiés par le GC/MS suite à une collecte basale de 30 minutes suivant la cannulation de la vésicule. Différence significative par rapport aux témoins (+/+) (\*p<0,05).



**FIGURE 8. Spectres des phospholipides retrouvés dans la bile des 3 différents génotypes.**

Les phospholipides ayant un groupement choline (PC) sont retrouvés dans la région entre 725 et 825 m/z. La bile des 3 différents génotypes présente les mêmes PC.

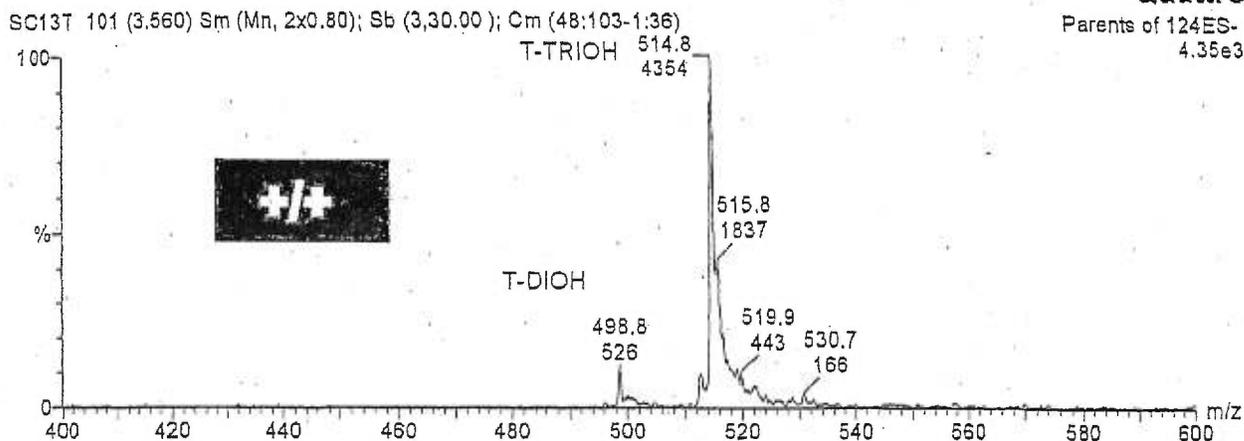
### 3.1 Caractérisation de l'effet de la mutation sur la composition en acides biliaires de la bile

Le LC/MS/MS permet de détecter des composés présents dans des échantillons biologiques selon leurs poids moléculaires. Cette méthode permet de différencier les acides biliaires (AB) selon leur degré d'hydroxylation. Elle permet de quantifier la conjugaison des AB monohydroxylés, dihydroxylés et trihydroxylés. Cependant c'est grâce au GC/MS qu'il est possible de distinguer et quantifier les différents types d'AB monhydroxylés, dihydroxylés ou trihydroxylés.

La bile des 3 différents génotypes, analysée par le LC/MS/MS, est illustrée à la Figure 9. La bile de souris est principalement constituée d'AB conjugués à la taurine (les AB conjugués à la glycine ne représentent que 0,1 % à 0,2 % dans la bile de souris). La bile des souris sauvages est constituée à plus de 90 % d'acides trihydroxylés tout comme la bile des souris hétérozygotes. Par contre, la bile des souris homozygotes est constituée à plus de 25 % d'AB tétrahydroxylés et à 70 % d'acides trihydroxylés (Tableau V). On distingue nettement la présence d'un nouvel acide biliaire dans la bile de souris *spgp*<sup>-/-</sup> qui, comme le démontre la Figure 9, a un poids moléculaire de 530 unités de masse atomique et serait donc tauro-tétrahydroxylé.

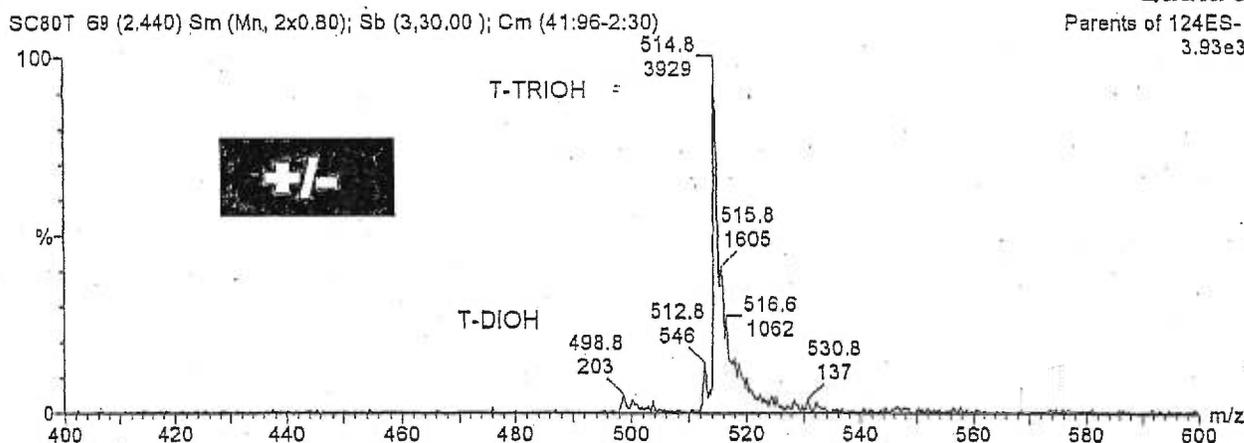
26-Nov-1999, 10:04:40

Quattro

Parents of 124ES-  
4.35e3

26-Nov-1999, 10:28:30

Quattro

Parents of 124ES-  
3.93e3

26-Nov-1999, 10:52:21

Quattro

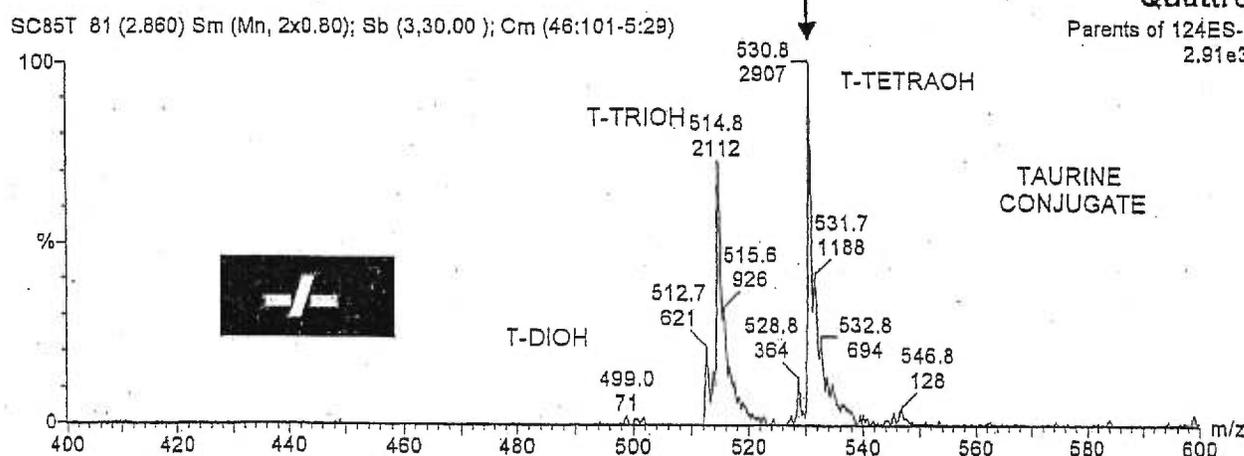
Parents of 124ES-  
2.91e3

FIGURE 9. Composition de la bile des 3 différents génotypes

Spectres des AB conjugués à la taurine, de la bile des 3 différents génotypes, obtenus grâce au LC/MS/MS. Les pics à 498,8 et 514,8 représentent le poids moléculaire des AB tauro-conjugués dihydroxylés et trihydroxylés respectivement. La flèche indique la présence à 530,8 m/z d'un poids moléculaire plus élevé de 16 que les AB tauro-trihydroxylés et correspondrait à des AB taurotétrahydroxylés.

TABLEAU V. Composition des acides biliaires dans la bile de souris des 3 différents génotypes

	+/+	n	+/-	n	-/-	n
<b>Concentration des acides biliaires dans la bile (mM)</b>						
	37,04 ± 7,05	5	39,70 ± 28,37	6	6,06 ± 7,29*	5
<b>% des AB (tauro-conjugués)</b>						
Monohydroxylés	ND		ND		ND	
Dihydroxylés	6,90 ± 1,27		5,04 ± 2,30		1,37 ± 1,31*	
trihydroxylé	93,11 ± 1,28		94,96 ± 2,30		71,94 ± 30,85	
tétrahydroxylés	ND		ND		26,82 ± 31,55	
<b>% des acides biliaires individuels</b>						
Déoxycholique	2,82 ± 1,95		2,93 ± 2,56		ND	
Chénodéoxycholique	1,61 ± 0,31		1,26 ± 0,57		0,70 ± 0,64	
Cholique	60,00 ± 13,17		52,20 ± 15,75		11,46 ± 7,33*	
Ursodéoxycholique	2,47 ± 1,82		0,86 ± 0,70		0,68 ± 0,75	
Espèces muricholiques	33,11 ± 13,12		42,76 ± 15,82		60,48 ± 25,62	
Espèces tétrahydroxylés	ND		ND		26,82 ± 31,55	

NOTE. L'identification du degré d'hydroxylation des AB est obtenu grâce au L/MS/MS. L'identification et la quantification des AB individuels ont été obtenus grâce au GC/MS.

ND=Non-DéTECTABLE.

Différence significative par rapport aux témoins (+/-) (\* $p < 0.05$ ).

La fragmentation spécifique de l'acide tauro-tétrahydroxylé, au GC/MS (Figure 10), confirme la présence de 4 groupements hydroxylés. En effet, la présence des ions 251 et 384, en plus des ions spécifiques à la fragmentation des acides biliaires (entre autres les ions 51, 81, et 159) est spécifique aux acides biliaires tétrahydroxylés.

Le GC/MS permet d'identifier les acides trihydroxylés, ainsi  $60,00 \pm 13,17$  % des acides trihydroxylés dans la bile de souris  $+/+$  et  $52,20 \pm 15,75$  % dans la bile de souris  $+/-$  sont en fait de l'acide cholique alors que les acides muricholiques constituent  $33,11 \pm 13,12$  % de la bile de souris  $+/+$  et  $42,76 \pm 15,82$  % de la bile de souris  $+/-$  (Tableau V). Ce profil change dramatiquement lorsqu'on se rapporte aux souris homozygotes où effectivement, l'acide cholique ne représente plus que  $11,46 \pm 7,33$  % de ce que représente l'acide cholique alors que les acides muricholiques représentent  $60,48 \pm 25,62$  % et les acides tétrahydroxylés  $26,82 \pm 31,55$  % .

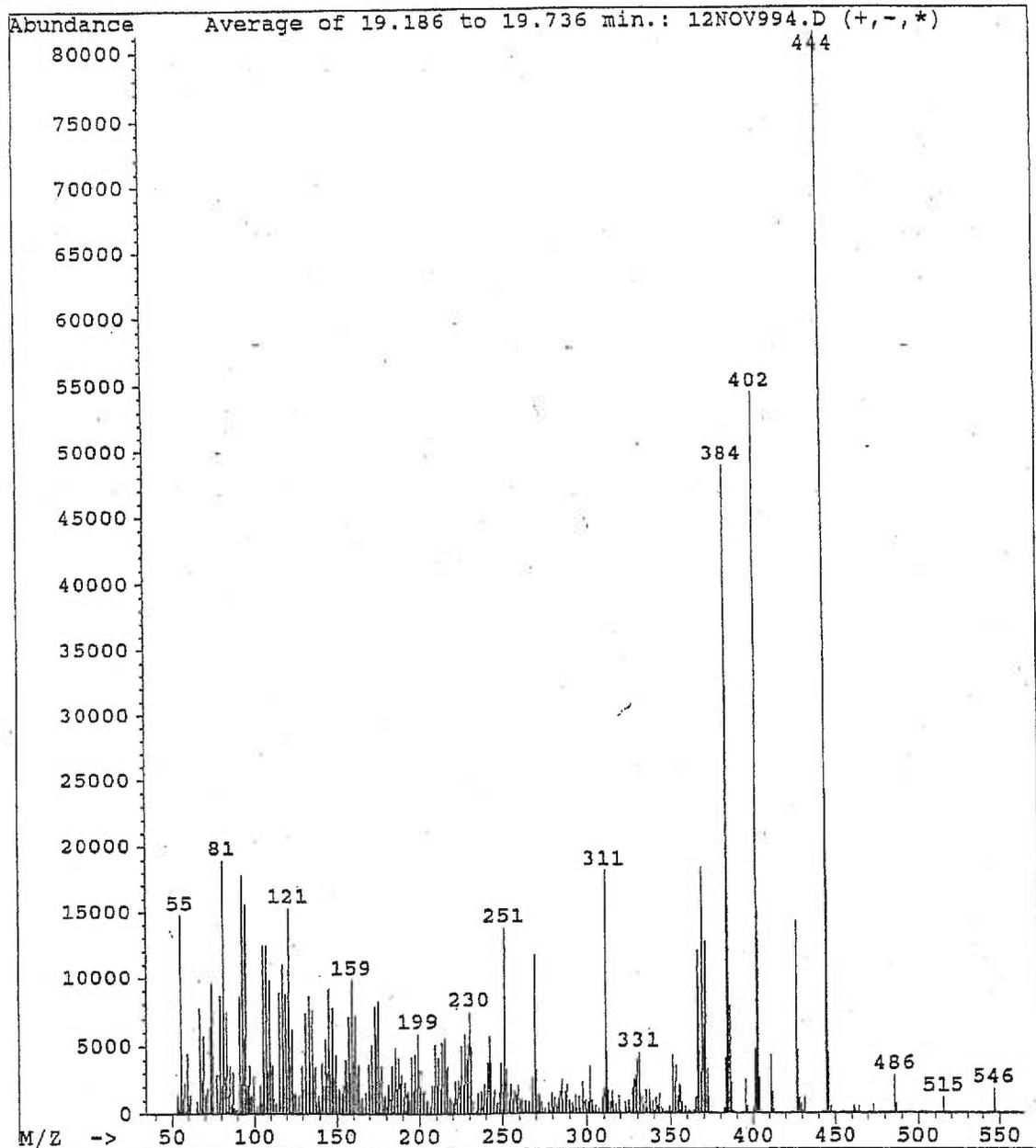


FIGURE 10. Spectre de la fragmentation de l'acide tétrahydroxylé par le GC/MS

Les ions 251, 384 et 444 confirment la présence de quatre groupements hydroxyles sur la molécule.

### 3.2 Caractérisation de l'effet de la mutation sur la composition des acides biliaires retrouvés dans le foie et dans le sérum

Les AB retrouvés dans le foie sont principalement conjugués à la taurine tout comme ceux retrouvés dans la bile. La concentration en acides biliaires dans le foie des souris homozygotes est environ de 2 et 5 fois plus élevée que la concentration d'AB retrouvés respectivement dans le foie des souris +/- et +/+ (Tableau VI). La répartition de l'état d'hydroxylation retrouvée dans les foies est semblable à ce qui était retrouvé dans la bile pour les 3 différents génotypes (Tableau VI). En effet, la majorité des acides biliaires retrouvés dans le foie des -/- sont trihydroxylés (65 %). Ce pourcentage d'acides trihydroxylés est réduit de 20 % comparativement aux souris sauvages. Les acides biliaires du foie des homozygotes sont représentés à 30 % par des acides tétrahydroxylés.

La concentration d'AB dans le sérum est de 4 fois plus élevée chez les souris homozygotes comparativement aux souris hétérozygotes et sauvages. La conjugaison des AB diffère, dans le sérum, du profil retrouvé dans la bile et le foie. On retrouve effectivement une proportion considérable d'acides biliaires conjugués à la glycine (38,52 % de conjugués glycine pour les souris +/+, 34,58 % pour les souris +/- et 20,52 % pour les souris -/-). Une plus grande proportion d'acides monohydroxylés et dihydroxylés est retrouvée dans le sérum comparativement à la bile et au foie et ce pour les 3 génotypes (Tableau VI). Le profil des acides biliaires dans le sérum ne diffère pas entre les souris +/+ et +/- . Par contre l'apparition des acides tétrahydroxylés ( $20,72 \pm 10,48$  %) modifient ce profil chez les souris -/- où nous ne retrouvons plus que la moitié des acides monohydroxylés et dihydroxylés en comparaison aux souris sauvages (Tableau VI).

**TABLEAU VI. Composition des acides biliaires dans le foie et le sérum de souris des 3 différents génotypes**

	+/+	n	+/-	n	-/-	n
<b>Concentration des acides biliaires dans le foie (<math>\mu\text{g/g}</math> foie)</b>						
<b>% des AB (tauro-conjugués)</b>						
Monohydroxylés	ND		ND		ND	
Dihydroxylés	9,41 $\pm$ 2,11		6,94 $\pm$ 2,00		3,91 $\pm$ 0,75*	
trihydroxylé	85,63 $\pm$ 2,87		80,46 $\pm$ 10,91		65,54 $\pm$ 3,09	
tétrahydroxylés	5,23 $\pm$ 4,56		6,95 $\pm$ 5,21		30,54 $\pm$ 3,40	
<b>Concentration des acides biliaires dans le sérum (<math>\mu\text{M}</math>)</b>						
<b>% des AB (tauro et glyco-conjugués)</b>						
Monohydroxylés	18,20 $\pm$ 2,46		16,10 $\pm$ 6,70		7,27 $\pm$ 5,26*	
Dihydroxylés	37,75 $\pm$ 1,36		41,55 $\pm$ 8,65		26,49 $\pm$ 11,87	
trihydroxylé	44,05 $\pm$ 3,23		42,35 $\pm$ 2,99		45,13 $\pm$ 9,22	
tétrahydroxylés	ND		ND		20,72 $\pm$ 19,13	

NOTI La quantification des AB dans le foie a été obtenue grâce au GC/MS. Les acides biliaires dans le sérum ont été quantifiés grâce au LC/MS/MS. L'identification du degré d'hydroxylation des AB dans le foie et le sérum a été déterminée par le LC/MS/MS.

ND=Non-DéTECTABLE.

Différence significative par rapport aux témoins (+/+) (\*  $p < 0.05$ ).

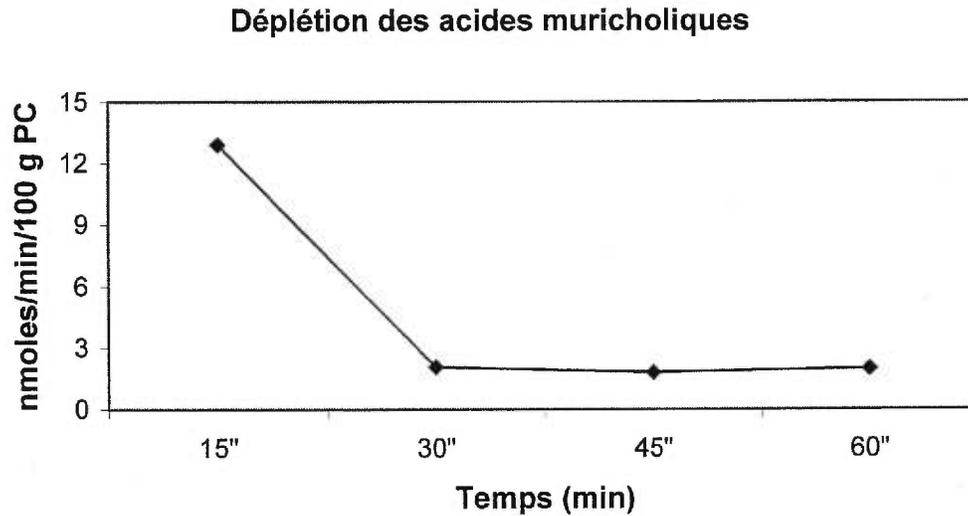
#### **4. Caractérisation de l'effet de la mutation sur le transport d'acides biliaires exogènes**

Afin d'évaluer l'effet de la mutation sur le transport d'acides biliaires exogènes chez les souris, celles-ci ont été canulées par la vésicule biliaire suite à une ligature du canal cholédoque. La bile a par la suite été récoltée par aliquot de 15 minutes pour une durée de 30 minutes. Suite à cette période basale, un premier groupe de souris a reçu une injection de 3,5  $\mu$  moles par 100 g de poids corporel d'acide taurocholique et un second groupe, une injection de 3,5  $\mu$  moles par 100 g de poids corporel d'acide  $\beta$ -muricholique. Comme il a été démontré dans la première section, ceux-ci sont les acides biliaires majeurs chez la souris et c'est pour cette raison que leur transport a été évalué. L'acide taurocholique était marqué radioactivement, ce qui a permis d'étudier son transport plus aisément. La Figure 11, qui est représentative de l'expérience chez une souris sauvage, illustre la sécrétion de l'acide muricholique. Cette sécrétion est diminuée à moins de 20 % de son état initial suite à la première demi-heure suivant l'interruption du cycle entérohépatique. L'acide muricholique a donc aussi été injecté suite à la première demi-heure.

Comme le démontre la Figure 12, les acides biliaires exogènes ne sont pas bien transportés chez les souris homozygotes, contrairement aux souris sauvages et hétérozygotes, Il y a un léger transport de l'acide taurocholique chez les homozygotes mais l'acide muricholique n'est pas transporté du tout.

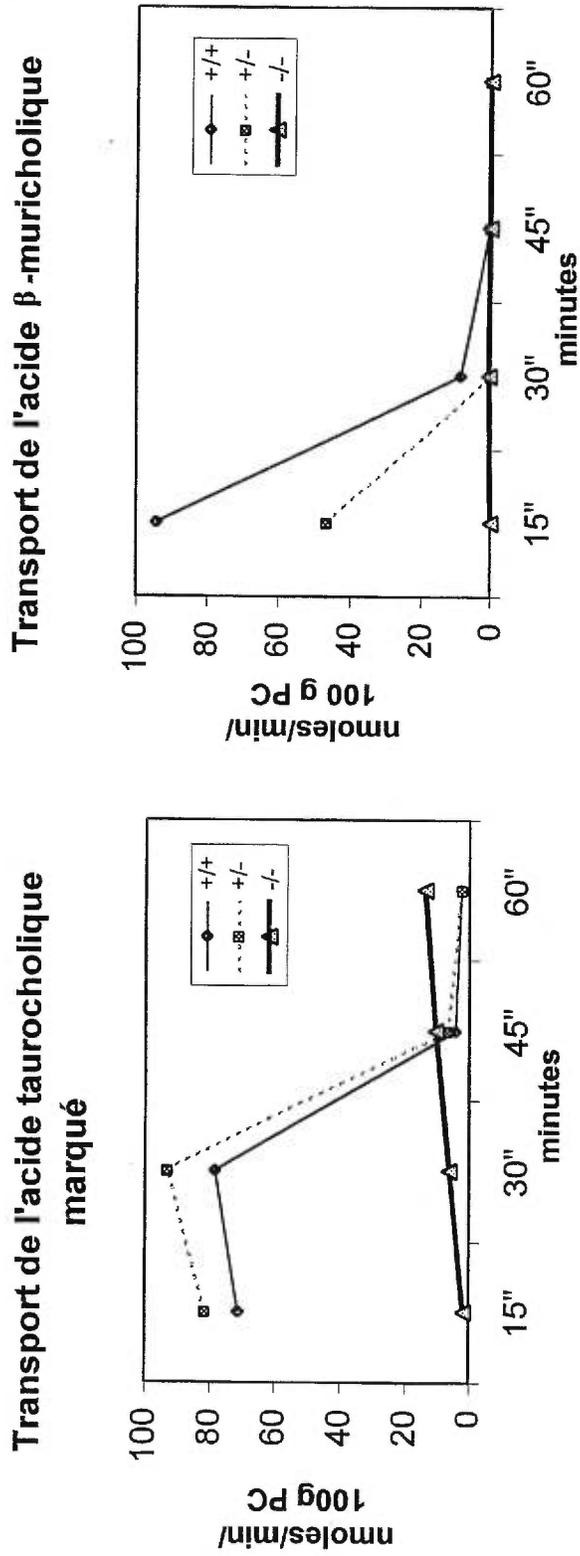
La Figure 13 indique que la présence de l'acide taurocholique est majoritaire dans la bile chez les souris ++ (79,93  $\pm$  17,41 %) et +/- (75,66  $\pm$  19,08 %) alors qu'il est retrouvé à 69,70  $\pm$  20,74 % dans le foie des souris homozygotes.

Afin d'étudier l'effet de ces acides sur la sécrétion des lipides biliaires chez les souris hétérozygotes, une étude préliminaire a été effectuée. On peut constater que les acides biliaires exogènes taurocholique et  $\beta$ -muri n'affectent probablement pas la sécrétion des lipides biliaires (Figure 14).



**FIGURE 11. Déplétion des acides muricholiques.**

Déplétion des acides muricholiques suite à l'interruption du cycle entérohépatique chez une souris sauvage. Cette figure est représentative de l'expérience chez les souris sauvages. Immédiatement après la cannulation de la vésicule biliaire, la bile a été collectée pour les périodes de temps ci-haut indiqués.



**FIGURE 12. Transport d'acides biliaires exogènes.**

Transport de l'acide taurocholique marqué radioactivement et de l'acide muricholique dans la bile de souris +/+, +/- et -/- à 15 minutes, 30 minutes, 45 minutes et 60 minutes suivant l'injection dans la veine jugulaire de 3,5 umoles/100 g PC par acide biliaire exogène. (Au moins 3 souris par génotype ont été utilisées pour chaque expérience).

### Répartition de la radioactivité

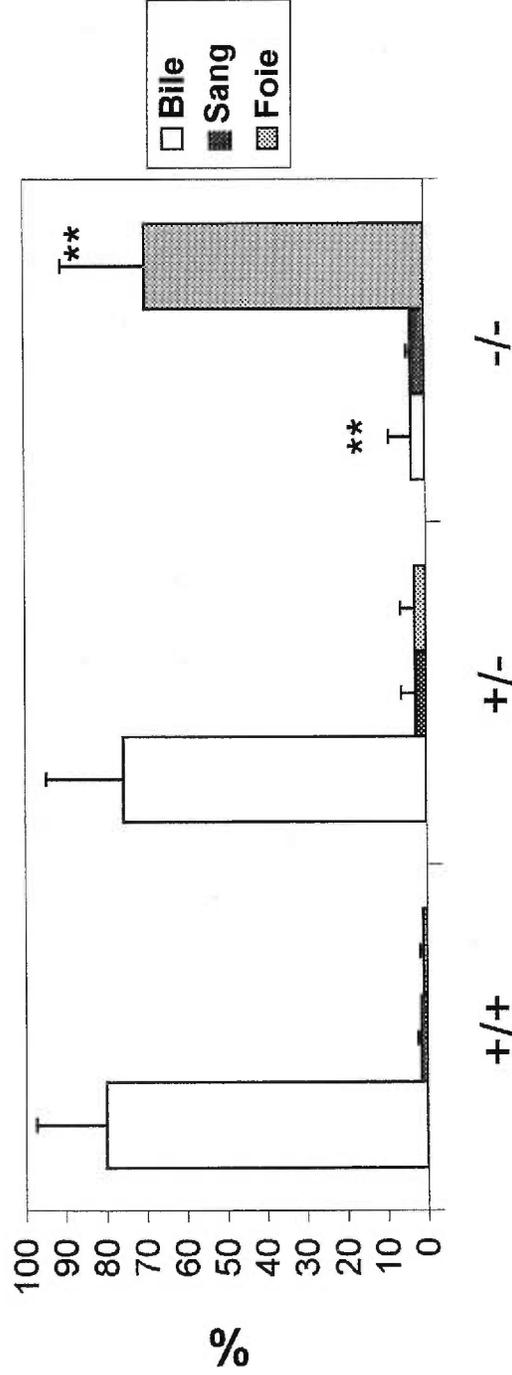
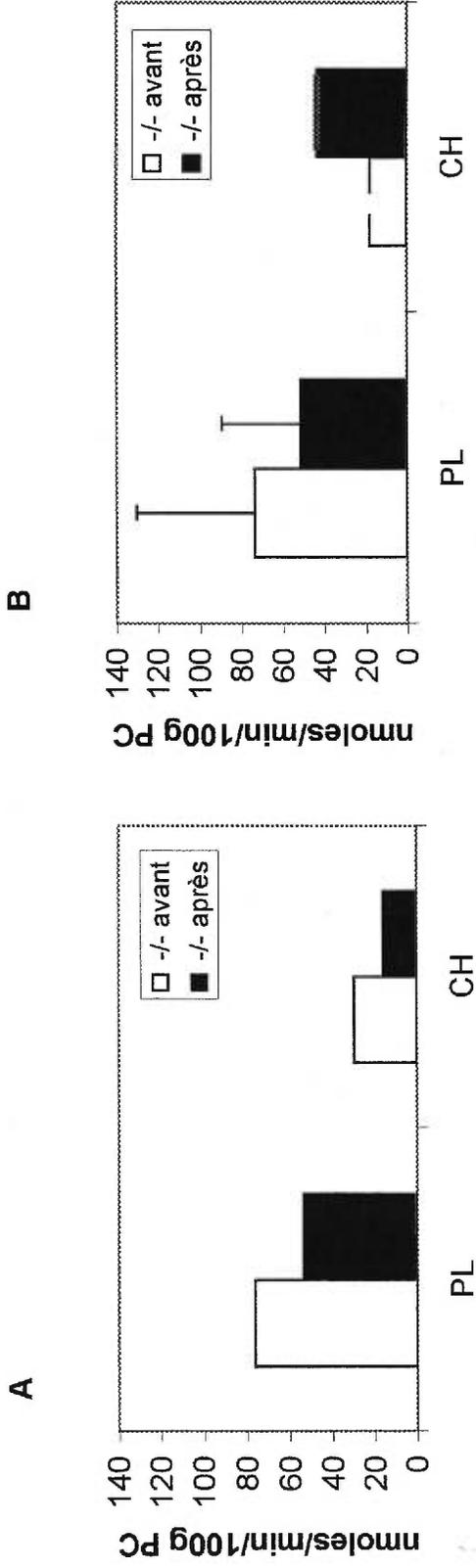


FIGURE 13. Distribution de l'acide taurocholique marqué dans la bile, le sérum et le foie des souris des différents génotypes.

L'acide taurocholique a été infusé à 3,5  $\mu$ moles/100g PC suite à la canulation de la vésicule des souris des différents génotypes. L'accumulation de la radioactivité dans la bile, le sérum et le foie a été déterminée suite à la méthodologie décrite dans la section précédente. Les valeurs sont exprimées en pourcentage et représentent des moyennes  $\pm$  l'écart type pour 4 souris (+/+), 6 (+/-) et 3 (-/-). Différence significative par rapport aux témoins (+/+) (\*\* $p < 0,005$ )



**FIGURE 14. Effet de l'injection d'acides biliaires exogènes sur la sécrétion biliaire**

Résultats préliminaires de l'effet de l'injection de l'acide taurocholique et muricholique sur la sécrétion d'acides biliaires.

Les résultats de la sécrétion lipidique suite à l'injection de l'acide taurocholique sont retrouvés dans le graphique **A**

(n=1 pour Pl et Ch avant l'injection, n=2 pour Pl après l'injection et n=1 pour le Ch après l'injection).

Les résultats de la sécrétion lipidique suite à l'injection de l'acide muricholique sont retrouvés dans le graphique **B**

(n=3 et 2 respectivement pour Pl et Ch avant et après l'injection)

## DISCUSSION

La sœur de la p-glycoprotéine (SPGP/spgp) est une protéine spécifique au foie, fortement associée à la sous-famille des P-glycoprotéines et faisant partie de la famille des protéines ayant un domaine de liaison à l'ATP (Childs et coll., 1995). Récemment, SPGP a été identifié comme étant le transporteur majeur des acides biliaires au niveau canaliculaire chez les mammifères (Gerloff et coll., 1998). Une mutation dans le gène codant pour cette protéine, cartographié au site chromosomal 2q31, est reliée à la cholestase intrahépatique familiale de type 2 (CIFP 2) (Jansen et coll., 1999). Ainsi, la souris *Knock-out* (KO) de *spgp* a été développée (Wang et coll., 2001) afin de caractériser le rôle de cette protéine dans la formation de la bile et le transport d'acides biliaires exogènes dans un modèle murin. Les données obtenues dans cette étude confirment le rôle de transporteur majeur des acides biliaires attribué précédemment à *spgp*. De plus, elles confirment son implication dans le développement de la cholestase. Cependant, ces données démontrent aussi que l'inactivation de *spgp* chez la souris n'abolit pas complètement la sécrétion des acides biliaires *in vivo*, ne menant pas vers une cholestase persistante aussi sévère que celle retrouvée dans la CIFP 2. De cela découle l'hypothèse qu'un autre mécanisme de transport est impliqué dans la sécrétion des acides biliaires chez la souris KO pour ce gène. Cette inactivation ne serait donc pas l'unique cause qui mène vers la cholestase progressive chez l'homme.

Partant de la prémisse que *spgp* est un transporteur d'acides biliaires au niveau canaliculaire, les implications de l'absence de son expression sont claires. Quand *spgp*

est absent, il ne peut y avoir de sécrétion normale d'acides et ceci mène à une pathologie hépatique.

L'observation de l'hépatomégalie retrouvée chez les souris *spgp*<sup>-/-</sup> est le premier signe de pathologie retrouvé chez les souris mutées pour ce gène. Or, tout en présentant un foie hypertrophié, il est présentement difficile d'attribuer cet accroissement à une augmentation de la quantité d'un des constituants du foie. Cependant des études morphologiques poussées tendent vers l'hypothèse de la stéatose (Wang et coll., 2001).

Un second indice de la présence de la pathologie est l'augmentation significative de la concentration des acides biliaires retrouvés dans le sérum (4 fois plus élevée que la normale) et le foie (2 à 5 fois plus élevée que la normale). Ainsi, la mutation ne permettant pas la sécrétion des acides biliaires dans le canalicule, ceux-ci s'accumulent dans l'hépatocyte causant des dommages à celui-ci. De plus, on retrouve un débordement de quelques acides biliaires dans le sérum, probablement par le biais de la bidirectionnalité attribuée au transporteur OATP1 à la membrane basolatérale (Shi et coll., 1995). La Figure 15 schématise ce mécanisme chez les patients atteints de CIFP 2.

## Hépatocyte normal

## Hépatocyte C1FP 2

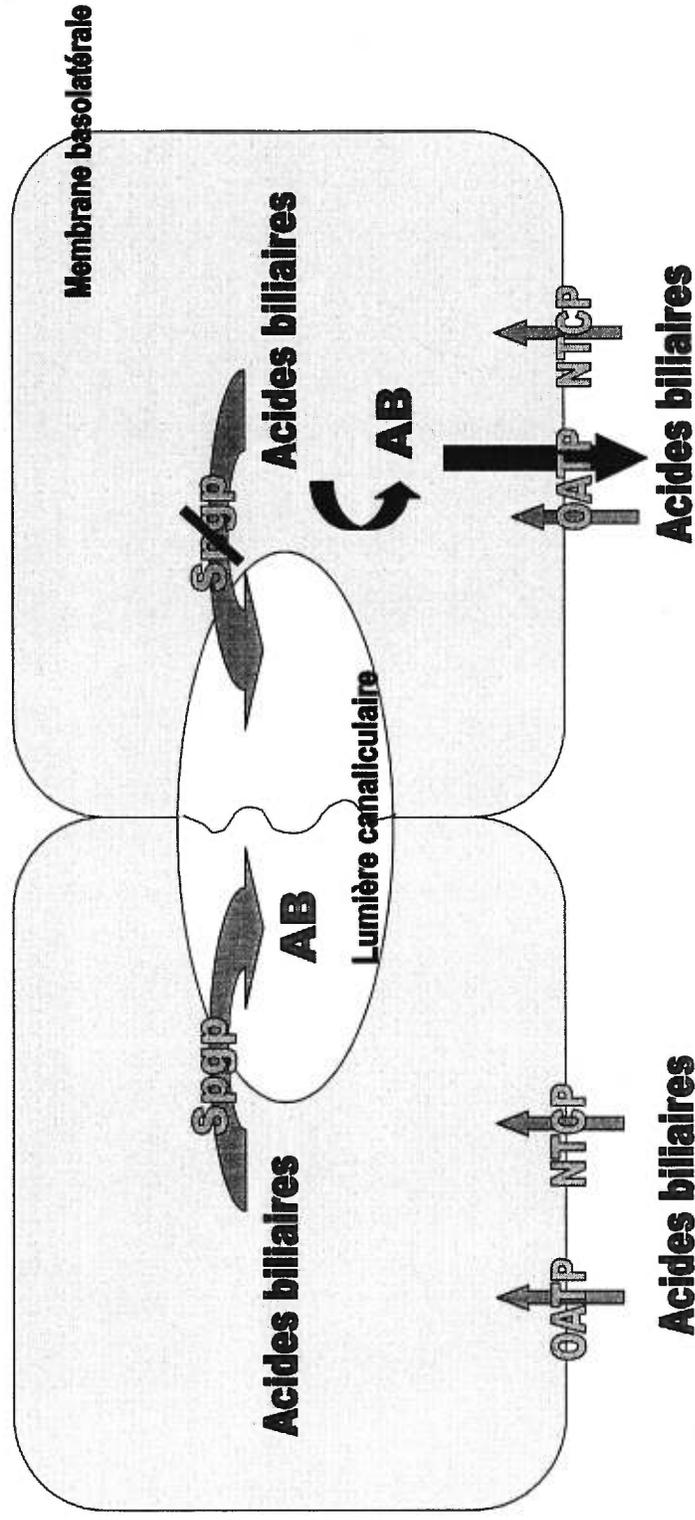


FIGURE 15. Mécanismes de transport des acides biliaires dans l'hépatocyte normal et l'hépatocyte C1FP2

Le défaut dans la C1FP 2 est l'inactivation du transporteur canaliculaire des acides biliaires menant à l'accumulation des acides biliaires dans l'hépatocyte et à leur débordement dans la circulation systémique. (Figure adaptée de Walsh, 1999)

De plus, nos résultats confirment ce qui a été suggéré à propos de *spgp* et sa fonction quant à la formation de la bile. En effet, les données indiquent une baisse du flux biliaire de 16 % chez les souris mutées par rapport aux souris sauvages. Cette baisse bien que légère suggère la cholestase. La sécrétion d'acides biliaires dans la bile est fortement diminuée chez les *spgp*<sup>-/-</sup> ce qui correspond aux résultats escomptés et à ce qui a été préalablement rapporté concernant la sécrétion des acides biliaires dans la bile de patients atteints de CIFP2, où cette sécrétion est dramatiquement diminuée. Cependant, alors que chez les patients atteints de CIFP2 la sécrétion est moins que 1 % de la normale, on retrouve, chez les souris mutées, près de 30% de la quantité d'acides biliaires sécrétés dans la bile de souris sauvages. Or, cette différence pourrait s'expliquer par un processus de compensation qui permettrait à la souris *spgp*<sup>-/-</sup> de sécréter des acides biliaires même en l'absence du transporteur principal. D'autres études devront être effectuées afin de comprendre les éventuels mécanismes de compensation existant chez les souris mutées. Il faudrait examiner l'expression de gènes encodant des enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides biliaires dans le foie (par exemple, Cyp 7a et Cyp 27). Une seconde voie à explorer serait l'étude de l'expression des récepteurs d'hormones, comme Lxr, qui sont impliqués dans la régulation du métabolisme des acides biliaires. De plus, il serait intéressant d'étudier les conséquences d'une nourriture enrichie en acides biliaires qui serait administrée à ces souris. Une telle expérience pourrait peut-être révéler le phénotype cholestatique léthal de la souris mutée.

La mutation dans le gène *spgp* entraîne des changements significatifs du *pool* d'acides biliaires des souris *-/-* par rapport aux souris *+/+* et *+/-*. Nous retrouvons plus d'acides muricholiques, et de nouveaux acides biliaires (acides tétrahydroxylés), dans la bile, mais aussi dans le sérum et le foie de ces souris. La présence d'acides biliaires tétrahydroxylés et d'une grande quantité d'acides biliaires trihydroxylés sont aussi considérés comme étant des signes de cholestase. Ces acides biliaires trihydroxylés sont en majorité des acides muricholiques. L'acide cholique ne représente plus que 11 % des acides biliaires retrouvés dans la bile des souris mutées, contre 60 % chez les souris sauvages. La présence d'acides biliaires tétrahydroxylés a été rapportée dans la cholestase intrahépatique reliée à la grossesse (Nemeth et Strandvik, 1984) et dans plusieurs autres pathologies cholestatiques chez l'homme (Yousef et Tuchweber, 1997; Nakagawa et Setchell, 1990; Radomska-Pyrec et coll., 1987; Setchell et coll, 1988b). Elle est aussi observée dans l'urine d'un patient du *BC's Children Hospital* atteint de CIFP 2 (Figure 16).

---



Le spectre obtenu grâce au GC/MS de l'acide tétrahydroxylé indique la présence de l'ion 251, spécifique à la fragmentation d'un noyau stéroïdien contenant 4 groupements hydroxyles. La présence des 4 groupements hydroxylés a d'ailleurs été confirmée par l'analyse grâce au LC/MS/MS de ces acides biliaires qui ont un poids moléculaire de 530 ou 16 de plus que le poids moléculaires des acides trihydroxylés conjugués à la taurine. On considère que l'hydrophilicité des acides biliaires est imputée au nombre de groupements hydroxylés. Ainsi les acides tétrahydroxylés seraient plus hydrophiles que les acides trihydroxylés (Narain et coll., 1998). Ceci pourrait expliquer, en partie, la différence de sévérité observée entre la mutation chez l'homme et la mutation chez la souris, où la quantité de ces acides est assez substantielle et peut contribuer à réduire les dommages produits par l'accumulation d'acides biliaires hydrophobes dans l'hépatocyte. De plus, la présence de ces acides biliaires dans la bile pourraient expliquer le fait que le flux biliaire ne se trouve que légèrement diminué chez les souris homozygotes.

Il est généralement qu'une corrélation positive existe entre la sécrétion des acides biliaires et celle des lipides biliaires. En effet, les acides biliaires sont requis pour extraire la phosphatidylcholine de la membrane canaliculaire et la dissoudre dans la bile (Oude Elferink et coll., 1995a). Or, chez les souris *spgp*<sup>-/-</sup>, nous remarquons une hypersécrétion inattendue de lipides biliaires. Ainsi, la sécrétion des phospholipides est augmentée de 2 fois par rapport aux souris sauvages tandis que la sécrétion du cholestérol l'est de 6 fois par rapport aux souris exprimant normalement le transporteur. Cette augmentation n'est pas attribuable à différentes espèces de phospholipides puisque la composition en phospholipides ne diffère pas entre les différents génotypes. Bien que

nous ne comprenions pas les assises de cette augmentation, il est possible d'émettre des hypothèses quant à cette observation. Le changement dans le pool d'acides biliaires comme la présence d'acides tétrahydroxylés pourrait causer cette augmentation des lipides biliaires. Cependant, cette hypothèse peut être sujette à la controverse, puisque selon la littérature, les acides biliaires plus hydrophiles auraient tendance à être moins efficaces quant à la sécrétion biliaire (Coleman et Rahman, 1992). Des études préliminaires ne nous permettent pas d'attribuer cette hausse aux types d'acides biliaires présents majoritairement dans la bile des souris +/- comme l'acide taurocholique et les acides muricholiques puisque l'injection de ces acides biliaires n'a pas résulté en une augmentation notable de la quantité des lipides biliaires. Cependant d'autres études sont nécessaires pour infirmer cette hypothèse. Une seconde hypothèse serait la présence d'un mécanisme de compensation chez la souris qui mènerait vers une régulation à la hausse de l'expression de la protéine sécrétant la phosphatidylcholine, soit mdr2.

Les résultats obtenus suite à l'injection d'acides biliaires exogènes concordent avec la littérature reliée à spgp. Ainsi, les acides taurocholique et muricholique exogènes injectés n'étaient pas transportés dans la bile des souris homozygotes. De plus, 30 minutes suivant l'infusion, l'acide taurocholique est retrouvé majoritairement dans la bile de souris sauvages et hétérozygotes alors qu'il est majoritairement retrouvé dans le foie des souris homozygotes.

## CONCLUSION

Cette étude a permis de caractériser le rôle de *spgp* chez la souris au niveau canaliculaire par rapport à la formation de la bile et au transport d'acides biliaires exogènes. Nos résultats concordent avec le rôle attribué à *spgp* soit celui de transporter les acides biliaires d'un côté à l'autre de la membrane canaliculaire. Dans les études effectuées au niveau de la formation de la bile et du transport, les souris hétérozygotes ne présentaient aucune différence significative comparativement au phénotype des souris sauvages. Nos études suggèrent la présence d'autres transporteurs d'acides biliaires bien que ce transporteur d'acides biliaires soit le principal chez la souris. Ainsi un transport alternatif pourrait exister ayant une préférence pour les acides biliaires hydrophiles puisque *spgp*<sup>-/-</sup> sécrète en majorité des acides biliaires hydrophiles. L'hydroxylation des acides biliaires dans la souris mutante pourrait servir non seulement comme mécanisme de détoxification des acides biliaires hydrophobes mais aussi comme une voie alternative de sécrétion de concentration normalement toxique d'acides biliaires hydrophobes.

Ces souris présentent des signes de cholestase qui n'est pourtant pas progressive et ne concorde pas avec la sévérité de la maladie attribuée à cette mutation chez les humains. Ce modèle murin peut être comparé à la maladie humaine sous divers aspects comme le résume le Tableau VII. Ce modèle comporte des limites cités dans ce dernier tableau. En effet, les souris mutées ont une diminution significative de la quantité d'acides biliaires dans la bile mais chez l'homme la pathologie mène à la quasi-abolition

de ces acides biliaires. De plus, le modèle murin ne progresse pas vers une cholestase persistente alors que chez l'homme, la pathologie due à la mutation est plus sévère. Cependant ce modèle permettra certainement de mieux cerner la pathologie humaine reliée à la mutation et pourra être utile pour l'essai de certaines interventions thérapeutiques.

**TABLEAU VII. Comparaison entre la mutation chez la souris (spgp -/-) et chez l'homme (BSEP -/-)**

SOURIS	HOMME
<ul style="list-style-type: none"> <li>▣ ↓ de la concentration d'acides biliaires dans la bile. (de 70 %)</li> <li>▣ Bile majoritairement composée d'acides cholique, muricholique et tétrahydroxylés. (AB détoxifiants, plus hydrophiles)</li> <li>▣ Absence de l'acide tétrahydroxylé chez les souris (+/+) et (+/-).</li> <li>▣ ↑ de la concentration d'acides biliaires sériques des (-/-) par rapport aux (+/+) et (+/-).</li> <li>▣ Pas d'augmentation du niveau la GGT sérique des (-/-) par rapport aux (+/+) et (+/-).</li> <li>▣ Les souris hétérozygotes (+/-) ont un phénotype semblable aux sauvages (+/+)</li> <li>▣ ne progresse pas vers une cholestase persistente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▣ ↓ de la concentration d'acides biliaires dans la bile. (de 99%)</li> <li>▣ Bile majoritairement composée d'acides cholique.</li> <li>▣ Absence de l'acide tétrahydroxylé de l'urine chez les hommes où la mutation n'est pas retrouvée et chez ceux dont la mutation n'est retrouvée que sur un seul allèle.</li> <li>▣ ↑ de la concentration d'acides biliaires sériques.</li> <li>▣ Pas d'augmentation du niveau la GGT sérique des (-/-) par rapport aux (+/+) et (+/-).</li> <li>▣ Les patients dont la mutation ne se retrouve que sur un seul allèle ont un phénotype normal</li> <li>▣ progresse vers une cholestase persistente</li> </ul>

NOTE. Les données concernant l'homme (acides biliaires dans la bile et sériques, ainsi que le niveau de GGT sérique sont tirées de Jansen, P.L.M. et coll., 1999)

## **BIBLIOGRAPHIE**

**Adachi, Y., Kobayashi, H., Kurumi, Y., Shouji, M., Kitano, M., et Yamamoto, T.** *ATP-dependent taurocholate transport by rat liver canalicular membrane vesicles.* Hepatology, 14 : 655-659 (1991)

**Allikmets, R., Gerrard, B., Hutchinson, A. et Dean, M.** *Characterization of the human ABC superfamily : isolation and mapping of 21 new genes using the Expressed Sequence Tags database.* Hum Mol Genet, 5 : 1649-1655 (1996).

**Arias, I.M., Che, M., Gatmaitan, Z.C., Leveille, C., Nishida, T. et St Pierre, M.** *The biology of the bile canaliculus.* Hepatology, 17 : 318-329 (1993).

**Bahar, R.J. et Stolz, A.** *Bile acid transport.* Gastroenterol Clin North Am, 28 : 27-58 (1999).

**Ballatori, N. et Truong, A.T.** *Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation.* Am J Physiol, 263 : G617-G624 (1992).

**Bartlett, G.R.** *Phosphorus assay in column chromatography.* J Biol Chem, 234 : 466-468 (1959).

**Beg, A.A., Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S. et Baltimore, D.** *Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B.* Nature, 376 : 167-170 (1995).

**Bouscarel, B., Kroll, S.D. et Fromm, H.** *Signal transduction and hepatocellular bile acid transport cross talk between bile acids and second messengers.* Gastroenterology, 117 : 433-452 (1999).

**Boyer, J.L.** *New concepts of mechanism of hepatocyte bile formation.* Physiol Rev, 60: 303-326 (1980).

**Bull, L.N., Van Eijk, M.J.T., Pawlikowska, L., DeYoung, J.A., Juijin, J.A., Liao, M., Klomp, L.W.J., Lomri, N., Berger, R., Scahrshmidt, B.F., Kniseley, A.S., Houwen, R.H.J. et Freimer, N.B.** *A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis.* Nat Genet 1998, 18 : 219-224

**Caldwell, J.** *Conjugation Reactions in the metabolism of Xenobiotics.* Dans : **Arias, I.M., Popper, H., Schachter, D. et Shafritz, D.A.** (eds). *The liver : Biology and Pathobiology.* Raven Press, New York, 281-295 (1982).

**Carey, M.C., Duane, W.C.** *Enterohepatic circulation*. Dans : **Arias, I.M., Boyer, J.L., Fausto, N., Jakoby, W.B., Schachterand, D.A. et Shafritz, D.A.** (eds). *The liver Biology and Pathobiology*. Raven Press, New York, 719-767 (1994).

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

**Clayton, R.J., Iber, F.L., Ruebner, B.H. et McKusick, V.A.** *Byler disease : fatal familial intrahepatic cholestasis in an Amish kindred*. *Am J Dis Child*, 117 : 112-124 (1969).

**Clayton, P.T., Leonard, J.V., Lawson, A.M., Setchell, K.D., Andersson, S., Egestad, B. et Sjøvall, J.** *Familial giant cell hepatitis associated with synthesis of 3 beta, 7 alpha-dihydroxy-and 3 beta, 7alpha, 12 alpha-trihydroxy-5-cholenoic acids*. *J Clin Invest*, 79 : 1031-1038 (1987).

**Coleman, R. et Rahman, K.** *Lipid flow in bile formation*. *Biochim Biophys Acta*. 1125 : 113-133 (1992).

**Crawford, J.M., Berken, C.A. et Gollan, J.L.** *Role of the hepatocyte microtubular system in the excretion of bile salts and biliary lipid : implications for intracellular vesicular transport*. *J Lipid Res*, 29 : 144-156 (1988).

**Cressman, D.E., Greenbaum, L.E., De Angelis, R.A., Ciliberto, G., Furth, E.E., Poli, V. et Taub, R.** *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice*. *Science*, 274 : 1379-1383 (1996).

**Danielson, H., Nair, P.P. et Kritchevski, D.** (eds). *The bile acids*. Plenum Press, New York, 1-32 (1973).

**Dean, M. et Allikmets, R.** *Evolution of ATP- binding cassette transporter genes*. *Curr Opin Genet Dev*, 5 : 779-785 (1995).

**Dionne, S., Tuchweber, B., Plaa, G.L. et Yousef, I.M.** *Phase I and II metabolism of lithocholic acid in hepatic acinar zone 3 necrosis. Evaluation in rats by combined radiochromatography and gas-liquid chromatography-mass spectrometry*. *Biochem Pharmacol*, 48 : 1187-1197 (1994).

**Dubin, M., Maurice, M., Feldmann, G. et Erlinger, S.** *Influence of colchicine and phalloidin on bile secretion and hepatic ultrastructure in the rat. Possible interaction between microtubules and microfilaments*. *Gastroenterology*, 79 : 646-654 (1980).

**Erlinger, S.** *Bile flow*. Dans : **Arias, I.M., Jakoby, W.B., Popper, H., Schachter, D. et Shafritz D.A.** (eds). *The liver : Biology and Pathobiology*. Raven Press, New York, 643-658 (1988).

**Erlinger, S.** *Intracellular events in bile acid transport by the liver.* Dans : **Tavoloni, N. et Berk, P.D. (eds).** *Hepatic transport and bile secretion. Physiology and Pathophysiology.* Raven Press, New York, 467-475 (1993).

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

**Erlinger S.** *Génétique moléculaire des cholestases familiales.* Gastroenterol Clin Biol, 23 : 195-198(1999)

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

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

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

**Goldstein, J.L., Brown, M.S., In Scrive, C.P., Beudet, A.L., Sly, W.S. et Valle, D. (eds).** *The metabolic basis of inherited diseases.* McGraw-Hill Inc. New York, 1215-1250 (1989).

**Green, R.M., Hoda, F., Ward, K.L.** *Molecular Cloning and characterization of the murine bile salt export pump.* Gene, 241 : 117-123 (2000).

**Haussinger, D., Saha, N., Hallbrucker, C., Lang, F. et Gerok W.** *Involvement of microtubules in the swelling-induced stimulation of transcellular taurocholate transport in perfused rat liver.* Biochem J, 291 : 355-360 (1993).

**Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H. et Stanley, K.K.** *Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor.* EMBO J, 7 : 4119-4127 (1988).

**Hilberg, F., Aguzzi, A., Howells, N. et Wagner, F.F.** *c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis.* Nature, 365 : 179-181 (1993).

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

**Houwen, R.H.J., Baharloo, S., Blankenship, K., Raeymaekers, P., Juyn, J., Sandkuijl, L.A. et Freimer, N.B.** *Genome screening by searching for shared segments : mapping a gene for benign recurrent intrahepatic cholestasis.* Nat Genet, 8 : 380-386 (1994)

**Jansen, P.L., Strautnieks, S.S., Jacquemin, E., Hadchouel, M., Sokal, E.M., Hooiveld, G.J., Koning, J.H., De Jager-Krieken, A., Kuipers, F., Stellaard, F., Bijleveld, C.M., Gouw, A., Van Goor, H., Thompson, R.J. et Müller, M.** *Hepatocanicular Bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial Intrahepatic cholestasis.* Gastroenterology, 117 :1370-1379 (1999).

**Jansen, P.L. et Müller, M.** *The molecular genetics of familial intrahepatic cholestasis.* Gut, 47 : 1-5 (2000)

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

**Kazama, Y., Hamamoto, T., Foster, D.C. et Kisiel, W.J.** *Hepsin, a putative membrane-associated serine protease, activates human factor VII and initiates a pathway of blood coagulation on the cell surface leading to thrombin formation.* J Biol Chem, 270 : 66-72 (1995)

**Keppler, D. et Konig, J.** *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 (1997).

**Koepsell, H.,** *Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain.* Annu Rev Physiol, 60 : 243-266 (1998).

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

**Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Van eijk, M.J.T., Juijn, J., Baas, F. et Borst, P.** *Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4 and MRP5, homologues of the multidrug resistance associated protein gene (MRP1) in human cancer cell lines.* Cancer Res, 57 : 3537-3547 (1997).

**Koopen, N.R.** *Regulation of Hepatic Transport in Experimental Cholestasis.* Thèse de doctorat, Université de Groningen (1999).

**Kuipers, F., Van Ree, J.M., Hofker, M.H., Wolters, H., In't Veld, G., Havinga, R., Vonk, R.J., Princen, H.M. et Havekes, L.M.** *Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver.* Hepatology, 24 : 241-247 (1996).

**Kusuhara, H., Suzuki, H., et Sugiyama, Y.** *The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs.* J Pharm Sci, 87 : 1025-1040 (1998).

**Labarca, C., et Paigen, K.** A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. Anal Biochem, 102 : 344-352 (1980)

**Lamers, W.H., Hilberts, A., Furt, E., Smith, J., Jonges, G.N., Van Noorden, C.J.F., Gaasbeek Janzen, J.W., Charles, R. et Moorman, A.F.M.** *Hepatic enzymic zonation : a reevaluation of the concept of the liver acinus.* Hepatology, 10 : 72-76 (1989).

**Lecureur, V., Sun, D., Hargrove, P., Schuetz, E.G., Kim, R.B., Lan, L. et Schuetz, J.D.** *Cloning and expression of Murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-Glycoprotein.* Mol Pharm, 57 : 24-35 (2000).

**Ling, V.** *Multidrug resistance : molecular mechanisms and clinical relevance.* Cancer Chemother Pharmacol, 40 : S3-S8 (1997)

**Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J.** *Protein measurement with the folin phenol reagent.* J Biochem, 193 : 265-275 (1951).

**Luther, T.T., Hammerman, P., Rahmaoui, C.M., Lee, P.P., Sela-Herman, S., Matula, G.S., Anathanarayanan, M., Suchy, F.J., Cavalieri, R.R., Lomri, N. et Scharschmidt, B.F.** *Evidence for an ATP-dependent bile acid transport protein other than the canalicular liver ecto-ATPase in rats.* Gastroenterology, 113 : 249-254 (1997).

**Madon, J., Eckhardt, V., Gerloff, T., Stieger, B. et Meier, P.J.** *Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein.* FEBS Lett, 406 : 75-78 (1997).

**Mazer, N.A. et Carey M.C.** *Mathematical model of biliary lipid secretion : a quantitative analysis of physiological and biochemical data from man and other species.* J Lipid Res, 25 : 932-953 (1984).

**Meier, P.J.** *Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile.* Am J Physiol, 269 (6 Pt 1) : G801-G812 (1997)

**Meier, P.J., St Meier-Abt, A., Barrett, C. et Boyer, J.L.** *Mechanisms of taurocholate transport in canalicular and basolateral rat liver plasma membrane vesicles. Evidence for an electrogenic canalicular organic anion carrier.* J Biol Chem, 259 : 10614-10622 (1984).

**Müller, M.** *Molecular properties of hepatobiliary transport.* [www.med.rug.nl/mdl/slide/sld001.htm](http://www.med.rug.nl/mdl/slide/sld001.htm) (1998)

**Müller, M. et Jansen P.L.M.** *Molecular aspects of hepatobiliary transport.* Am J Physiol 272 : G1285- G1303 (1999).

**Müller, M.** *Human ATP-Binding Cassette transporters.* [www.med.rug.nl/mdl/humanabc.htm](http://www.med.rug.nl/mdl/humanabc.htm) (2000)

**Mutero, A., Bull, L.H. et Pawlikowska, L.** *Cloning and tissue distribution of the rat homologue of the human gene involved in familial intrahepatic cholestasis type 1.* Hepatology, 28 : 530A (1998)

**Nathanson, M.H. et Boyer, J.L.** *Mechanisms and regulation of bile acid secretion.* Hepatology, 14 : 551-566 (1991).

**Nakagawa, M. et Stechell, K.D.** *Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid.* J Lipid Res, 31 : 1089-1098 (1990).

**Narain, P.K., DeMaria, E.J. et Heuman, D.M.** *Lecithin protects against plasma membrane disruption by bile salts.* J Surg Res, 78 : 131-136 (1998).

**Nemeth, A. et Strandvik, B.** *Urinary excretion of tetrahydroxylated bile acids in children with alpha-1 antitrypsin deficiency and neonatal cholestasis.* Scand J Clin Lab Invest, 44, 387-392 (1984).

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

**Nishida T., Gatmaitan, Z., Che, M. et Arias, I.M.** *Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP dependent bile acid transport system.* Proc Natl Acad Sci USA, 88, 6590-6594 (1991).

**Oda, T., Elkahloun, A.G., Pike, B.L., Okajima, K., Krantz, I.D., Genin, A., Piccoli, D.A., Meltzer, P.S., Spinner, N.B., Collins, F.S. et Chandrasekharappa, S.C.** *Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome.* Nat Genet, 16 : 235-242 (1997).

**Ortiz, D.F., Li, S., Iyer, R., Zhang, X., Novikoff, P. et Arias, I.M.** *MRP3, a new ATP-binding cassette protein localized to the canalicular domain of the hepatocyte.* Am J Physiol, 39: G1493-G1500 (1999).

**Oude Elferink, R.P.J., Meijer, D.K.F., Kuipers, F., Jansen, P.L.M., Groen, A.K. et Grotthuis, G.M.M.** *Hepatobiliary secretion of organic compounds; mechanisms of membrane transport.* Biochem Biophys Acta, 1241: 215-268 (1995a).

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

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

**Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E. et Mangelsdorf, D.J.** *Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha.* Cell, 93 : 693-704 (1998).

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

**Radomska-Pyrec, A. Zimniak, P., Irshaid, Y.M., Lester, R., Tephly, T.R. et St Pyrec, J.** *Glucuronidation of 6-alpha-hydroxy bile acids by human liver microsomes.* J Clin Invest, 80 : 234-241 (1987).

**Reynier, M.O., Abou Hashieh, I., Crotte, C., Carbuccia, N., Richard, B. et Gerolami, A.** *Monensin action on the Golgi complex in perfused rat liver : evidence against bile salt vesicular transport.* Gastroenterology, 102 : 2024-2032 (1992).

**Rosen, H., Reshef, A., Maeda, N., Lippoldt, A., Shpizen, S., Triger, L., Eggertsen, G., Bjorkhem, I. et Leitersdorf, E.** *Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27-hydroxylase gene.* J Biol Chem, 273 : 14805-14812 (1998).

**Schwarz M., Lund, E.G., Setchell, K.D.R., Kayden, H.J., Zerwekh, J.E., Bjorkhem, I., Herz, J. et Russel, D.W.J.** *Disruption of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7alpha-hydroxylase.* J Biol Chem, 271 : 18024-18031(1996).

**Setchell, K.D., Suchy, F.J., Welsh, M.B., Zimmer-Nechemias, L., Heubi, J. et Balistreri, W.F.** *Delta 4-3-oxosteroid 5 beta-reductase deficiency described in identical twins with neonatal hepatitis. A new inborn error in bile acid synthesis.* J Clin Invest, 82: 2148-2157 (1988a)

**Setchell, K.D., Dumaswala, R., Colombo, C. et Ronchi, M.** *Hepatic bile acid metabolism during early development revealed from the analysis of human fetal gallbladder bile.* J Biol Chem, 263 : 16637-16644 (1988b).

**Shi, X., Bai, S., Ford, A.C., Burk R.D., Jacquemin, E., Hagenbuch, B., Meier, P.J. et Wolkoff, A.W.** *Stable inducible expression of a functional rat liver organic anion transport protein in HeLa cells.* J Biol Chem, 270 : 25591-25595 (1995)

**Smith J.,J.M., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P.J., Groen, A.K., Wagenaar, B., Van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhoff, R., Van der Lugt, N.M., Van Roon, M.A.** Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 75 : 451-462 (1993).

**Smith, A.J., De Vree, J.M., Ottenhoff, R., Oude Elferink, R.P.J., Schinkel, A.H. et Borst, P.** *Hepatocyte-specific expression of the human MDR 3 P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in Mdr2 (-/-) mice.* *Hepatology*, 28 : 530-536 (1998).

**Smith, A.J. et Oude Elferink, R.P.J.** *Liver gene disruptions : winners by KO ?* *J Hepatol*, 31 : 752-759 (1999).

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

**Strautnieks, S.S., Kagalwalla, A.F., Tanner, M.S., Gardiner, R.M. et Thompson, R.J.** *Locus heterogeneity in progressive familial intrahepatic cholestatic.* *J Med Genet*, 33 : 833-836 (1996)

**Strautnieks, S.S., Bull, L.B., Knisely, A.S., Kocoshis, S.A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A., Németh, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Breimer, N.B., Gardiner, R.M. et Thompson, R.J.** *A gene encoding a liver specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis.* *Nat Genet*, 20 : 233-238 (1998).

**Summerskill, W.H.J. et Walshe, J.M.** *Benign recurrent intrahepatic 'obstructive' jaundice.* *Lancet*, 2 : 686-690 (1959).

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

**Tavaloni N.** *The intrahepatic biliary epithelium : an area of growing interest in hepatology.* *Sem Liv Dis*, 7 : 280-292 (1987).

**Torres-Rosado, A., O'Shea, K.S., Tsuji, A., Chou, S.H. et Kurachi, K.** *Hepsin, a putative cell-surface serine protease, is required for mammalian cell growth.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 90 : 7181-7185 (1993).

**Tsukada, N., Azuma, T., et Phillips, M.J.** *Isolation of the bile canalicular actin-myosin II motor.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 6919-6923 (1994).

**Van Berge, H.G.P., Brandt K.H. et dePagter A.G.** *Is an acute disturbance in hepatic transport of bile acids the primary cause of cholestasis in benign recurrent intrahepatic cholestasis?* *Lancet*, 1 : 1249-1251 (1974)

**Vander, A.J., Sherman, J.H. et Luciano D.S.** *Physiologie humaine*. McGrawhill, Montréal, 345-380 (1977).

**Van Dyke R.W., Stephens J.E. et Scharschmidt B.F.** *Bile acid transport in cultured rat hepatocytes*. Am J Physiol, 243 : G511-517 (1982).

**Van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P. et Van Meer, G.** *MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 p-glycoprotein specifically transports phosphatidylcholine*. Cell, 87 : 507-517 (1996).

**Van Ree, J.H., Van den Brock, W.J.A.A., Dahlmans, V.E.H., Groot, P.H.E., Vidgeon-hart, M., Frants R.R., Wieringa, B., Havekes, L.M. et Hofker, M.H.** Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 111 : 25-37 (1994).

**Vlahcevic, R.Z., Pandak, M. et Stravitz, R.T.** *Regulation of bile acid biosynthesis*. Gastroenterol Clin North Am, 28 : 1-25 (1999).

**Wada, M., Toh, S., Taniguchi, K., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Yoshida, I., Kimura, A., Sakisaka, S., Adachi, Y. et Kuwano, M.** *Mutations in the canalicular multispecific anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome*. Hum Mol Genet, 7 : 203-207 (1998).

**Wang, R., Salem, M., Yousef, I.M., Tuchweber, B., Lam, P., Childs, S., Helgason, C.D., Ackerley, C., Phillips, M.J. et Ling, V.** *Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein (spgp) in mice results in non-progressive but persistent intrahepatic cholestasis*. Proc Natl Acad Sci USA, 98, 2011-2016 (2001).

**Wolkoff, A.W., Suchy, F.J., Moseley, R.H., Meier, P.J., Gollan, J.L., Freimer, N., Fitz, J.G., Boyer, J.L., Berk, P.D. et Scharschmidt, B.F.** *Advances in Hepatic Transport : Molecular Mechanisms, Genetic Disorders and treatment. A summary of the 1998 AASLD Single Topic Conference*. Hepatology, 28; 6 : 1713-1719 (1998).

**Wolters, H., Kuipers, F., Slooff, M.J.H. et Vonk, R.J.** *Adenosine triphosphate-dependent taurocholate transport in human liver plasma membranes*. J Clin Invest, 90 : 2321-2326 (1992).

**Yamazaki, M., Kobayashi, K. et Sugiyama, Y.** *Primary active transport of pravastatin across the liver canalicular membrane in normal and mutant Eisai hyperbilirubinaemic rats*. Biopharm Drug Dispos, 17 :645-659 (1996)

**Yousef, I.M. et Tuchweber, B.** *Screening urinary bile acids for genetic defects in bile acid synthesis?* Can J Gastroenterol, 11 : 541-543 (1997)

**Zegers, M.M.P. et Hoekstra D.** *Mechanisms and functional features of polarized membrane traffic in epithelial and hepatic cells.* Biochem J, 336 : 257-269 (1998).

**ANNEXE**

**Targeted inactivation of Sister of P-glycoprotein gene (*spgp*) in mice  
results in non-progressive but persistent intrahepatic cholestasis**

Renxue Wang\*, Myriam Salem<sup>†</sup>, Ibrahim M. Yousef<sup>†</sup>, Beatriz Tuchweber<sup>‡</sup>, Ping  
Lam\*, Sarah J. Childs\*<sup>§</sup>, Cheryl D. Helgason\*, Cameron Ackerley<sup>¶</sup>, M. James Phillips<sup>¶</sup>,  
Victor Ling\*<sup>‡</sup>

\* British Columbia Cancer Research Center, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, British  
Columbia, Canada V5Z 1L3. <sup>†</sup>Department of Pharmacology and <sup>‡</sup> Department of Nutrition, University of  
Montreal, Montreal, Canada H3C 3J7 and Pediatric Research Center, Hospital Ste Justine. <sup>§</sup> Present  
Address: Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital, Charlestown, MA 02129. <sup>¶</sup> The  
Hospital for Sick Children, Department of Pathology, Toronto, Ontario, Canada M5G 1X8.

---

Abbreviations: Spgp, sister of P-glycoproteins; PFIC2, type 2 progressive familial intrahepatic  
cholestasis.

<sup>‡</sup> To whom reprint requests should be addressed at: British Columbia Cancer Research Center, British  
Columbia Cancer Agency, Vancouver, British Columbia, Canada V5Z 1L3. E-mail: vling@bccancer.bc.ca

Mutations in the sister of P-glycoprotein (Spgp) or bile salt export pump (BSEP) are associated with Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis (PFIC2). Spgp is predominantly expressed in the canalicular membranes of liver. Consistent with *in vitro* evidence demonstrating the involvement of Spgp in bile salt transport, PFIC2 patients secrete less than 1% of biliary bile salts compared to normal infants. The disease rapidly progresses to hepatic failure requiring liver transplantation prior to adolescence. In this study, we show that the knockout of *spgp* gene in mice results in intrahepatic cholestasis, but with significantly less severity than PFIC2 in humans. Some unexpected characteristics are observed. Notably, although the secretion of cholic acid in mutant mice is greatly reduced (6% of wild-type), total bile salt output in mutant mice is about 30% of wild-type. Also, secretion of an unexpectedly large amount of tetra-hydroxylated bile acids (not detected in wild-type) is observed. These results suggest that hydroxylation and an alternative canalicular transport mechanism for bile acids compensate for the absence of Spgp function and protect the mutant mice from severe cholestatic damage. In addition, the *spgp*<sup>-/-</sup> mice display a significant increase in the secretion of cholesterol and phospholipids into the bile. Based on this finding, we propose that intrahepatic, rather than intracanalicular, bile salts are the major driving force for the biliary lipid secretion. The *spgp*<sup>-/-</sup> mice thus provide a unique model for gaining new insights into therapeutic intervention for intrahepatic cholestasis and understanding mechanisms associated with lipid homeostasis.

Bile acids are critical as carriers for elimination of cholesterol from the body through biliary secretion and as a detergent for the ingestion of fatty acids and fat-soluble vitamins (1). They also play important roles in regulating cell apoptosis/survival (2-6) and in regulating gene expression through the farnesoid X-activated receptor (7, 8) in hepatocytes. Bile acids are synthesized in hepatocytes from cholesterol, secreted into the bile after being conjugated with glycine or taurine, reabsorbed in the duodenum and re-circulated back to hepatocytes through the portal vein. Canalicular secretion of bile acids from liver into the bile is a key process in the enterohepatic circulation of bile acids and its malfunction results in different hepatic diseases (1). Canalicular bile salts transport appears to be mediated by the sister of P-glycoprotein (Spgp) (9) also known as the bile salt export pump (BSEP) (10)

Spgp is a canalicular specific ATP binding cassette (ABC) transporter and a close relative of the multidrug resistant P-glycoprotein (mdr) (11, 12). Expression of the rat *spgp* gene in *Xenopus laevis* oocytes results in a 1.5 fold higher [3H]-taurocholate efflux and the reconstituted membrane vesicles from Spgp-transfected sf9 insect cells exhibits 5 fold stimulation of ATP-dependent taurocholate transport, with a Km of 5.3  $\mu$ M, consistent with Spgp being a bile acid transporter (10). Mutations in the *spgp* gene has been associated with a severe human genetic disease, type 2 Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis (PFIC2) (13). Total bile acid secretion in PFIC2 patients is only 1% of the normal (14). In mice, *spgp* or a nearby locus may be associated with cholesterol gallstone susceptibility (15). All the above evidence agrees with Spgp being a canalicular bile acid transporter.

To further investigate the role *Spgp* plays in biliary secretion of bile acids and to understand how *spgp* deficiency results in PFIC2 and affects bile formation and cholesterol homeostasis, we have generated a knockout mice model using homologous recombination. This study provides novel insights into the role *Spgp* plays in regulating bile salts and lipid transport in these mutant mice.

### Materials And Methods

**Generation of *spgp*<sup>-/-</sup> mutant mice.** Two different ES cell lines were used. TL-1 embryonic stem cells and E14K embryonic stem cells from 129Sv/Ev mice were generous gifts from Dr. Patricia Labosky (University of Pennsylvania, Philadelphia) and Dr. Tak Mak (Amgen Institute, Toronto), respectively. Genomic DNA of murine *spgp* gene was isolated from a  $\lambda$  phage library of 129/J genomic DNA, using rat *spgp* cDNA as probe (11). One of the obtained genomic clones, 129J-9 and an additional fragment of 1.6 kilobases on the 5' end of 129J-9, which was cloned by PCR amplification, were used to generate the targeting vector (Fig1A). The targeting vector was linearized with *Sst* I and electroporated into TL-1 and E14k embryonic stem cells at 340 volts and 250  $\mu$ F of capacitance. ES cell clones surviving G418 selection were screened by Southern blot analysis. Four of the eleven targeted ES cell lines were subsequently used to produce chimeric mice and chimeric mice from three lines with germline transmission were used in this study. The heterozygous mutant mice from each generation were crossed into C57Bl/6J. Homozygous mutant mice were produced by intercross of the heterozygous mice. Genotypes of the ES cells and mice were determined by Southern blot analysis

using a 1 kb probe upstream of the 5' end of the short arm of the targeting vector (Fig 1A, 1B). The expression level of the *spgp* gene was determined by Northern and Western blot analysis using standard methods (12). Antiserum IW is specific for Spgp while monoclonal antibody C219 detects both Pgp and Spgp (11). Adult mice from F3 to F5, 2 to 6 months of age were used in this study.

**Bile duct cannulation and collection of bile.** Animal surgery was performed using the approved protocols of the Committee on Animal Care, University of British Columbia, according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (112.5 mg/kg) and Xylazine (11.3 mg/kg) after a two hours of fasting. The abdomen was opened, and the gallbladder was cannulated after distal common bile duct ligation (16). Bile was collected in 15 minutes intervals for a total of 30 minutes, followed by injection of 3.5  $\mu$ moles/100g body weight of [ $^{14}$ C] taurocholate as a bolus into the jugular vein. Bile was then further collected through the cannula for another 30 minutes.

**Transmission electron microscopy.** Mice were anaesthetized and their liver perfused fixed in-situ using 2.5% glutaraldehyde and post-fixed in 1% OsO<sub>4</sub>. Dehydration and embedding were performed as described previously (17). Sections were stained with uranyl acetate and examined using a Philips EM400T transmission electron microscope (Eindhoven, The Netherlands).

**Bile acid determinations.** Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) were used for the identification and determination of bile acids in bile, plasma and liver tissues.

Briefly, bile acids were extracted with a C18 (octadecyl) reversed-phase column. For LC/MS/MS, bile acids were analyzed by simultaneous monitoring of parent and daughter ions for the identification of glycine and taurine conjugates (18). Identification and quantification of conjugated bile acids was achieved in 5 minutes. The detection limit was 1 ng and the determination was linear up to 100 ng. For GC/MS, conjugated bile acids were hydrolyzed in 2.5N NaOH at 160°C overnight. Bile acids were then extracted, methylated and acetylated. Identification and quantification of bile acids were achieved by GC/MS using a Hewlett-Packard 5896 gas chromatograph equipped with a Hewlett-Packard 5971A mass selective detector (MSD) in selected ion-monitoring mode (SIM). Quantification was carried out using a correction factor obtained by using 5 $\beta$ -cholanic acid as internal standard.

**Biliary Phospholipid and Cholesterol Determinations.** Biliary lipids were extracted as described by Folch et al (19). Phospholipids were determined enzymatically with phospholipase D and choline oxidase using a kit supplied by Wako chemicals (Richmond, USA). Cholesterol was determined by GC/MS as described above.

## Results

**Inactivation of the *spgp* gene in mice.** A vector for inactivation of the *spgp* gene was constructed by deleting a 1.4 kb fragment containing the coding region of Walker A of the N-terminal ATP-binding domain of Spgp (Fig. 1A, amino acid 454-478). After electroporation with the targeting vector and G418 selection, eleven ES colonies were isolated by Southern blot screening. Four out of the eleven targeted ES cell lines were subsequently introduced into pseudo-pregnant foster mother to produce chimeric mice.

Germline transmission of the targeted mutation on *spgp* gene was achieved in chimeric mice from the three of the four injected lines. The heterozygous mutant mice were crossed into C57Black/6J for each generation to eliminate genetic diversity, and the homozygotes were obtained by back-crossing of heterozygotes. Inactivation of the *spgp* gene resulting in *spgp*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 1A) was confirmed an absence of detectable *Spgp* mRNA and protein product (Fig. 1C, D).

**Analysis of *spgp*<sup>-/-</sup> mice.** The *spgp*<sup>-/-</sup> mice are viable and fertile but displayed growth retardation. The body weight of *spgp*<sup>-/-</sup> mice is about 20% lower than that of the wild-type littermates at weaning (21 days after birth). They tended to have a lower body weight throughout their life but no advanced cholestasis was observed up to one year of age. Indicators of liver function such as gamma-glutamyl transferase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, 5'-nucleotidase, plasma albumin and bilirubin showed no significant change in *spgp*<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type mice (data not shown). Ultrastructural changes of the canaliculi were observed, including dilation of canalicular lumens, partial or complete loss of microvilli, and retained biliary material in the form of lamellar whorls or more membranous appearing 'fingerprints' in canalicular lumens (Fig.2A). There were also hepatocyte cytoplasmic changes, including increase in peroxisomes, lysosomes, lipid droplets and decrease in glycogen content (Fig 2B). The liver of *spgp*<sup>-/-</sup> mice was enlarged to 10.14% of the body weight (vs 4.72% in wild-type, Table 1), and this may be attributed in part to the observed steatosis. Overall, however, the *spgp*<sup>-/-</sup> mice did not exhibit signs of overt cholestasis (1, 20-23).

**Secretion of bile acids.** Since cholestasis is defined as a reduction in bile flow, we measured bile flow in the *spgp*<sup>-/-</sup> mice in order to assess the degree of cholestasis. We observed that bile flow is reduced by 18% in *spgp*<sup>-/-</sup> mice compared to wild-type controls (Table 1). This relatively small reduction in bile flow in *spgp*<sup>-/-</sup> mice is surprising since bile salts secretion is a major driving force of bile flow and *Spgp* is considered the major canalicular bile salt transporter (10, 13, 14). We therefore examined the mutant mice for secretion of specific bile salts by infusing [<sup>14</sup>C] labelled taurocholate, a major form of bile salt, into the jugular vein. Thirty minutes after infusion, radioactivity was distributed in *spgp*<sup>-/-</sup> vs wild-type mice as follows: 4.60% vs 65.51% secreted into the bile, 69.74% vs 1.55% accumulated in the liver, and 3.51% vs 1.02% remained in the plasma (Fig. 3). Injected labelled glycocholic acid also yielded similar results (data not shown). These data indicate a dramatic impairment in biliary secretion of conjugated cholic acid in *spgp*<sup>-/-</sup> mice.

To investigate further whether impaired or altered bile acid metabolism exist in the mutant mice, we identified and quantitated the individual bile acids by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS). The total concentration of biliary bile salts in the *spgp*<sup>-/-</sup> mice was reduced by more than 4-fold. Correspondingly, the total bile salt concentrations in the liver and serum were elevated 4 and 5.8 fold, respectively (Table 1). Individually, the amount of cholic acid in *spgp*<sup>-/-</sup> mice was reduced by 17-fold confirming the radiolabeled data in Fig 3, but total muricholic acids were reduced to a much lesser extent (Table 1). Taken together, the above data indicate that *Spgp* is the main transporter of the major hydrophobic bile salts such as taurine and glycine-

conjugated cholic acid. However, secretion of the more hydrophilic muricholic acids appeared not to be greatly impaired in the *spgp*<sup>-/-</sup> mice, which remained at about 60% of wildtype (Table 1).

**Tetra-hydroxylated bile acids.** We detected an unusually large amount of tetra-hydroxylated bile acids (18% of total biliary bile acids) in the *spgp*<sup>-/-</sup> mice that were not present in wild-type controls. This was confirmed with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) which showed that the tetra-hydroxylated bile salt was present, mainly as a taurine conjugate with a fragment ion at *m/z* 530 (Fig. 4). Several investigators have reported the presence of tetra-hydroxylated bile salts in human cholestatic diseases (24-30). Furthermore, it was demonstrated that chenodeoxycholic, cholic and deoxycholic acids can be hydroxylated and transformed into tri- or tetra-hydroxylated bile acids in cholestasis patients (26). Increased hydroxylation in rodents has also been observed following administration of toxic mono-hydroxylated bile salts (30) and after bile duct ligation (31, 32). Thus the hydroxylation of bile salts in *spgp*<sup>-/-</sup> mice is consistent with a cholestatic phenotype. However, the amount of tetra-hydroxylated bile salts secreted into the bile was substantial and this may help to modulate the severity of cholestasis and may explain why bile flow rate was only slightly reduced in *spgp*<sup>-/-</sup> mice.

**Lipid composition of bile in *spgp*<sup>-/-</sup> mice.** The secretion of cholesterol and phospholipids into the bile is mediated by a system(s) different from that for bile salts (10, 16, 33). However it is well established that bile salts, especially hydrophobic ones, promote secretion of biliary phospholipids and cholesterol (1, 33, 34). The mechanisms by which the bile salts induce biliary secretion of phospholipids and cholesterol is not

understood (35). We analyzed biliary lipid in the *spgp*<sup>-/-</sup> mice to examine whether the biliary secretion of cholesterol and phospholipids was affected. The *spgp*<sup>-/-</sup> mice displayed a marked increase in biliary cholesterol (7 fold) and phospholipids (2.5 fold), possessed a more hydrophilic bile salts pool, expressed a 4 fold reduced biliary secretion of bile salts, and expressed a 6 fold hepatic accumulation of bile salts (Table1, Fig.4). Furthermore, the biliary cholesterol:phospholipid ratio was dramatically increased in the *spgp*<sup>-/-</sup> mice (0.23 vs 0.08 in the wildtype mice, Table 1). Thus the disruption of the *spgp* gene in mice appears to greatly affect the homeostasis of cholesterol and phospholipids.

### Discussion

*Spgp* is considered to be the major bile salt transporter in the canaliculus (10, 36) and genetic defect of *spgp* gene in humans results in very severe progressive cholestasis (13, 14). This study shows that canalicular secretion of bile salts, especially conjugated cholic acid in *spgp*<sup>-/-</sup> mice is severely impaired. The surprising finding in this study is that the *spgp*<sup>-/-</sup> mice display only mild non-progressive cholestasis. A less severe phenotype in *spgp*<sup>-/-</sup> mice compared to human PFIC2 is likely due to another canalicular bile salt transport system (as yet unidentified) allowing for the secretion of significant amounts of bile salts. The *spgp*<sup>-/-</sup> mice thus provide a unique model system to investigate the pathogenesis of intrahepatic cholestasis and other related liver diseases; moreover, it may be a useful system for exploring potential approaches for therapeutic intervention for these diseases.

In the *spgp*<sup>-/-</sup> mice, biliary secretion of conjugated cholic acid and some di-hydroxyl bile salts was greatly reduced, but the more hydrophilic bile salts, muricholates were less

affected and a significant amount of another hydrophilic bile acid, tetrahydroxylated bile acid, appeared (Table I and Fig.4). These observations imply that 1) *Spgp* mediates the secretion of conjugated cholic acids and other hydrophobic bile acids. This is in line with previous publications demonstrating *Spgp* being a transporter of taurocholates and other bile salts in transfected systems (10, 36); 2) there is an alternative bile salt transport system in the canaliculus for the more hydrophilic bile salts. Rodents have a more efficient hydroxylation/detoxification mechanism in the liver (32) and the bile acid pool in mice is more hydroxylated, less hydrophobic and less toxic (28, 37, 38). Thus in mice, elevated hydroxylation of bile salts may serve not only as a detoxification mechanism of hydrophobic bile salts, but may also allow for their clearance via the predicted alternative transport system. It is yet to be discovered if a similar system for the transport of hydrophilic bile salts exists in humans. In addition to *Spgp* other proteins have also been proposed as potential bile acids transporters in the canaliculus (13, 39, 40). Some of these may be responsible for this alternative transport of hydrophilic bile acids. The *spgp*<sup>-/-</sup> mice should be a useful system to investigate this possibility.

While biliary secretion of bile salts was greatly reduced in the *spgp*<sup>-/-</sup> mice, the secretion of phospholipids and cholesterol into the bile was significantly elevated (Table I). Secretion of phospholipids and cholesterol usually correlates positively with changes in the amount of bile salts secreted *in vivo* (33, 35) and it is commonly accepted that bile salts drive the amount of phospholipids and cholesterol secreted into the bile. Whether or not this is accomplished at the intracanalicular or at the intrahepatic level is not well defined (33-35). The *spgp*<sup>-/-</sup> mice allow us to differentiate between these two possibilities. In these mice the increased biliary lipid secretion is observed under conditions where bile

salts is reduced but intrahepatic bile salts is increased. We therefore conclude that the intrahepatic site is the location for the bile salts stimulation of biliary lipid secretion.

An increased accumulation of intrahepatic bile salts could also explain the greatly increased cholesterol:phospholipid ratio in the bile of *spgp*<sup>-/-</sup> mice (Table I). Bile acid synthesis from cholesterol accounts for about 50% of cholesterol eliminated from the body (41). Accumulation of hepatic bile acids resulting from an absence of Spgp would very likely inhibit bile acid biosynthesis (7, 8) and lead to accumulation of cholesterol in hepatocytes. This, in turn, leads to elevated biliary secretion of cholesterol. Hence, the observed higher cholesterol:phospholipid ratio in the bile of *spgp*<sup>-/-</sup> mice may reflect this enhanced clearance of accumulated cholesterol. It is noteworthy that the *Lith1* locus of cholesterol gallstone susceptibility in mice has been colocalized with the *spgp* locus (15). An higher cholesterol secretion in the *spgp*<sup>-/-</sup> mice would be consistent with the *spgp* gene being the *Lith1* site. The *spgp*<sup>-/-</sup> mice are therefore an excellent model to investigate lipid secretion and to understand lipid homeostasis.

#### Figure Legends,

**Fig 1. Generation of *spgp*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Structure of targeting vector. A 1.4 kb BamH I (B) and Kpn I (K) fragment, containing the coding region of Walker A of the N-terminal ATP-binding domain of Spgp (aa454-478), was deleted and replaced by a neomycin resistant cassette in an antisense orientation of the *spgp* gene. The construct also introduced three missense mutations and a premature stop codon in the *spgp* gene starting at aa 454. A restriction site of Hind III (H) was introduced next to the Kpn I site;

(B) Southern blot analysis of *spgp*<sup>-/-</sup> mice. Genomic DNA obtained from wild-type, heterozygous and homozygous mice, and digested with Hind III. The 7.2 kb and 3.6 kb bands correspond to wild-type and *spgp*<sup>-/-</sup> allele, respectively; (C) Northern blot analysis. mRNA extracted from the livers of wild-type, heterozygous and homozygous mice. 30 µg/lane of total RNA was loaded. The mouse β-actin probe was used as control; (D) Western blot analysis of membrane proteins using antibodies against Spgp and Pgp, 45 µg/well of total proteins was loaded. CMV, isolated canalicular membrane vesicles; Rat, isolated plasma membrane from the rat liver; B1, isolated plasma membrane from SKOV3 cells expressing rat *spgp* cDNA (11).

**Fig. 2. Ultrastructural changes in the hepatocytes of *spgp*<sup>-/-</sup> mice.** (A) Canalicular changes in the hepatocyte of *spgp*<sup>-/-</sup> mice at 6 weeks. Bile canaliculus (\*) in center of micrograph shows dilated lumen, partial loss of microvilli and retained biliary material in the form of lamellar and more membranous appearing 'fingerprints'. (B) Hepatocyte cytoplasmic changes of *spgp*<sup>-/-</sup> mice liver at 6 weeks. Hepatocyte cytoplasm of several cells shown. Note abundance of peroxisomes (p) and frequent small lipid droplets (L). Peroxisomes are thought to be the site of bile acids metabolism and modification (42). Mitochondria and other organelles are normal as is the hepatic sinusoid (s). (C) Hepatocytes of wild-type mice at 6 weeks. Hepatocyte ultrastructure is normal. Part of two cells shown with bile canaliculus (bc). Occasional lipid droplets and abundance of glycogen (gly) are seen. Part of a normal stellate (Ito) cell is also present. (g-Golgi).

**Fig. 3. Distribution of infused radiolabeled bile acids in the bile, liver and serum.** Mice were cannulated and bile was collected in 15 minutes intervals for 30 minutes after ligation. 3.5  $\mu$ moles/100g body weight of [ $^{14}$ C] taurocholate was infused. Accumulation of radioactivity in the bile, liver and serum was determined. Results are expressed as percent of total radiolabeled material infused and represent means  $\pm$  SD from three animals of each genotype. Similar results were obtained with labeled glycocholate.

**Fig. 4. Taurine conjugated bile acids from the bile and liver of *spgp*<sup>-/-</sup> and wild-type mice detected by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC/MS/MS).** The bile and the liver used are from the same mouse for each genotype. The molecular weights of the different species detected representing di, tri, and tetra-hydroxylated bile acids are indicated.

#### **Acknowledgements:**

We thank Annick Itie, Dr. Tak Mak and Dr. Keith Humphres for helpful advice regarding the generation of *spgp*<sup>-/-</sup> knockout mice; Diane Mignault for assistance in MS analysis; Dr. Wenchao Song for advice and support in ES cell culture and screening; Rewa Grewal and Robert Schamborzki for technical support. This work is supported by the National Cancer Institute of Canada to V.L and Medical Research Council of Canada to I.M.Y and B.T.

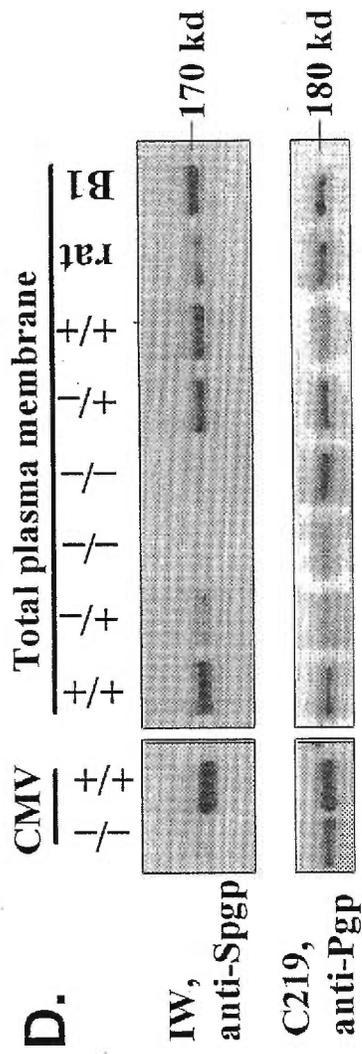
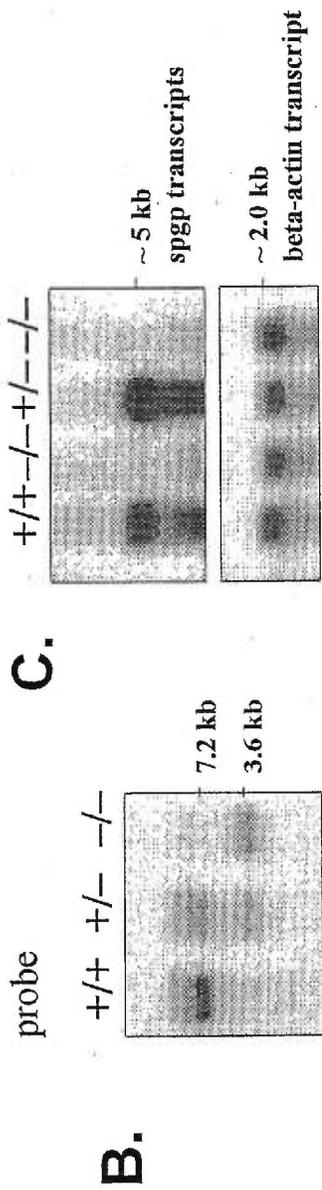
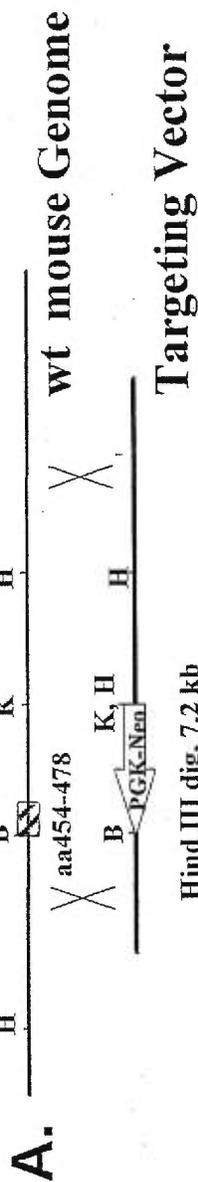
**References:**

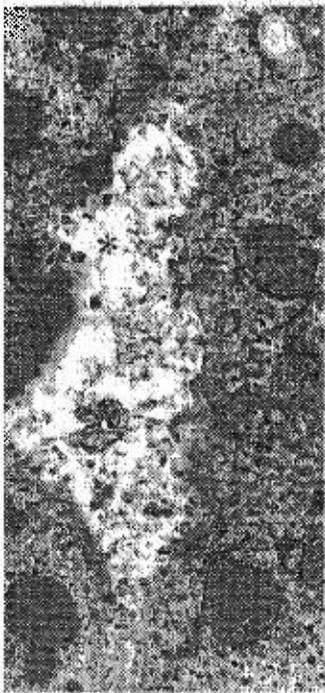
1. Hofmann, A. F. (1999) *Arch Intern Med* **159**, 2647-58.
2. Rust, C., Karnitz, L. M., Paya, C. V., Moscat, J., Simari, R. D. & Gores, G. J. (2000) *J Biol Chem* **275**, 20210-6.
3. Sodeman, T., Bronk, S. F., Roberts, P. J., Miyoshi, H. & Gores, G. J. (2000) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G992-9.
4. Jones, B. A., Rao, Y. P., Stravitz, R. T. & Gores, G. J. (1997) *Am J Physiol* **272**, G1109-15.
5. Kwo, P., Patel, T., Bronk, S. F. & Gores, G. J. (1995) *Am J Physiol* **268**, G613-21.
6. Rodrigues, C. M., Fan, G., Ma, X., Kren, B. T. & Steer, C. J. (1998) *J Clin Invest* **101**, 2790-9.
7. Chiang, J. Y., Kimmel, R., Weinberger, C. & Stroup, D. (2000) *J Biol Chem* **275**, 10918-24.
8. Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J. & Shan, B. (1999) *Science* **284**, 1362-5.
9. Childs, S. & Ling, V. (1994) *Important Adv Oncol*, 21-36.
10. Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A. F. & Meier, P. J. (1998) *J Biol Chem* **273**, 10046-50.
11. Childs, S., Yeh, R. L., Hui, D. & Ling, V. (1998) *Cancer Res* **58**, 4160-7.
12. Childs, S., Yeh, R. L., Georges, E. & Ling, V. (1995) *Cancer Res* **55**, 2029-34.
13. Strautnieks, S. S., Bull, L. N., Knisely, A. S., Kocoshis, S. A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M. S., Kagalwalla, A. F.,

- Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N. B., Gardiner, R. M. & Thompson, R. J. (1998) *Nat Genet* **20**, 233-8.
14. Jansen, P. L., Strautnieks, S. S., Jacquemin, E., Hadchouel, M., Sokal, E. M., Hooiveld, G. J., Koning, J. H., De Jager-Krikken, A., Kuipers, F., Stellaard, F., Bijleveld, C. M., Gouw, A., Van Goor, H., Thompson, R. J. & Muller, M. (1999) *Gastroenterology* **117**, 1370-9.
15. Bouchard, G., Nelson, H. M., Lammert, F., Rowe, L. B., Carey, M. C. & Paigen, B. (1999) *Mamm Genome* **10**, 1070-4.
16. Smit, J. J., Schinkel, A. H., Oude Elferink, R. P., Groen, A. K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N. M., van Roon, M. A. & et al. (1993) *Cell* **75**, 451-62.
17. Tsukada, N., Azuma, T. & Phillips, M. J. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6919-23.
18. Libert, R., Hermans, D., Draye, J. P., Van Hoof, F., Sokal, E. & de Hoffmann, E. (1991) *Clin Chem* **37**, 2102-10.
19. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. (1957) *Journal of biological chemistry* **226**, 497-509.
20. Steiner, J. W., Phillips, M. J. & Miyai, K. (1964) *Int Rev Exp Path* **3**, 65-167.
21. Philips, M. J., Poucell, S., Patterson, J. & Valencia, P. (1987) *The Liver: A Textbook and Atlas of Ultrastructural Pathology* (Raven Press, New York).
22. Trauner, M., Meier, P. J. & Boyer, J. L. (1998) *N Engl J Med* **339**, 1217-27.
23. Jansen, P. L. & Muller, M. M. (1998) *Gut* **42**, 766-7.

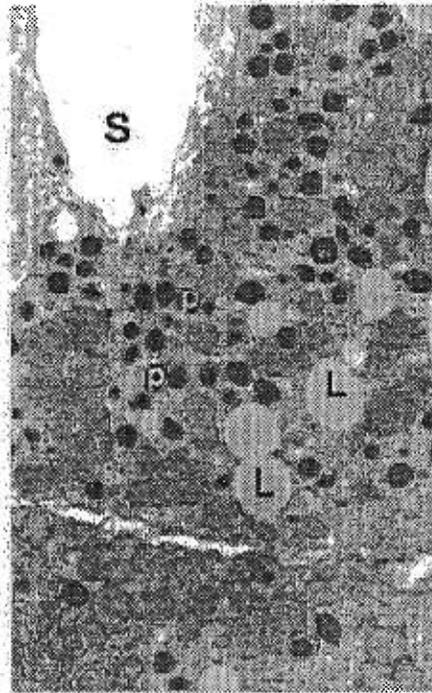
24. Bremmelgaard, A. & Sjovall, J. (1979) *Eur J Clin Invest* **9**, 341-8.
25. Thomassen, P. A. (1979) *Eur J Clin Invest* **9**, 425-32.
26. Bremmelgaard, A. & Sjovall, J. (1980) *J Lipid Res* **21**, 1072-81.
27. Radominska-Pyrek, A., Zimniak, P., Irshaid, Y. M., Lester, R., Tephly, T. R. & St. Pyrek, J. (1987) *J Clin Invest* **80**, 234-41.
28. Setchell, K. D., Dumaswala, R., Colombo, C. & Ronchi, M. (1988) *J Biol Chem* **263**, 16637-44.
29. Nakagawa, M. & Setchell, K. D. (1990) *J Lipid Res* **31**, 1089-98.
30. Yousef, I. M., Bouchard, G., Tuchweber, B. & Plaa, G. L. (1997) *Drug Metab Rev* **29**, 167-81.
31. Greim, H., Trulzsch, D., Roboz, J., Dressler, K., Czygan, P., Hutterer, F., Schaffner, F. & Popper, H. (1972) *Gastroenterology* **63**, 837-45.
32. Coleman, R. (1987) *Biochem J* **244**, 249-61.
33. Coleman, R. (1987) *Biochem Soc Trans* **15**, 68S-80S.
34. Coleman, R. & Rahman, K. (1992) *Biochim Biophys Acta* **1125**, 113-33.
35. Verkade, H. J., Vonk, R. J. & Kuipers, F. (1995) *Hepatology* **21**, 1174-89.
36. Green, R. M., Hoda, F. & Ward, K. L. (2000) *Gene* **241**, 117-23.
37. Oude Elferink, R. P., Ottenhoff, R., van Wijland, M., Frijters, C. M., van Nieuwkerk, C. & Groen, A. K. (1996) *J Lipid Res* **37**, 1065-75.
38. Rossi, S. S., Converse, J. L. & Hofmann, A. F. (1987) *J Lipid Res* **28**, 589-95.
39. Ortiz, D. F., St. Pierre, M. V., Abdulmessih, A. & Arias, I. M. (1997) *J Biol Chem* **272**, 15358-65.

40. Sippel, C. J., Dawson, P. A., Shen, T. & Perlmutter, D. H. (1997) *J Biol Chem* **272**, 18290-7.
41. Vlahcevic, Z. R., Pandak, W. M. & Stravitz, R. T. (1999) *Gastroenterol Clin North Am* **28**, 1-25, v.
42. Lazarow, P. B. (1994) in *The Liver: Biology and Pathobiology*, eds. Arias, I. M., Boyer, J. L., Fausto, N., Jakoby, W. B., Schacter, D. & Shafritz, D. A. (Raven Press, New York), pp. 293-307.

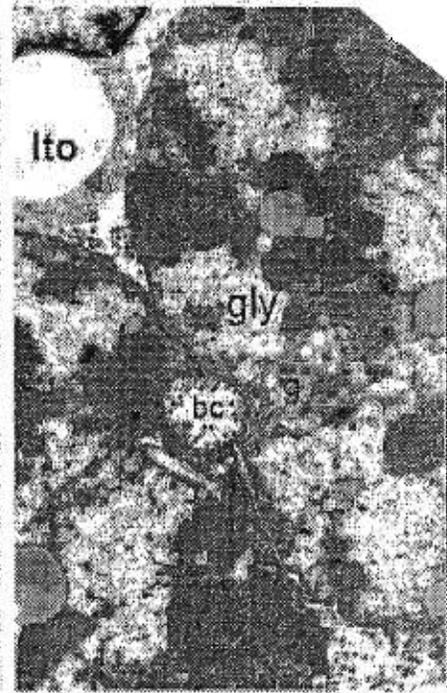




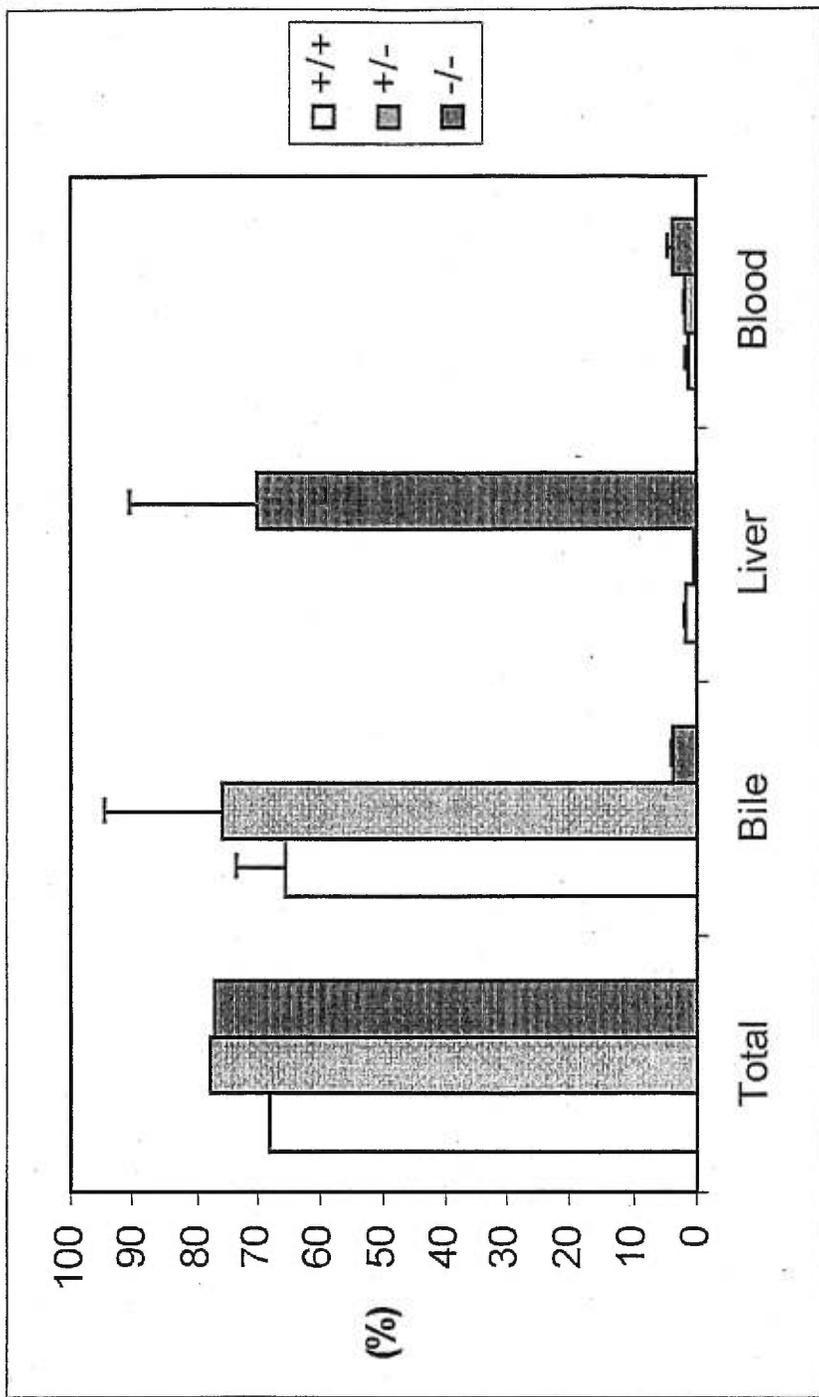
-, 22,400



B. -/-, 13,500



C. +/+, 13,500



# Bile

# Liver

XXXVI

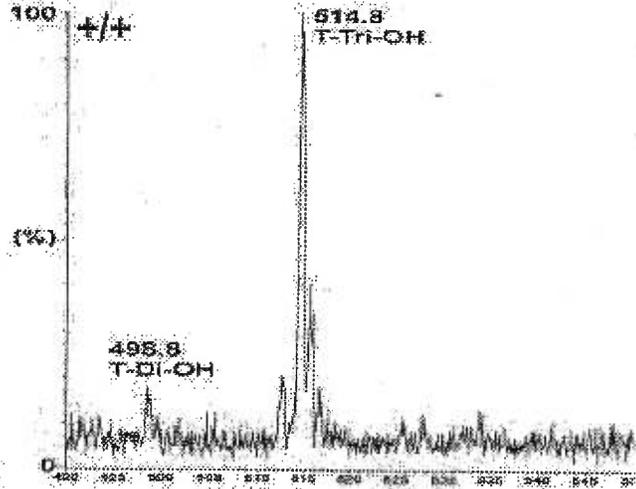
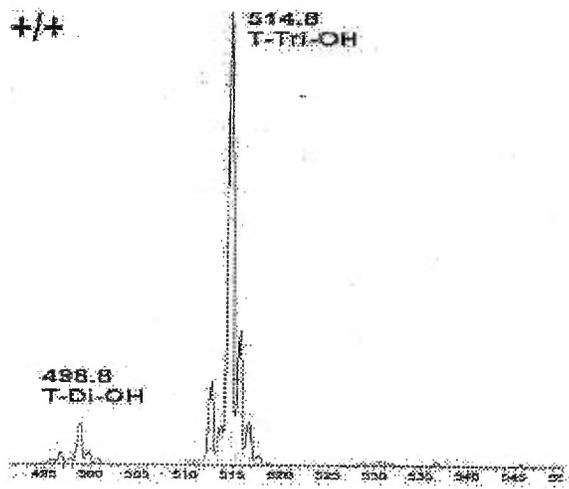
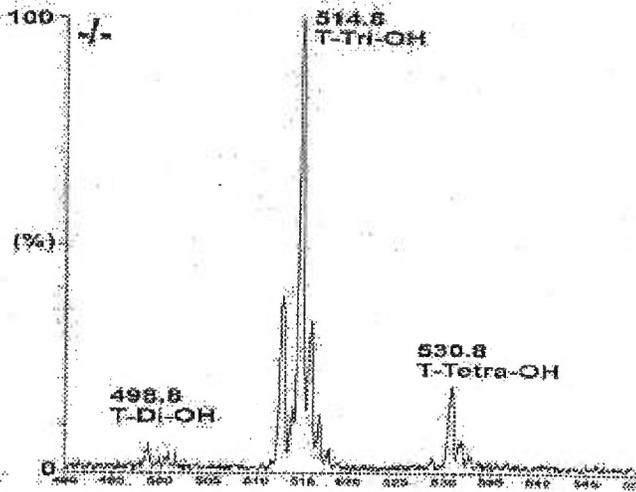
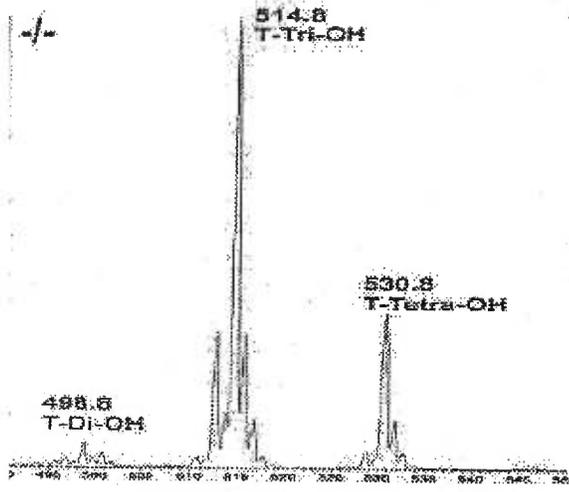


Table 1: Comparison of the *sppg*<sup>-/-</sup> and wild-type mice<sup>a</sup>

	wild-type	<i>sppg</i> <sup>-/-</sup>
Body Weight at weaning (g)	10.4 ± 0.74 (4)	8.16 ± 0.72 (6)
Liver Weight (g)/100g BW	4.72 ± 0.47 (4)	10.14 ± 0.5 (3)
Bile Flow Rate $\mu$ l/100g BW/min	8.33 ± 2.71 (6)	6.85 ± 2.58 (3)
Bile Salt Output (nmol/100g BW/min)	249.92 ± 80.90 (3)	84.62 ± 30.41 (5)
Bile acids concentration in bile, mM	32.33 ± 7.66 (3)	7.60 ± 4.58 (3)
Deoxycholate	1.16 ± 0.49	ND
Chenodeoxycholate	0.49 ± 0.12	0.11 ± 0.12
Cholate	21.56 ± 6.31	1.26 ± 1.05
Ursodeoxycholate	0.51 ± 0.54	0.06 ± 0.08
Muricholate (alfa)	0.96 ± 0.37	0.10 ± 0.04
Muricholate (omega)	2.50 ± 0.48	1.57 ± 1.27
Muricholate (beta)	5.15 ± 4.18	3.16 ± 2.62
Tetrahydroxy	ND	1.37 ± 0.84
Bile acids concentration in liver ( $\mu$ M)	40.07 ± 10.30 (3)	232.06 ± 105.07 (3)
Bile acids concentration in plasma ( $\mu$ M)	7.22 ± 1.93 (4)	29.43 ± 24.06 (5)
Biliary Phospholipids ( $\mu$ M)	6.17 ± 3.60 (5)	15.26 ± 7.06 (3)
(nmole/min/100g BW)	46.27 ± 26.98 (5)	128.16 ± 59.30 (3)
Biliary Cholesterol ( $\mu$ M)	0.49 ± 0.02 (5)	3.45 ± 1.71 (3)
(nmole/min/100g BW)	3.69 ± 1.98 (5)	28.97 ± 14.4 (3)
Bile acids/Phospholipids Ratio <sup>b</sup>	8.58 ± 3.72 (3)	1.48 ± 0.15 (3)
Bile acids/Cholesterol Ratio <sup>b</sup>	99.96 ± 36.02 (3)	6.62 ± 2.01 (3)

<sup>a</sup> Liver weights were obtained from mice at weaning. All other numbers are from male adult mice; ND, Not detectable; BW, Body Weight

<sup>b</sup> The bile acids/lipids ratio is the average of the ratio of bile salt output to lipids output for three animals.