

Université de Montréal

**Implication du cholestérol dans la pathogenèse de la cholestase
induite par la combinaison manganèse-bilirubine**

Par

Marie-Yvonne Akoume Ndong

Département de Pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Pharmacologie



Février 2004

© Marie-Yvonne Akoume Ndong, 2004

W

4

U58

2005

V.011

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Cette thèse intitulée :

**Implication du cholestérol dans la pathogenèse de la cholestase
induite par la combinaison manganèse-bilirubine**

Présentée par :

Marie-Yvonne Akoume Ndong

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Teresa Kus ■.....	⇒	Présidente du jury
Dr Ibrahim M. Yousef ■.....	⇒	Directeur de thèse
Dr Gabriel L. Plaa ■.....	⇒	Codirecteur de thèse
Dr Pierre-André Lavoie ■.....	⇒	Examineur interne
Dre Lena M. King ■.....	⇒	Examinatrice externe

Thèse acceptée le : 3 Décembre 2004 ► à Montréal

RÉSUMÉ

La cholestase est une réaction secondaire potentiellement dangereuse pendant l'utilisation des médicaments et généralement difficile prévoir à partir des études de toxicologie animale. La reproduction de cette lésion chez les animaux de laboratoire aide à appréhender la complexité des processus mécanistiques mis en jeu dans ce phénomène et peut fournir des pistes en vue de l'élaboration des stratégies préventives ou thérapeutiques.

Suite aux données récentes indiquant que le cholestérol serait un facteur déterminant dans le développement de la cholestase, nous avons entrepris d'examiner l'implication de ce composé dans la pathogenèse de la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine. Nos résultats montrent que cette combinaison augmente les concentrations de cholestérol dans les membranes canaliculaires. Pour mieux cerner la base métabolique associée à ce phénomène, nous avons d'abord mis au point une méthode analytique simple et rapide permettant d'évaluer simultanément les activités de HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase, deux enzymes indispensables dans les voies de synthèse et de dégradation du cholestérol. Ensuite, nous avons examiné ces enzymes dans les conditions cholestatiques (manganèse et bilirubine injectés séquentiellement) et non-cholestatiques (manganèse ou bilirubine injecté seul). Nous avons trouvé que l'injection séquentielle de manganèse plus bilirubine inhibe les activités de HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase. Cependant, le traitement avec le

manganèse seul augmente les activités des deux enzymes, tandis que la bilirubine seule inhibe l'activité cholestérol 7 α -hydroxylase mais n'a aucun effet sur HMG-CoA réductase. Ces résultats suggèrent que le manganèse active la production du cholestérol mais prévient son accumulation intrahépatique en augmentant simultanément sa dégradation. Par contre, la bilirubine inhibe la dégradation du cholestérol et augmente ses concentrations intrahépatiques, mais pas suffisamment pour induire la cholestase. Il apparaît donc qu'une injection de la bilirubine précédée par celle du manganèse peut considérablement augmenter la disponibilité hépatique du cholestérol pour sa redistribution souscellulaire, et expliquer l'accumulation importante du cholestérol notée dans les membranes canaliculaires suite au traitement séquentiel. L'inhibition de HMG-CoA réductase associée à ce traitement est possiblement une réponse homéostatique déclenchée par l'excès de cholestérol. Ceci constitue l'évidence que l'augmentation de la disponibilité hépatique du cholestérol associée à la pathogenèse de la cholestase manganèse-bilirubine est causée, du moins en partie par la synergie des effets du manganèse et de la bilirubine agissant séparément sur la synthèse et la dégradation du cholestérol.

Par ailleurs, nous avons observé une réduction dramatique des concentrations biliaires du cholestérol et des phospholipides, alors que celles des acides biliaires étaient modestement réduites. Nous avons alors suggéré que l'altération de mdr2, la P-glycoprotéine qui pourvoit l'excrétion du cholestérol et des phospholipides, peut jouer un rôle important dans l'apparition de la cholestase manganèse-bilirubine. L'utilisation des souris

déficientes du gène codant pour la P-glycoprotéine *mdr2* facilitait la vérification de cette hypothèse. Pour recourir à ces souris, il a fallu d'abord vérifier si la combinaison manganèse-bilirubine peut induire la cholestase chez des souris normales. L'expérience menée à cet effet a révélé que la combinaison manganèse-bilirubine diminue le flux biliaire chez les souris normales et cause des changements physiologiques similaires à ceux observés chez les rats. Ce qui indique que la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine chez le rat est reproductible chez la souris, suggérant que cette espèce peut être utilisée pour clarifier la pathogenèse de la cholestase manganèse-bilirubine.

L'utilisation subséquente des souris déficientes du gène *mdr2* a révélé que l'apparition de la cholestase ainsi que l'intensité et la durée de la phase cholestatique aiguë étaient identiques chez les souris normales et les souris transgéniques. Ce qui indique que l'altération de *mdr2* n'est pas l'évènement principal menant à la cholestase suivant le traitement combiné manganèse-bilirubine. Cependant, il était intéressant de constater que l'injection de la bilirubine a diminué le flux biliaire, puis augmenté les niveaux de cholestérol et le ratio cholestérol/phospholipides dans les membranes canaliculaires chez les souris *mdr2* (-/-), mais pas chez les souris *mdr2* (+/+), alors que l'injection du manganèse seul n'a affecté ces paramètres ni chez les souris *mdr2* (-/-) ni chez les souris *mdr2* (+/+). Ces observations jumelées avec les effets du manganèse et de la bilirubine sur les voies de synthèse et de dégradation du cholestérol, laissent présager que l'altération de cholestérol 7 α -hydroxylase par la bilirubine soit l'étape limitante dans l'apparition de la cholestase induite

par le traitement combiné manganèse-bilirubine. De plus, cholate, le principal acide biliaire issu de la dégradation du cholestérol nouvellement synthétisé par cette enzyme, était dramatiquement réduit suite à ce traitement, tandis que chénodéoxycholate, le principal acide biliaire produit via la voie de synthèse des acides biliaires qui utilise le cholestérol préformé, demeurait inchangé. Ce qui nous a permis de déduire que c'est le cholestérol nouvellement synthétisé qui n'est pas dégradé et qui s'accumule dans les membranes canaliculaires, et non le cholestérol préformé.

Les études supplémentaires amorcées pour mieux élucider l'aspect mécanistique du processus pathogénique de la cholestase manganèse-bilirubine, ont révélé que le traitement combiné manganèse-bilirubine baisse l'expression des P-glycoprotéines et la teneur de la phosphatidylcholine dans les membranes canaliculaires, mais augmente la sphingomyéline et la lysophosphatidylcholine sans affecter le niveau total des phospholipides. Un tel profile de phospholipides peut favoriser l'incorporation et la rétention du cholestérol dans ces membranes. Cependant, contrairement à ce traitement cholestatique manganèse-bilirubine, le traitement préventif manganèse-bromosulfophtaléine-bilirubine a augmenté l'expression des P-glycoprotéines et les niveaux de phospholipides dans les membranes canaliculaires, et a normalisé le ratio cholestérol/phospholipides dans ces membranes. Ces résultats préliminaires suggèrent que la P-glycoprotéine mdr2 qui transfère la phosphatidylcholine à travers les membranes canaliculaires, peut avoir un rôle important dans le mécanisme de prévention de la cholestase manganèse-bilirubine par la bromosulfophtaléine (BSP).

En conclusion, l'ensemble des données rapportées dans le présent travail supporte que l'accumulation du cholestérol dans les membranes canaliculaires soit une composante mécanistique importante dans la pathogenèse de la cholestase manganèse-bilirubine. Le cholestérol associé à ce phénomène est essentiellement le cholestérol nouvellement synthétisé et l'augmentation de la disponibilité hépatique de ce cholestérol serait une conséquence de la synergie des effets du manganèse et la bilirubine agissant séparément sur les voies de synthèse et de dégradation du cholestérol. Bien que la protéine mdr2 pourrait être altérée dans ce modèle cholestatique, il apparaît que cette altération ne soit pas un événement déterminant dans l'apparition de la cholestase. Par contre, notre étude a révélé que la protéine mdr2 pourrait être une cible intéressante dans les manœuvres thérapeutiques pour prévenir ou traiter les formes de cholestase associées à l'accumulation du cholestérol dans les membranes canaliculaires.

MOTS CLÉS : membranes canaliculaires, rat, souris, mdr2, électrospray, spectrométrie, HMG-CoA réductase, cholestérol 7 α -hydroxylase, phospholipides, bromosulfophtaléine, modèle cholestatique Mn-BR.

ABSTRACT

Cholestasis is a potentially serious adverse reaction during drug treatment and generally difficult to predict from animal toxicology studies. The reproduction of this injury in laboratory animals helps to uncover the complexity of the mechanistic processes taking part in this phenomenon and may lead to possible preventive or therapeutic strategies.

Because recent data indicate that cholesterol would be a determinant factor in the development of cholestasis, we wished to examine the involvement of this compound in the pathogenesis of cholestasis induced by the manganese-bilirubin combined treatment. Our results show that this treatment increases the cholesterol content in canalicular membranes. To clarify the metabolic basis associated with this phenomenon, we first developed a simple and rapid method for the simultaneous evaluation of the activities of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase, two key enzymes in the synthesis and degradation pathways of cholesterol. Then, we examined these enzymes under cholestatic (Mn and BR given sequentially) and noncholestatic (Mn or BR given alone) conditions. We found that the Mn-BR combination inhibits the activities of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase. However, the injection of manganese alone significantly increases the activities of both enzymes, while bilirubin alone inhibits cholesterol 7 α -hydroxylase activity, without affecting HMG-CoA reductase activity. These results indicate that manganese enhances cholesterol

production, but prevents its intrahepatic accumulation by increasing simultaneously its degradation. In contrast to Mn, BR inhibits cholesterol degradation and increases its intrahepatic concentrations, but not sufficiently to provoke cholestasis. Therefore, it appears that an injection of bilirubin preceded by that of manganese, may considerably increase the hepatic availability of cholesterol for its subcellular distribution, and explain the important accumulation of cholesterol found in canalicular membranes following the sequential injection of these compounds. The inhibition of HMG-CoA reductase activity associated with this treatment is probably a homeostatic response caused by cholesterol excess. This provides evidence that the increase in hepatic availability of cholesterol associated with the pathogenesis of Mn-BR-induced cholestasis is caused, at least in part by the synergistic effects of Mn and BR acting separately on cholesterol synthesis and degradation.

On the other hand, we observed a dramatic reduction in biliary cholesterol and phospholipid concentrations, while biliary bile acid concentrations were modestly decreased. We therefore hypothesized that the alteration of *mdr2*, the P-glycoprotein which mediates excretion of cholesterol and phospholipids, may have a critical role in the onset of Mn-BR cholestasis. The use of mice where the *mdr2* gene was disrupted facilitated the verification of this hypothesis. However, before using these mice, it was firstly necessary to examine whether the Mn-BR combination produces cholestasis in normal mice. Our results clearly demonstrated that the Mn-BR combination decreases bile flow in normal mice and causes the physiologic changes similar to those

observed in rats. This indicates that Mn-BR cholestasis induced in rats is reproducible in mice, suggesting that this species may be used for the further understanding of the pathogenic processes of Mn-BR cholestasis.

The subsequent use of mice with disrupted *mdr2* gene revealed that the onset of cholestasis as well as the intensity and duration of the acute cholestasis phase were indistinguishable in wild type and transgenic mice, indicating that *mdr2* alteration is not a primary event leading to cholestasis following the Mn-BR combined treatment. However, it was interesting to note that the injection of BR alone decreased bile flow, then increased cholesterol levels and cholesterol/phospholipid ratio in canalicular membranes in *mdr2* (-/-) mice, but not in *mdr2* (+/+) mice, whereas the injection of Mn alone didn't affect these parameters either in *mdr2* (-/-) or in *mdr2* (+/+). These observations together with the effects of manganese and bilirubin on the synthesis and degradation pathways of cholesterol reveal the impairment of cholesterol 7 α -hydroxylase by BR as a possible rate limiting step for the onset of Mn-BR cholestasis. In addition, cholate, the main bile acid produced through the degradation of newly synthesized cholesterol by this enzyme, was dramatically reduced by the Mn-BR combination, whereas chenodeoxycholate, the main bile acid produced through the bile acid synthesis pathway that uses preformed cholesterol, remained unchanged. This indicates that the newly synthesized cholesterol rather than the preformed cholesterol was not degraded, and was therefore the major source of the accumulating cholesterol in canalicular membranes.

Complementary studies undertaken to clarify the mechanistic aspect of the pathogenic process of Mn-BR cholestasis, revealed that the Mn-BR combined treatment decreases P-glycoprotein expression and phosphatidylcholine content in canalicular membranes, but increases sphingomyeline and lysophosphatidylcholine, without affecting the total level of phospholipids. Such phospholipid profile may favour incorporation and retention of cholesterol in these membranes. However, in contrast to this Mn-BR cholestatic treatment, the preventive treatment of manganese-bromosulfophtalein-bilirubin increased P-glycoprotein expression and phospholipid levels in canalicular membranes, and normalized the cholesterol/phospholipid ratio in these membranes. These preliminary results suggest that P-glycoprotein mdr2, which transfers phosphatidylcholine through canalicular membranes, may play a crucial role in the prevention mechanism of Mn-BR cholestasis by bromosulfophtalein (BSP).

In conclusion, data presented in the present study support the accumulation of cholesterol in canalicular membranes as a determinant event in the pathogenesis of cholestasis induced by Mn-BR combination. Cholesterol associated with this phenomenon is essentially the newly synthesized cholesterol and the increase in hepatic availability of this cholesterol is a consequence of the synergic effects of Mn and BR acting separately on synthesis and degradation pathways of cholesterol. Although mdr2 might be altered in this cholestatic model, it appears that this alteration is not a determinant event in the onset of cholestasis. In contrast, our study revealed that this protein might be an interesting target in therapeutic

manoeuvres to prevent or treat the cholestasis forms associated with accumulation of cholesterol in canalicular membranes.

KEY WORDS: canalicular membranes, rat, mice, mdr2, electrospray, spectrometry, HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase, phospholipids, bromosulfophtalein, Mn-BR cholestatic model.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	viii
TABLE DES MATIÈRES	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xviii
LISTE DES FIGURES	xx
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xxiii
DÉDICACES	xxv
REMERCIEMENTS	xxvi
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
A. BASES RATIONNELLES DU PROJET	2
B. CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. Structure et fonction du foie	27
2. Formation de la bile	27
2.1. Génération du flux biliaire.....	27
2.2. Disponibilité canaliculaire des acides biliaires.....	29
2.3. Mécanisme d'excrétion des lipides biliaires.....	36
2.4. Excrétion des autres composés biliaires.....	42
3. Cholestase	43
3.1. Définition et classification.....	43

3.2. Modèles expérimentaux et pathomécanismes généraux.....	44
3.3. Cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine	46
C. OBJECTIF GÉNÉRAL.....	55
1. Problématique.....	55
2. Hypothèse.....	56
3. Plan du travail.....	57
RÉSULTATS.....	59
1. ARTICLE 1.....	60
<i>Simultaneous evaluation of HMG-CoA reductase and cholesterol 7α-hydroxylase activities by electrospray tandem mass spectrometry.</i>	
1.1. ABSTRACT.....	61
1.2. INTRODUCTION.....	62
1.3. MATERIALS AND METHODS.....	64
1.4. RESULTS.....	69
1.5. DISCUSSION.....	71
1.6. ACKNOWLEDGEMENTS.....	73
1.7. REFERENCES.....	74
2. ARTICLE 2.....	85
<i>Synergistic role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol 7α-hydroxylase in the pathogenesis of manganese-bilirubin induced cholestasis in rats.</i>	
2.1. ABSTRACT.....	86

2.2. INTRODUCTION.....	88
2.3. MATERIALS AND METHODS.....	90
2.4. RESULTS	95
2.5. DISCUSSION.....	99
2.6. ACKNOWLEDGEMENTS.....	104
2.7. REFERENCES.....	105
3. ARTICLE 3.....	118
<i>The role of mdr2 in manganese-bilirubin induced cholestasis in mice.</i>	
3.1. ABSTRACT.....	119
3.2. INTRODUCTION.....	120
3.3. MATERIALS AND METHODS.....	122
3.4. RESULTS.....	125
3.5. DISCUSSION.....	129
3.6. ACKNOWLEDGEMENTS.....	133
3.7. RÉFÉRENCES.....	134
3. ARTICLE 4.....	144
<i>Relation entre le cholestérol, les phospholipids et mdr2 dans la pathogénèse et la prévention de la cholestase manganèse-bilirubine</i>	
3.1. RÉSUMÉ.....	145
3.2. INTRODUCTION.....	147
3.3. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	149
3.4. RÉSULTATS.....	152
3.5. DISCUSSION.....	154

3.7. REFERENCES.....	160
----------------------	-----

DISCUSSION GÉNÉRALE.....169

A. CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES.....171

a. Méthodes analytiques.....171

b. Modèles animaux.....175

B. CONSIDÉRATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES.....177

a. La place du cholestérol dans le processus pathogénique
de la cholestase manganèse-bilirubine.....178

b. Changements dans le métabolisme du cholestérol en relation
avec la cholestase manganèse-bilirubine.....184

c. Impacte de l'altération de la protéine mdr2 dans la
pathogenèse de la cholestase manganèse-bilirubine.....191

d. Rôle de mdr2 dans la prévention de la cholestase manganèse-
bilirubine par BSP.....196

C. Mode d'action suggéré pour la combinaison manganèse- bilirubine.....200

CONCLUSION GÉNÉRALE.....205

- **Contribution de nos résultats dans le progrès des connaissances
sur la cholestase manganèse-bilirubine.....206**

ANNEXE.....209

• **Contribution des auteurs dans les travaux publiés**.....210

BIBLIOGRAPHIE.....218

LISTE DES TABLEAUX

ARTICLE 1

Table 1: Parameters for calibration curves generated by electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS) and GC-MS.....	78
Table 2: Reproducibilities of HMG-CoA reductase and 7 α -hydroxylase activities in the rat liver microsomes.....	79
Table 3: Recovery of mevalonolactone and 7 α -hydroxycholesterol from microsomes analyzed by ES-MS-MS and GC-MS.....	80

ARTICLE 2

Table 1: Bile flow and biliary secretion of lipids.....	111
Table 2: Bile acid pattern in bile.....	112
Table 3: Subcellular distribution of hepatic protein and lipids.....	113
Table 4: Marker enzyme activities and relative enrichment in homogenate, bile canalicular membrane (BCM) and sinusoidal membrane (SM) of control and Mn-BR treated rats.....	114

ARTICLE 3

Table 1: Effect of Mn-BR treatment on biliary bile acid composition.....	138
Table 2: Changes in plasma lipid composition at the maximal decreased bile flow following the Mn-BR combined treatment.....	139

ARTICLE 4

Tableau 1: Effet de la BSP et de sa combinaison avec le manganèse et la bilirubine sur le débit biliaire et l'excrétion des lipides, chez les souris <i>mdr2</i> (-/-) et <i>mdr2</i> (+/+)	164
Tableau 2: Effet de la BSP et de sa combinaison avec le manganèse et la bilirubine sur la composition lipidique des membranes canaliculaires, chez des souris <i>mdr2</i> (-/-) et <i>mdr2</i> (+/+)	165

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1: Vue antérieure du foie.....	5
Figure 2: Représentation schématique du parenchyme et du lobule hépatique.....	6
Figure 3: Ultrastructure du parenchyme hépatique.....	9
Figure 4: Représentation schématique de la distribution polarisée des transporteurs membranaires.....	9
Figure 5: Connexion des canaux biliaires extrahépatiques chez l'humain.....	11
Figure 6: Voies de synthèse et dégradation du cholestérol.....	16
Figure 7: Illustration de la cascade de phosphorylation et déphosphorylation de HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase.....	23
Figure 8: Représentation des systèmes kinases impliqués dans la régulation à court terme de HMG-CoA réductase.....	26
Figure 9: Excrétion des lipides.....	41

ARTICLE 1

Figure 1: Positive ion electrospray mass spectra of mevalonolactone, acetylated-mevalonolactone, 7 α -hydroxycholesterol and 6 β -hydroxycholestanol.....	81
Figure 2: Representative GC-MS chromatograms of the mixture of (A) mevalonolactone and its internal standard, acetylated-	

mevalonolactone, and (B) 7 α -hydroxycholesterol and 6 β -hydroxycholestanol, used as internal standard.....	82
Figure 3: Electron impact mass spectra of the DMES ether derivatives of (A) mevalonolactone, (B) acetylated-mevalonolactone, (C) 7 α -hydroxycholesterol and (D) 6 β -hydroxycholesterol.....	83
Figure 4: Calibration curves for (A) mevalonolactone and (B) 7 α -hydroxycholesterol.....	84

ARTICLE 2

Figure 1: Electrospray mass spectra of phosphatidylcholine (PC) obtained from microsomal and biliary lipid extracts.....	115
Figure 2: Changes in microsomal HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities after Mn-BR treatment.....	116
Figure 3: Relative activities of (A) HMG-CoA reductase and (B) 7 α -hydroxylase.....	117

ARTICLE 3

Figure 1: Bile flow (A) and excretion rates of bile acids (B), cholesterol (C) and phospholipids (D) after various treatments.....	140
Figure 2: Bile flow (A) and secretion rates of cholesterol (B), phospholipids (C) and bile acids (D) in <i>mdr2</i> (-/-) and <i>mdr2</i> (+/+) after treatment with manganese (Mn)	

and bilirubin (BR) alone or in combination.....	141
Figure 3: Content of cholesterol (A) and phospholipids (B) in canalicular membrane from <i>mdr2</i> (-/-) and <i>mdr2</i> (+/+) after treatment with manganese (Mn) and bilirubin (BR) alone or in combination.....	142
Figure 4: Effects of various treatments on the cholesterol/phospholipid ratio in canalicular membranes in <i>mdr2</i> (-/-) and <i>mdr2</i> (+/.....	143

DISCUSSION

Figure 1: Représentation schématique du mode d'action proposé pour la combinaison manganèse-bilirubine.....	204
---	-----

ARTICLE 4

Figure 1A: Effet de la combinaison manganèse-bilirubine sur le profile des phospholipides dans les membranes canaliculaires.....	166
Figure 1B: Effet de la combinaison manganèse-bilirubine sur le profile des phospholipides dans les membranes sinusoïdales.....	167
Figure 2: Effet des différents traitements sur l'expression des P- glycoprotéines dans les membranes canaliculaires.....	168

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4MPOL	→	4-méthyl-2-pentanol
4OHMiBK	→	4-hydroxyméthyl isobutyl cétone
5'-Nase	→	5'-nucléotidase
6 β -OHC	→	6 β hydroxycholestérol
7 α -OHase	→	7 α -hydroxylase
7 α -OHC	→	7 α -hydroxycholestérol
ABC	→	ATP-binding cassette
BCM	→	membranes du canalicule biliaire
bsep	→	bile salt export pump
BSP	→	bromosulfophtaléine
BR	→	bilirubine
CN	→	cyanopropyl
CV	→	coefficient de variation
DBSP	→	dibromosulfonaphthaléine
DMESI	→	dimethylethylsilyl imidazole
ES-MS-MS	→	electrospray-spectrométrie de masse en tandem
G-6-Pase	→	glucose-6-phosphatase
GC-MS	→	chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse
HMG-CoA	→	3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A
LAP	→	leucine aminopeptidase
Lyso-PC	→	lyso-phosphatidylcholine
mdr2	→	multidrug resistance-2

Lyso-PC	→	lyso-phosphatidylcholine
mdr2	→	multidrug resistance-2
MiBK	→	methyl isobutyl cétone
Mn	→	manganèse
Mn-BR	→	manganèse-bilirubine
MRP	→	multidrug resistance associated protein
MVL	→	mévalonolactone
NTCP	→	Na ⁺ -taurocholate co-transporting polypeptide
OATP	→	organic anion transporting polypeptide
PC	→	phosphatidylcholine
SgM	→	sphingomyéline
SM	→	membranes sinusoïdales
spgp	→	sister-P-glycoprotein
VIC	→	vert d'indocyanine

DÉDICACE

A mes filles, Carelle et Tiye, sachez qu'il y'a des choses qui ne paraissent impossibles que tant qu'on ne les a pas tentées. Une fois amorcée, il suffit de rester en harmonie avec ses objectifs pour affronter aisément tout obstacle démoralisant qui pourrait inciter à lâcher prise.

A mon mari, Brice, ta présence m'a permis de supporter la pression intense que j'ai subie tout au long de ce parcours. Bien que préoccupé par ta thèse, tu as su trouver du temps pour me rassurer dans les moments de doute, de peur et d'incertitude. Ton attention, tes conseils et tes paroles ont été une source de motivation unique.

Q'il me soit permis de dédier cette thèse à la mémoire de mes grands parents, Ndong Bekale Gabriel et Nzang Mba Léontine. Ils auraient été très heureux de me voir réussir et de partager ma joie.

A ma mère

A mes frères et sœurs

Malgré vents et marées, j'y suis parvenue.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, l'instant est venu de faire la rétrospective, pour remercier ceux et celles qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Mes premières pensées vont bien entendues au Docteur Ibrahim M. Yousef, qui m'a accueilli dans son laboratoire. Qu'il soit rassuré de ma plus profonde gratitude pour tout ce qu'il m'a apporté durant ces nombreuses années fertiles en événements de toute nature.

La deuxième personne à qui je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ce, à plusieurs titres, c'est l'incontournable mais néanmoins sympathique Docteur Gabriel L. Plaa. Sans son aide plus qu'appréciable à tout point de vue, ce projet n'aurait sans doute jamais abouti. Il a su éclairer mes pensées les plus obscures et faire constamment progresser mon travail par son regard critique et ses encouragements honorifiques. Je me considère chanceuse et surtout privilégiée d'avoir bénéficié de ses connaissances et de sa rigueur au cours de mes études doctorales. C'est avec beaucoup d'émotion que j'adresse mes sincères remerciements à l'endroit de cet illustre chercheur et professeur émérite au département de pharmacologie, pour la confiance qu'il a daignée m'accorder durant ce parcours ardu.

Je rends grâce à la générosité du Docteur Beatriz Tuchweber. Qu'elle trouve ici l'expression de mon éminente reconnaissance pour m'avoir fourni

des souris transgéniques et m'avoir permis d'effectuer certaines expériences dans son laboratoire.

Je remercie vivement Diane Mignault, Grâce Gavino et Shahid Perwaiz pour leur assistance technique.

Je tire ma révérence à tout le personnel de l'animalerie, et en particulier à Daniel pour les services rendus.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

A- BASE RATIONNELLE DU PROJET

Toute affection hépatique est préoccupante car un mauvais fonctionnement du foie peut se répercuter sur l'ensemble des systèmes et entraîner des maladies graves. Dans les pays occidentaux, les affections susceptibles de nuire au bon fonctionnement du foie résultent essentiellement de l'utilisation des médicaments (Whitehead et coll., 1999; Zimmerman, 1999). Les manifestations associées à ces affections couvrent un large spectre (Barbare et coll., 2001; Kaplowitz, 2001). Cependant, la cholestase constitue la manifestation la plus courante. Elle peut évoluer vers une hépatopathie chronique pouvant nécessiter une transplantation hépatique ou occasionner la mort de l'individu. Cette évolution peut être interrompue avec l'exclusion du médicament en cause. Mais le caractère indispensable de bon nombre de médicaments rend certaines situations difficiles à gérer et motive sans cesse la recherche d'autres alternatives pour lutter contre l'évolution de cette réaction toxique. Les études menées dans cette perspective depuis plusieurs années, ont abouti au développement d'un grand nombre de modèles animaux de cholestase. En dépit de leurs limites, ces modèles aident à appréhender l'importance et la complexité de la pathogenèse de la cholestase. L'identification récente du cholestérol comme facteur contributif absolu dans ce phénomène, offre d'autres alternatives pour élucider les aspects mécanistiques de la cholestase. Notre intérêt à mieux comprendre les événements associés à ce phénomène lorsqu'il résulte de l'interaction entre deux produits pourrait contribuer à l'élaboration d'un traitement rapide ou d'une prévention thérapeutique de la cholestase chez des patients soumis à la polymédication.

B- CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

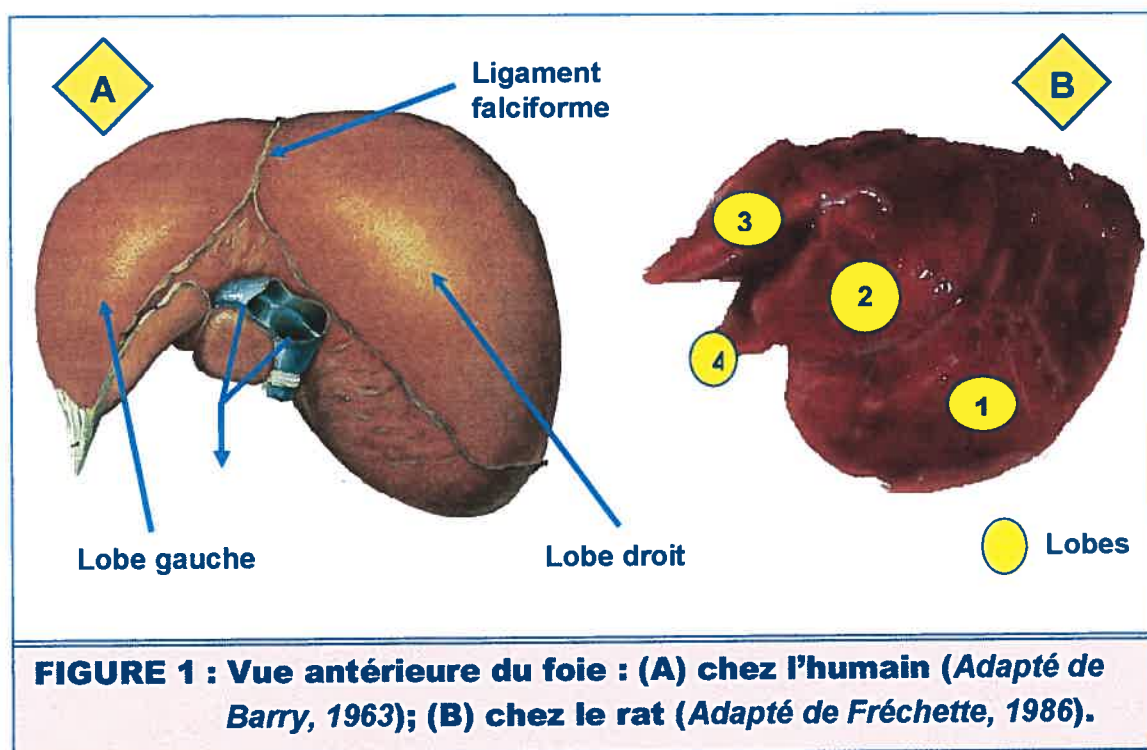
1- Structure et fonction du foie

Situé dans la cavité thoraco-abdominale, sous la coupole diaphragmatique droite, le foie présente un aspect rouge brunâtre et constitue la masse viscérale la plus volumineuse de l'organisme. Il masque à peu près complètement l'estomac chez toutes les espèces animales. Son apparence morphologique chez l'humain diffère cependant de celle chez certaines espèces comme le rat.

En effet, le foie humain présente une forme générale ovoïde avec une face supérieure convexe qui suit les contours du diaphragme, et une face inférieure dotée d'une cavité transversale très prononcée qui s'adapte à la saillie de la colonne vertébrale (FIG. 1A). La face supérieure lisse et unie, est segmentée par l'insertion d'un ligament falciforme qui divise le foie en deux grands blocs dont l'un constitue le lobe gauche et l'autre le lobe droit. La face inférieure irrégulière, est parcourue par trois sillons. L'un de ces sillons est le hile du foie, où convergent les nerfs et les vaisseaux qui arrivent au foie ou qui en partent. En avant du hile, se loge le lobe carré, et en arrière, le lobe caudé. Ces petits lobes, uniquement perceptibles en vue postérieure, sont étroitement reliés aux principaux lobes, gauche et droit, par une trame conjonctive fibreuse qui entoure le foie.

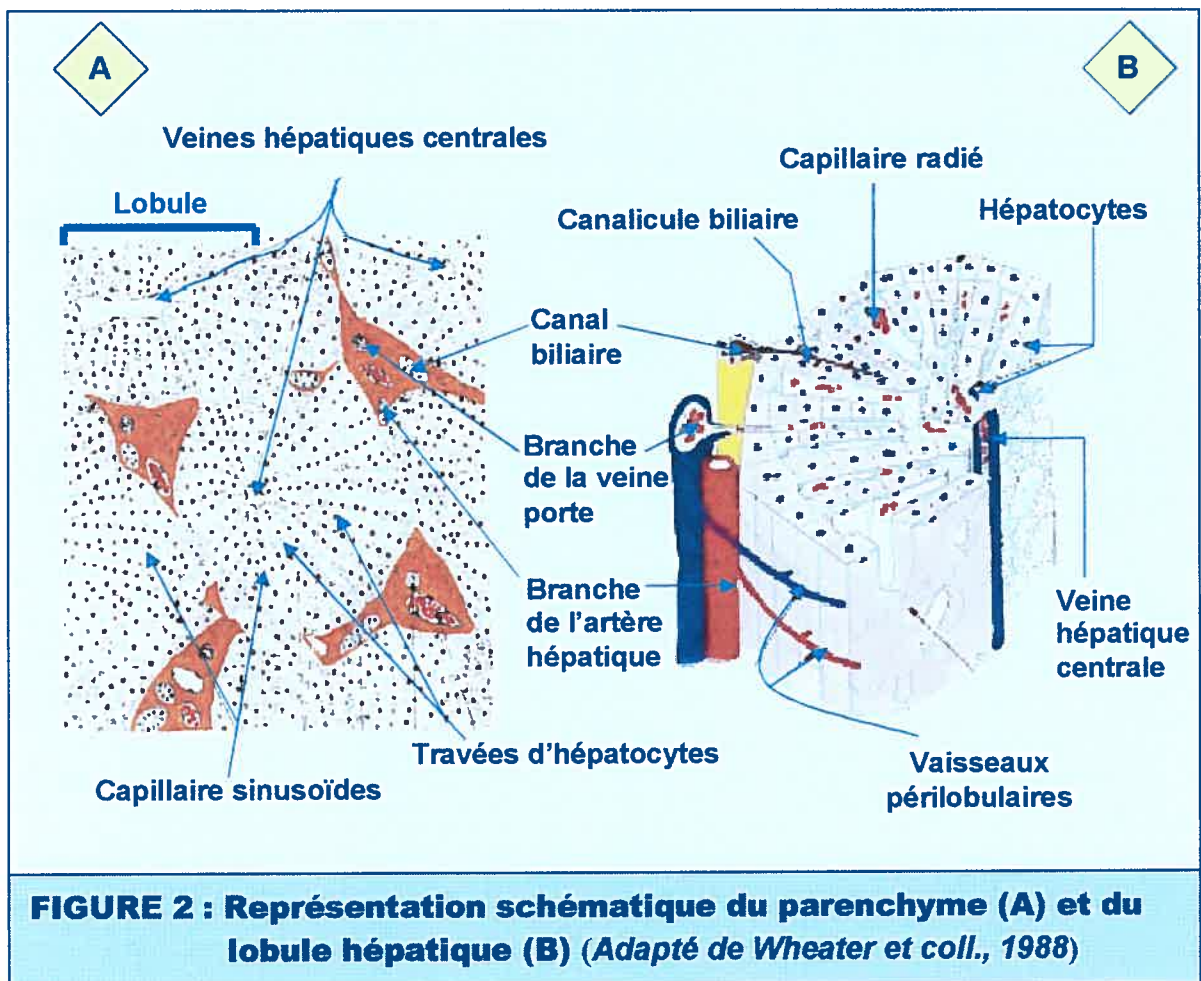
Chez le rat, le foie présente plutôt une forme indéfinie (FIG. 1B). Les quatre lobes sont séparés par des fentes profondes. Ils apparaissent clairement

dégagés les uns des autres et sont bien visibles sur toutes les facettes du foie.



En vision microscopique (FIG. 2A), le foie consiste en une myriade d'unités fonctionnelles individuelles, traditionnellement appelées lobules hépatiques. Chaque lobule est décrit par rapport à la disposition des composants vasculaires. Il est représenté sous forme d'hexagone, dont le centre est occupé par la veine hépatique centrale (FIG. 2B). Cette dernière draine le sang sinusoidal vers la veine sus-hépatique et la veine cave inférieure qui sont les vaisseaux efférents du foie. À chacun des six coins du lobule hexagonal se trouve un espace porte, où sont

regroupées les branches de l'artère hépatique et de la veine porte qui sont des voies afférentes du foie. La veine porte draine la circulation splanchnique et apporte au foie du sang riche en diverses substances endogènes et exogènes pendant que l'artère hépatique alimente le foie en sang oxygéné (Coleman, 1987; Jungermann, 1987). Ces deux apports sanguins se mélangent dans les capillaires sinusoides limités par les travées d'hépatocytes qui rayonnent de chaque espace porte vers les veines centrales adjacentes.



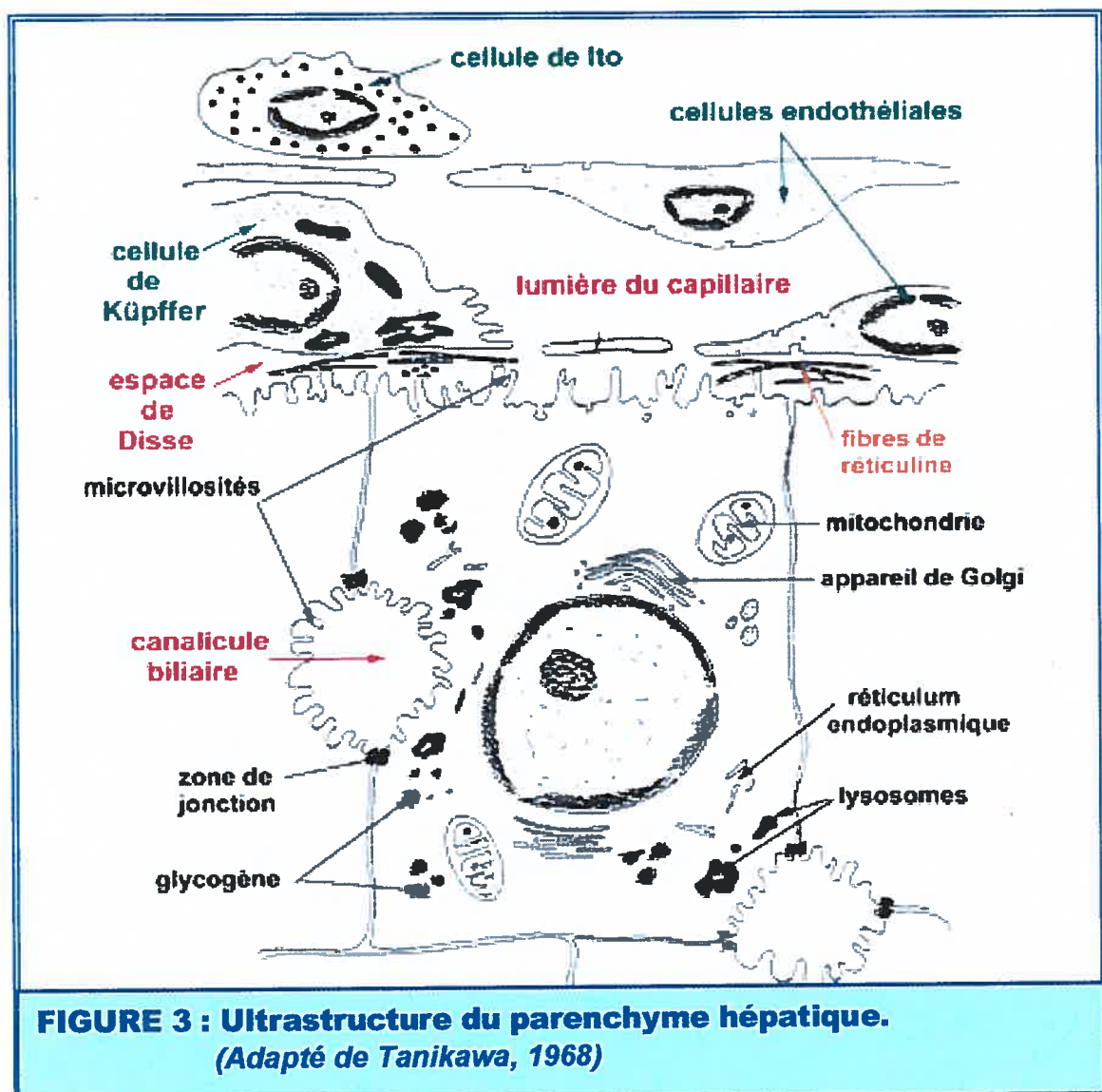
Sur le plan physiologique, la disposition des espaces portes et des veines hépatiques centrales, représentant respectivement les voies d'entrée et de sortie du sang au niveau du foie, constitue une caractéristique anatomique très importante. Elle a permis de caractériser trois zones parenchymateuses fictives du lobule, définies selon la distance qui les sépare des vaisseaux nourriciers. La région autour de l'espace porte est désignée zone 1 et la région entourant la veine hépatique centrale est désignée zone 3. La région intermédiaire entre ces deux zones est désignée zone 2 (Rappaport, 1973). Ainsi, la zone 1 regroupe les cellules convenablement alimentées, tandis que la zone 3 se compose des cellules moins bien alimentées et donc plus fragiles et plus susceptibles aux dommages associés à l'ischémie, à l'anoxie, à l'hémorragie et à la malnutrition (Rappaport, 1963).

Il est bien établi que les hépatocytes des différentes zones diffèrent par leur spécialisation fonctionnelle relative aux organelles qui prédominent dans leur cytoplasme (Novikoff et Essner, 1960). En général, les organelles comme les mitochondries, le complexe de Golgi, les lysosomes et les peroxisomes, impliquées dans les processus de transformation d'énergie cellulaire, de transport vésiculaire, de digestion des débris cellulaires ou dans les réactions oxydatives, sont distribuées d'une façon uniforme à travers le parenchyme hépatique. Par contre, le réticulum endoplasmique rugueux qui participe dans les activités de synthèse, est plus abondant dans la zone 1, pendant que le réticulum endoplasmique lisse, impliqué dans la biotransformation des substances

endogènes ou exogènes, prédomine dans la zone 3 (Loud, 1968; Jones et coll., 1979). Ainsi, les hépatocytes de la zone 1 sont plus actifs dans le captage des acides biliaires, la formation de la bile, la synthèse du cholestérol, des phospholipides, des acides biliaires et de la majorité des protéines plasmatiques et membranaires, tandis que les hépatocytes de la zone 3 contribuent davantage dans la glycolyse, la liponéogenèse et la biotransformation (Jungerman et Katz, 1989; Sokal et coll., 1989; Quistorff, 1990; Katz, 1992; Dionne et coll., 1994; Mottimo et coll., 2000). Néanmoins, l'importance de la zone 3 dans le captage de l'acide biliaire chénodéoxycholate a été aussi démontrée (Dionne et coll., 1990a). Par contre, l'importance de cette zone dans la formation de la bile est controversée. En effet, Gumucio et coll., (1978) ont observé que la destruction de la zone 3 avec le bromobenzène diminuait considérablement le flux biliaire, alors que les travaux de Yousef et ses associés (Dionne et coll., 1990a; Dionne et coll., 1990b; Dionne et coll., 1994; Mottimo et coll., 2000) n'ont révélé aucune modification significative dans ce paramètre en utilisant le même agent toxique. De plus, les effets de la destruction de la zone 3, rapportés par l'équipe de Yousef sur la concentration des acides biliaires dans la bile, étaient opposés à ceux observés par l'équipe de Gumucio. Il reste à clarifier si l'élaboration du flux biliaire dans la zone 3 est dépendante ou indépendante des acides biliaires.

Toutefois, malgré la différence zonale dans le fonctionnement des l'hépatocyte, les capacités exceptionnelles de ces cellules dans le métabolisme, l'entreposage et la sécrétion de diverses substances endogènes, confère au foie la

particularité de pouvoir tant la fonction endocrine en éjectant directement dans le sang des molécules biologiques qu'il synthétise, que la fonction exocrine en déversant la bile qu'il produit dans la lumière intestinale. La réalisation adéquate de cette double fonction requiert la participation ainsi que le fonctionnement coordonné des différentes organelles et des multiples protéines cytoplasmiques et membranaires dont disposent les hépatocytes. Ces cellules polygonales au noyau central, rond, volumineux et au cytoplasme éosinophile granuleux (FIG. 3), sont les cellules les plus abondantes dans le parenchyme hépatique.



Les hépatocytes sont des cellules épithéliales très complexes et hautement polarisées. Ils sont entourés d'une membrane cytoplasmique composée de deux régions dont une région basolatérale qui englobe les membranes sinusoidales et latérales, et une région apicale bordée par la membrane canaliculaire (Boyer, 1986). L'organisation structurelle du foie offre à ces cellules à la fois un système excréteur et des capillaires sanguins recueillant la sécrétion endocrine.

La membrane sinusoidale, en contact permanent avec le sang, constitue le pôle vasculaire et assure les échanges entre la circulation sanguine et l'hépatocyte, tandis que la membrane canaliculaire, en contact direct avec les autres hépatocytes, forme le pôle biliaire et est spécialisée dans l'excrétion des substances dans la bile (Boyer, 1986). Cette spécificité fonctionnelle est reflétée par une répartition hautement asymétrique des transporteurs membranaires. Plusieurs protéines impliquées dans le transfert transmembranaire d'une variété de composés endogènes et exogènes, sont principalement exprimées dans la membrane canaliculaire, tandis que la membrane sinusoidale abrite principalement les transporteurs d'électrolytes essentiels au maintien de la teneur ionique et du pH à l'intérieur de la cellule, ainsi que des systèmes de transport servant au captage spécifique des acides biliaires et de divers cations et anions organiques (FIG. 4).

Une distinction est également rapportée au niveau de la composition lipidique de ces membranes. La membrane canaliculaire contient une quantité plus

importante de lipides par mg de protéines, avec un rapport molaire cholestérol/phospholipides plus élevé et un contenu plus riche en sphingomyéline et en glycolipides (Fisher et coll., 1975; Wisher et Evans, 1975; Kremmer et coll., 1976; Yousef et coll., 1977; Meier et coll., 1984), ce qui lui confère une plus grande rigidité comparé à la membrane sinusoïdale (Lowe et Coleman, 1982; Storch et coll., 1983).

Malgré cette différence, chacune des deux domaines membranaires de l'hépatocyte est généralement identifié par la nature des enzymes qui s'y trouvent. En effet, certaines enzymes ont une activité plus importante dans la membrane canaliculaire pendant qu'elle est basse ou inexistante dans la membrane sinusoïdale. Ces enzymes incluent la leucine aminopeptidase, la 5'-nucléotidase, la Mg^{2+} ATPase et la phosphatase alcaline (Kremmer et coll., 1976; Wisher et Evans, 1975, Yousef et Murray, 1978).

D'autres enzymes dont l'adénylate cyclase et la Na^+/K^+ ATPase semblent être présentes principalement dans la membrane sinusoïdale (Wisher et Evans, 1975; Toda et coll., 1975; Dibona et Mills, 1979; Meier et coll., 1984). Toutefois, leur présence a été aussi rapportée dans les membranes canaliculaires avec des activités comparables à celles trouvées dans les membranes sinusoïdales pour Na^+/K^+ ATPase (Yousef et Murray, 1978; Yousef, 1979; Yousef et coll., 1984), mais beaucoup plus faibles pour adénylate cyclase (Wisher et Evans, 1975; Yousef et Murray, 1978).

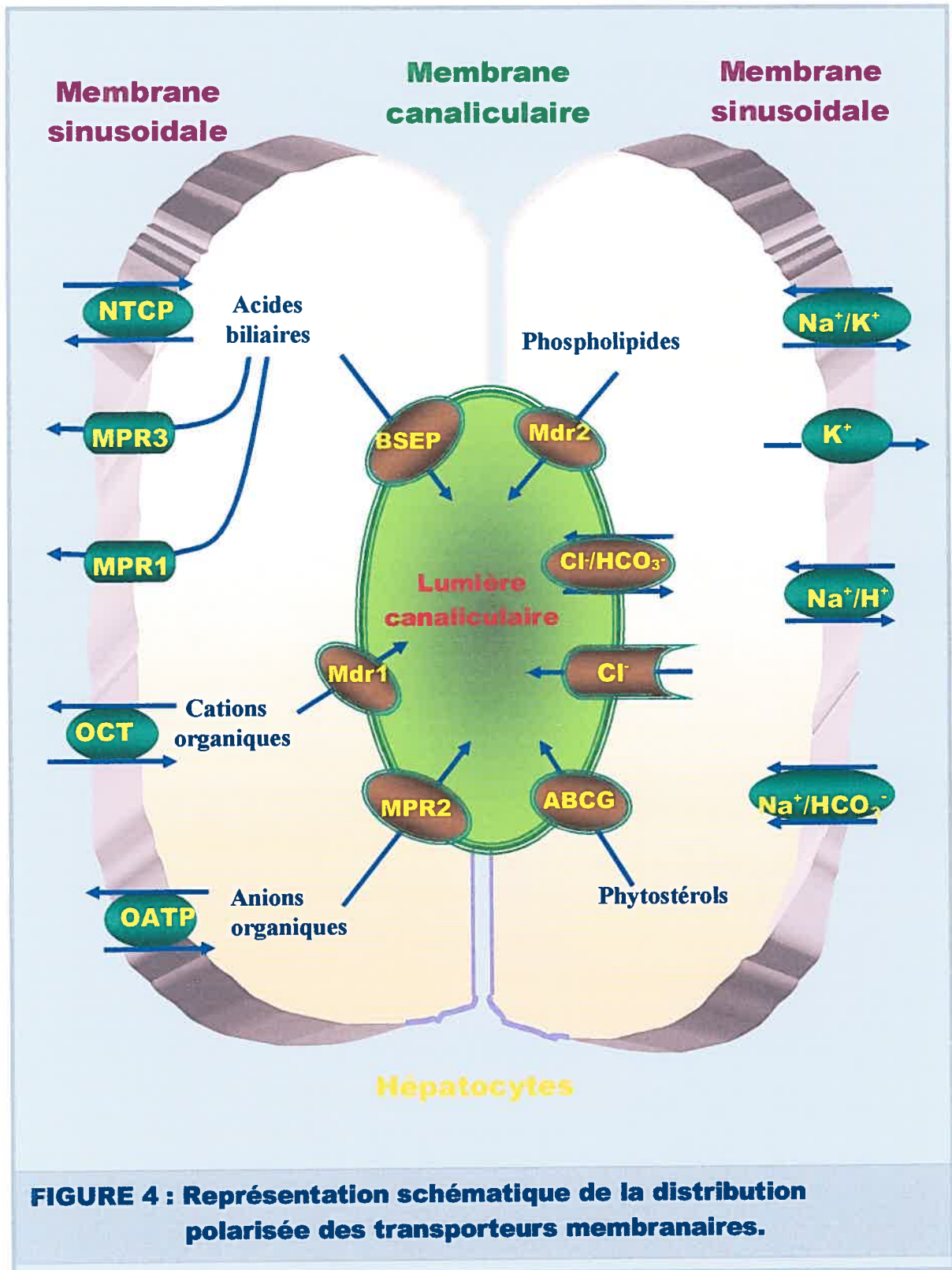


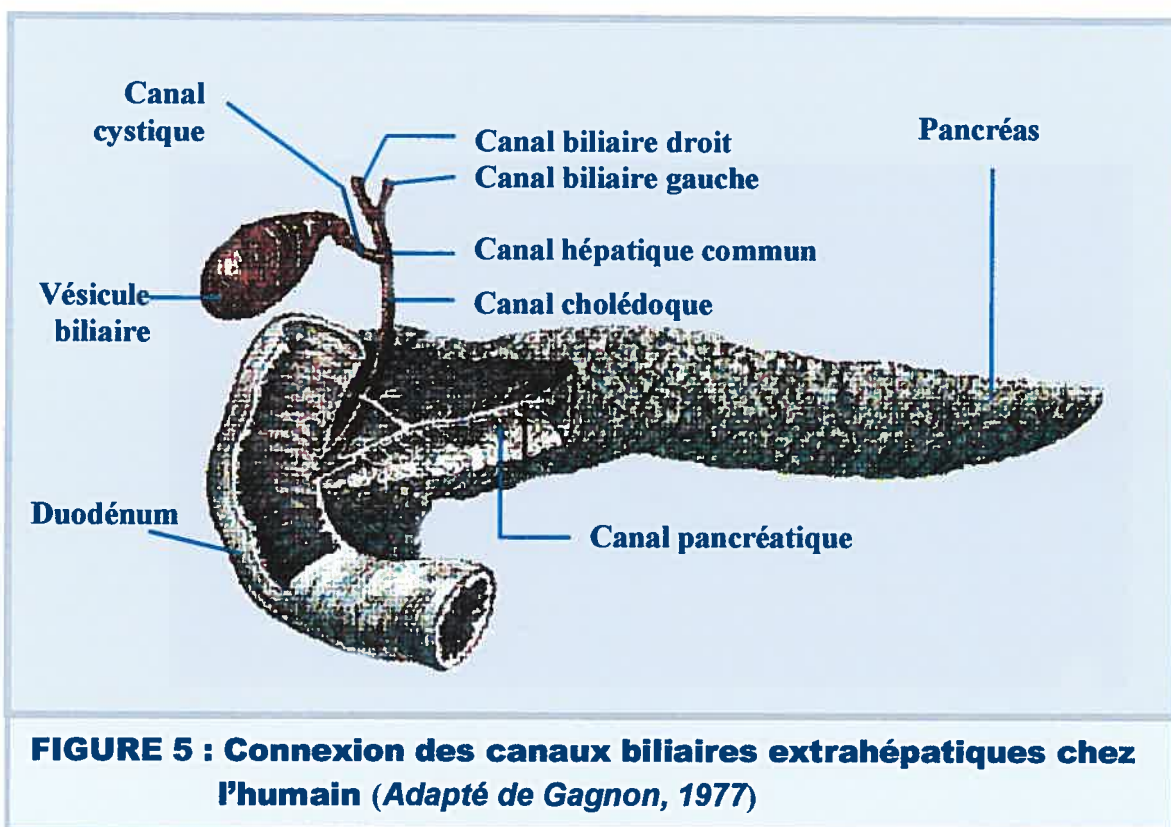
FIGURE 4 : Représentation schématique de la distribution polarisée des transporteurs membranaires.

La distribution polarisée des composants lipidiques et protéiques des membranes de l'hépatocyte est maintenue grâce aux jonctions étanches qui limitent les mouvements latéraux des lipides et des protéines entre les feuillettes externes des membranes (Gumbiner, 1987; Stevenson et coll., 1989; Molitoris et Nelson, 1990). La présence de ces jonctions entre la lumière canaliculaire et les espaces intercellulaires constitue une véritable barrière à la diffusion des solutés et est très important pour le maintien de l'hétérogénéité entre le sang sinusoidal et la bile qui circule dans les canalicules (Boyer, 1983; Klaassen et Watkins, 1984; Cerejido, 1989; Fisher, 1991).

Les canalicules sont des minuscules conduits qui longent les hépatocytes du côté opposé des sinusoides. Ils résultent de l'accolement de parois hépatocytaires invaginées et sont séparés par la membrane de deux ou trois hépatocytes adjacentes. Ces fins conduits constituent les branches initiales de la voie biliaire intrahépatique qui débouche sur le canal biliaire dans l'espace porte. La connexion du canal droit avec le canal gauche forme le canal hépatique commun qui sort du foie et s'unit au canal cystique qui draine la vésicule biliaire, pour former le canal cholédoque. Celui-ci rejoint ordinairement le canal pancréatique juste avant d'entrer dans le duodénum chez l'humain (FIG. 5).

En général, la bile produite sous forme diluée par le foie est d'abord stockée et concentrée dans la vésicule biliaire avant d'être déversée dans le duodénum. Mais chez le rat qui ne dispose pas de vésicule biliaire, la bile hépatique est

continuellement déversée dans la lumière duodénale à travers le prolongement du canal hépatique commun. Toutefois, indépendamment de l'espèce animale, la bile hépatique peut être modifiée par des processus d'absorption ou de sécrétion au cours de son passage le long des cellules épithéliales qui forment la paroi des canaux biliaires extrahépatiques.



La majorité des constituants biliaires qui parviennent à atteindre la lumière duodénale sont remarquablement éliminées dans les excréments intestinaux (Boyer, 1986; Hofmann, 1989). La bile constitue ainsi un moyen unique pour évacuer certains déchets métaboliques et de nombreuses substances nuisibles

pour l'organisme. Parmi ces substances, on distingue particulièrement le cholestérol qui fait l'objet de notre projet.

Bien que le cholestérol soit indispensable à la vie comme en témoignent plusieurs de ses fonctions (Repa et coll., 2001), les dangers que cette molécule fait peser sur la santé lorsqu'elle est en excès ne suscitent plus de doutes (Dietschy et coll., 1993). Le taux assurant à l'organisme une certaine marge de sécurité face à ces dangers est maintenu grâce aux événements survenant essentiellement dans le foie (Dietschy et coll., 1993; Vlahcevic et coll., 1999), et impliquant particulièrement les hépatocytes.

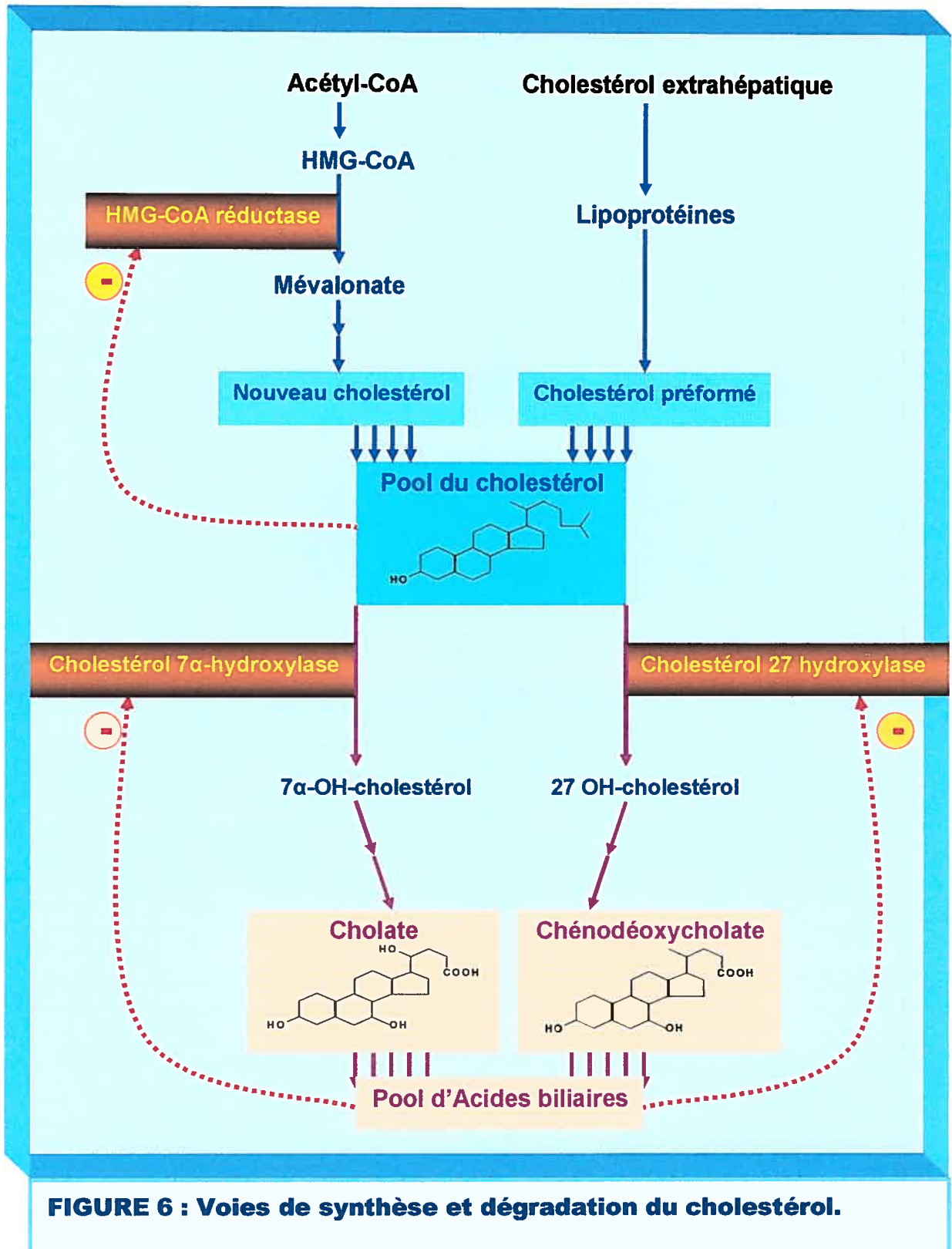
Les hépatocytes ont développé des mécanismes qui leur permettent non seulement de fournir à toutes les autres cellules de l'organisme le cholestérol nécessaire pour leur croissance et pour le maintien de leur structure membranaire, mais aussi de capter le cholestérol qui circule en excès dans sang pour le stocker dans le foie sous forme estérifiée ou l'éliminer dans la bile sous forme libre ou encore le transformer en acides biliaires. La régulation coordonnée de tous ces événements qui contribuent dans l'apport et l'élimination du cholestérol hépatique est l'unique moyen dont disposent les hépatocytes pour prévenir l'accumulation du cholestérol dans le foie.

Bien que l'apport extrahépatique du cholestérol soit une source importante, la synthèse du cholestérol par les hépatocytes constitue la principale source du

cholestérol hépatique. Cette synthèse s'effectue suivant un long processus métabolique impliquant approximativement trente étapes enzymatiques dont certaines se déroulent dans le réticulum endoplasmique et d'autres dans le cytoplasme (Rilling et Chayet, 1985). La première phase de ce processus a lieu dans le cytoplasme et aboutit à la formation de mévalonate, le précurseur éminent du cholestérol, suivant trois réactions qui commencent par la conversion de deux molécules d'acétyl-CoA en HMG-CoA (FIG. 6). La transformation de ce dernier en mévalonate par HMG-CoA réductase constitue l'étape limitante de la synthèse du cholestérol (Rodwell et coll., 1976; Brown et coll., 1979).

Il est bien établi que le cholestérol synthétisé dans le foie est principalement destiné à la synthèse des acides biliaires. Cette voie métabolique est particulièrement importante dans l'élimination du cholestérol. Il s'agit d'un processus complexe comportant 14 réactions enzymatiques ayant lieu dans trois compartiments cellulaires différents. Très schématiquement, la biotransformation du cholestérol peut se résumer à des modifications sur le noyau stérane et un clivage oxydatif des trois derniers carbones de la chaîne latérale. L'étape initiale, également limitante, est catalysée par cholestérol 7 α hydroxylase présente dans les microsomes. Le dogme d'une voie unique de la synthèse des acides biliaires par cette voie microsomale, a prévalu jusqu'à la découverte d'une seconde voie dite mitochondriale, dont l'étape initiale est catalysée par la 27 hydroxylase mitochondriale (Andersson et coll., 1972; Martin et coll., 1993). Ces deux voies métaboliques conduisent respectivement à une synthèse préférentielle de cholate

ou de chénodéoxycholate (FIG.6).



La voie principale de la synthèse des acides biliaires initiée par la cholestérol 7 α hydroxylase participe au maintien de l'homéostasie du cholestérol en utilisant préférentiellement le cholestérol nouvellement synthétisé comme substrat, prévenant ainsi l'excès du cholestérol libre dans le foie. Tandis que la voie alternative initiée par 27 hydroxylase, utilise le cholestérol extrahépatique, diminuant de ce fait la quantité de cholestérol qui circule dans le sang.

Javitt et ses collaborateurs étaient les premiers à rapporter la présence dans le sang humain, des produits d'oxydation du cholestérol formés sous l'action catalytique de 27 hydroxylase (Javitt et coll., 1990). Ils suggérèrent que ces produits seraient synthétisés dans les tissus périphériques et transportés dans le foie par les lipoprotéines pour être métabolisés en chénodéoxycholate. La forte expression de 27 hydroxylase dans les tissus et cellules extrahépatiques supporte une telle hypothèse (Bjorkhem et coll., 1994; Crisby et coll., 1997). Cette enzyme semble contribuer à l'homéostasie du cholestérol en participant à une forme de transport inverse du cholestérol, un processus par lequel le cholestérol des tissus périphériques est mobilisé et éliminé par le foie.

En effet, une mutation du gène de 27 hydroxylase cause des maladies associées à l'accumulation du cholestérol dans les tissus périphériques, démontrant l'importance de la voie alternative de la conversion du cholestérol en acides biliaires dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol (Cali et coll., 1991; Bjorkhem et coll., 1994; Lund et coll., 1996).

En général, l'homéostasie du cholestérol est maintenue par une variété de processus physiologiques. Des études intenses ont permis de caractériser le rôle des divers facteurs impliqués dans la régulation de ces processus au niveau du foie. Ces facteurs incluent les récepteurs des lipoprotéines, les transporteurs impliqués dans l'élimination biliaire des lipides ainsi que les enzymes d'estérification et d'hydrolyse du cholestérol (Hylemon et coll., 2001), mais le rôle fondamental revient à HMG-CoA réductase et le cholestérol 7 α -hydroxylase qui catalysent respectivement les étapes limitantes de la synthèse du cholestérol et de sa dégradation en acides biliaires.

HMG-CoA réductase est une P-glycoprotéine de 97 kDa (Nelson et coll., 1993), tandis que cholestérol 7 α -hydroxylase est une isoenzyme du cytochrome P450 (Istvan et coll., 2000). Ces deux enzymes localisées dans la membrane du réticulum endoplasmique (Reinhart et coll., 1987; Straka et coll., 1990; Goldstein et Brown, 1990; Olender et Simoni, 1992), sont régulées au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par de nombreux effecteurs, hormonaux ou non, dont les acides biliaires, le cholestérol, l'hormone thyroïdienne, les glucocorticoïdes, l'insuline et le glucagon (Osborne et coll., 1985; Nakanishi et coll., 1988; Hylemon et coll., 1992; Vlahcevic et coll., 1993; Kam, 1998; Edwards et Ericsson, 1999; Podevin et Poupon, 1999).

Certaines évidences indiquent que HMG-CoA réductase est principalement régulée par le cholestérol, tandis que les acides biliaires régulent principalement

cholestérol 7 α -hydroxylase (Weis et Dietschy, 1969; Björkhem et coll., 1991; Björkhem et coll., 1993; Podevin et Poupon, 1999). Le clonage des ADN complémentaires de ces enzymes (Osborne, 1991; Li et coll., 1990), a permis de montrer que cette distinction est liée à la régulation de ces enzymes au niveau transcriptionnel.

En effet, les promoteurs des gènes régulés par les acides biliaires ont été clairement identifiés sur l'ADN de cholestérol 7 α -hydroxylase (Chiang et Stroup, 1994; Stroup et coll., 1997), mais la présence de ces promoteurs sur l'ADN de HMG-CoA réductase n'a pas encore été rapportée. La régulation de cette enzyme par les acides biliaires semble s'effectuer principalement au niveau post-transcriptionnel (Björkhem et coll., 1993), alors que ces composés régulent cholestérol 7 α -hydroxylase surtout par des mécanismes transcriptionnels (Björkhem et coll., 1993; Podevin et Poupon, 1999).

Il a été démontré que la capacité des acides biliaires à diminuer la transcription génique de cholestérol 7 α -hydroxylase et provoquer une baisse de son activité, est proportionnelle à leur index d'hydrophobicité (Heuman et coll., 1989; Twisk et coll., 1995). Par contre, la modification de la transcription génique de cholestérol 7 α -hydroxylase par le cholestérol demeure controversée. Björkhem et coll., (1991) ont rapporté que l'augmentation de l'ARN messenger de cholestérol 7 α -hydroxylase généralement observée suite à une diète enrichie de cholestérol,

est causée par les acides biliaires résultant de la dégradation du cholestérol dans ces conditions.

En parallèle, il n'existe aucun doute pour la régulation de HMG-CoA réductase par le cholestérol. Il a été démontré que le cholestérol réduit la demi-vie de HMG-CoA réductase (Edwards et coll., 1977; Sinensky et coll., 1981; Liscum et coll., 1983; Luskey et coll., 1983; Nakanishi et coll., 1988), mais par un mécanisme non encore élucidé (Correll et Edwards, 1994). Le cholestérol réduit aussi les niveaux de l'ARN messager de cette enzyme (Goldstein et Brown, 1990; Edwards et Ericsson, 1999). La découverte des promoteurs des gènes régulés par le cholestérol a permis d'amorcer une compréhension plus précise de cette régulation par transcription génique accomplie par le cholestérol (Goldstein et Brown, 1990; Sakai et coll., 1996; Brown et Goldstein, 1997; Rawson et coll., 1997; Nohtuff et coll., 1998; 1999). Ce stérol est considéré comme un inhibiteur absolu de HMG-CoA réductase (Osborne et coll., 1985). Weis et Dietschy (1969) avaient d'ailleurs suggéré que les effets inhibiteurs des acides biliaires sur HMG-CoA réductase soient reliés au fait que les acides biliaires sont requis pour l'absorption du cholestérol.

Toutefois, indépendamment de l'effecteur impliqué, la régulation de HMG-CoA réductase et de cholestérol 7 α -hydroxylase à travers les processus transcriptionnels ou par dégradation, garantit un contrôle à long terme de la synthèse du cholestérol et de sa dégradation en acides biliaires.

Le contrôle à plus court terme de ces voies métaboliques est assuré soit par des modifications non covalentes de HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase via des inhibiteurs allostériques ou isostériques (Beg et coll., 1978), soit par des modifications covalentes de ces enzymes par phosphorylation (Beg et coll., 1978; Kwok et coll., 1981; Goodwin et coll., 1982; Scallen et Sanghvi, 1983). Néanmoins, les modifications par phosphorylation sont plus courantes pour la régulation rapide des activités de la plupart des enzymes impliquées dans diverses voies métaboliques (Holzer et Duntze, 1971; Segal, 1973; Lee et coll., 1976; Greengard, 1978).

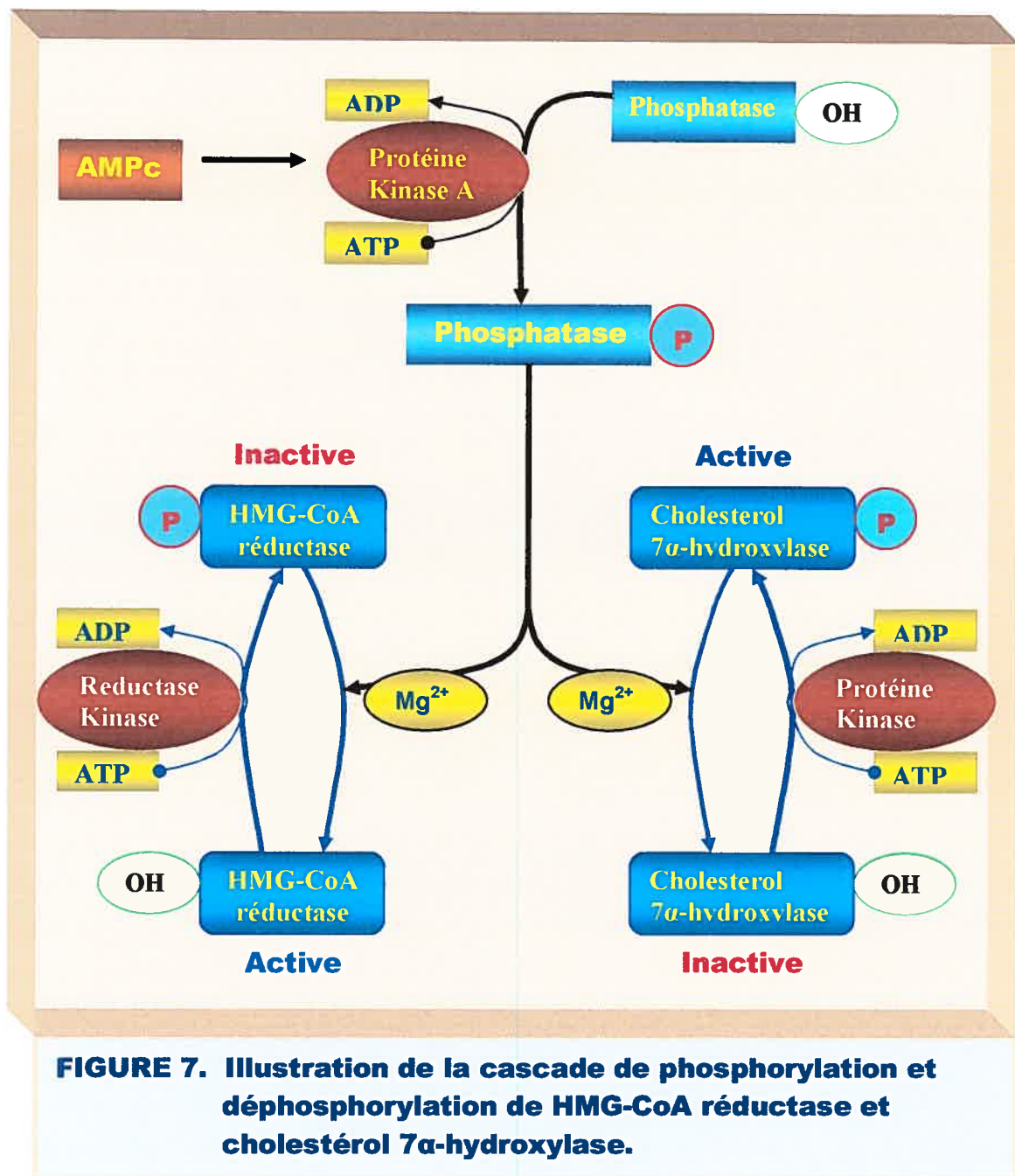
L'importance physiologique de la phosphorylation comme un moyen de régulation des activités de HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase a été démontrée par les travaux de Scallen et ses associés (Arebalo et coll., 1980; 1981). Ils avaient observé une inhibition rapide de HMG-CoA réductase chez des rats suite à une administration de mévalonolactone. Par contre, ce traitement provoquait une augmentation rapide de l'activité de cholestérol 7 α -hydroxylase chez les mêmes rats. Ces effets contraires de mévalonolactone sur ces deux enzymes étaient inversés *in vitro* par l'incubation des microsomes avec une phosphatase. Ces auteurs conclurent que mévalonolactone régule la synthèse et la dégradation du cholestérol par phosphorylation et que la phosphorylation désactive HMG-CoA réductase mais active cholestérol 7 α -hydroxylase.

Les effets opposés de la phosphorylation sur HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase furent confirmés *in vitro* par l'utilisation des cations divalents et des inhibiteurs des phosphatases (Beg et coll., 1978; Kwok et coll., 1981; Scallen et Sanghvi, 1983). En effet, les phosphatases sont connues d'activer ou de désactiver les enzymes en les déphosphorylant après qu'elles mêmes soient activées par phosphorylation via une protéine kinase activée par AMPc (Greico et coll., 1990; Gillespie et Hardie, 1992; Corton et coll., 1994). Cette cascade de phosphorylation et déphosphorylation requiert les cations divalents tel que les ions magnésium (Mg^{2+}) et aussi de l'ATP.

Beg et coll. (1973) étaient les premiers à rapporter que l'activité de HMG-CoA réductase est rapidement réduite en présence de l'ATP et des ions Mg^{2+} . Ces résultats furent confirmés par d'autres équipes (Shapiro et coll., 1974; Chow et coll., 1975; Brown et coll., 1979; Nordstrom et coll., 1977).

Plus tard, Beg et coll. (1978) démontrèrent que l'inhibition de de HMG-CoA réductase par la combinaison ATP- Mg^{2+} est dépendante du temps, de la température et de la disponibilité de l'ATP. Mais, contrairement à HMG-CoA réductase, l'activité de cholestérol 7 α -hydroxylase a été rapportée d'être augmentée par la combinaison ATP- Mg^{2+} et cette activation est inhibée par le fluorure de sodium, un inhibiteur puissant des phosphatases. Les états d'activation de HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase sont donc opposés dans le

processus de régulation du métabolisme du cholestérol par phosphorylation (FIG. 7).

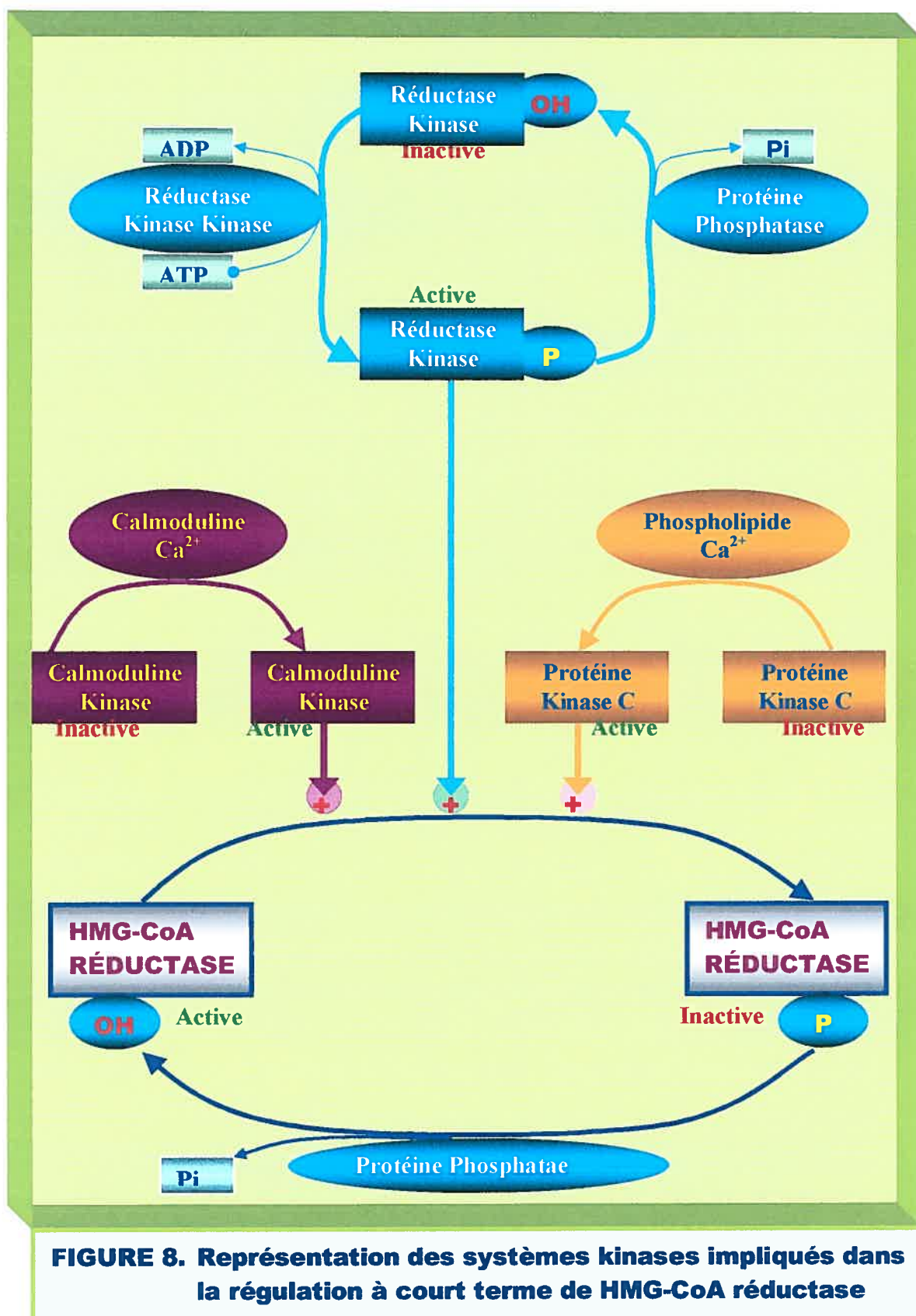


Il est bien établi que l'interconversion des formes phosphorylées et déphosphorylées des enzymes est assurée par des protéines kinases et des protéines phosphatases. Des études intenses ont permis de caractériser trois systèmes kinases pour la modulation de HMG-CoA réductase (FIG. 8). Le premier système est une cascade bicyclique impliquant HMG-CoA réductase, réductase kinase, réductase kinase kinase et les protéines phosphatases. Dans ce système, la réductase kinase kinase phosphoryle la réductase kinase qui phosphoryle à son tour la HMG-CoA réductase; les deux enzymes sont ensuite déphosphorylées par les protéines phosphatases. Cette phosphorylation réversible de HMG-CoA réductase et réductase kinase a été démontrée d'être modulée par mévalonolactone et ses métabolites dans un laps de temps très court (Beg et coll., 1984).

En effet, Beg et coll., (1984) ont rapporté une augmentation de l'activité de réductase kinase kinase et une phosphorylation importante de HMG-CoA réductase et réductase kinase chez des rats, 20 minutes après une injection de mévalonolactone. Les mêmes effets furent observés *in vitro* suite à une incubation des hépatocytes avec le mévalonate pendant 7 minutes (Morrero et coll., 1986). L'inhibition des protéines phosphatases observée au cours de ces études a permis aux auteurs de suggérer que mévalonolactone favorise la forme phosphorylée de HMG-CoA réductase. Sous cette forme, HMG-CoA réductase est plus susceptible à la dégradation enzymatique (Morrero et coll., 1986).

La dégradation enzymatique de HMG-CoA réductase a été suggérée d'être assurée par les protéases calcium-dépendantes qui ont été démontrées de dégrader rapidement pyruvate kinase (Bergstrom et coll., 1978; Ekman et Eriksson, 1980; Dahlqvist-Edberg et Ekman, 1981), fructose-1,6-bisphosphatase (Muller et Holzer, 1981) et troponine I (Toyo-Oka, 1982) sous leur forme phosphorylée.

Le deuxième système de modulation de HMG-CoA réductase par phosphorylation implique la calmoduline et la camoduline kinase, tandis que le troisième système implique les phospholipides et la protéine kinase C. L'activation de la calmoduline kinase par la calmoduline, ainsi que l'activation de la protéine kinase par les phospholipides requièrent les ions calciques (Beg et coll., 1987). Sur cette base, les variations du flux calcique intracellulaire ont été suggérés d'influencer l'activité de ces deux kinases (Cheung, 1980; Means et Dedman, 1980; Garrison et coll., 1984, Beg et coll., 1985).



2- Formation de la bile

La bile est une solution complexe formée d'eau, d'électrolytes et de substances organiques comme inorganiques. Les principaux électrolytes (Cl^- , HCO_3^- , Na^+ , K^+) ont une concentration voisine de leur concentration plasmatique tandis que les principaux composés organiques (acides biliaires, phospholipides, cholestérol, bilirubine conjuguée) sont nettement moins concentrés dans le plasma. D'autres composés comme des enzymes, des protéines de transport, des immunoglobulines et des hormones stéroïdiennes ou peptidiques sont retrouvés à des quantités beaucoup plus faibles. La contribution relative de ces différents produits dans la composition de la bile varie selon l'espèce et selon l'état physiologique de l'animal. Mais au regard de sa composition hétérogène, la bile est générée dans la lumière canaliculaire suivant une série complexe d'événements physiologiques reposant sur la haute polarité de l'hépatocyte et impliquant les systèmes de transport spécifiques.

2.1- Génération du flux biliaire

La génération du flux biliaire repose sur la capacité de l'hépatocyte à concentrer des composés peu ou non diffusibles dans l'espace canaliculaire. Ces composés provoquent ensuite une attraction des composés diffusibles. C'est un processus largement attribué à la filtration d'eau et d'électrolytes par voie paracellulaire et possiblement transcellulaire.

Le principal déterminant dans la génération du flux biliaire est le volume d'eau généré dans l'espace canaliculaire. L'intensité de ce volume dépend de la concentration des composés organiques et inorganiques osmotiquement actifs dans l'espace canaliculaire (Erlinger, 1988).

En théorie, toute substance osmotiquement active sécrétée dans le canalicule provoque un appel d'eau. Selon le modèle courant, l'attraction canaliculaire de l'eau est précédée par la sécrétion active des solutés et la création d'un gradient sodique via la Na^+/K^+ ATPase, jumelée avec l'action combinée du canal chlorhydrique et l'échangeur chlorure/bicarbonate.

Cependant, malgré la présence des canaux ioniques sur la membrane canaliculaire, un équilibre électrolytes existe entre le milieu extracellulaire et la lumière canaliculaire, suggérant une diffusion par voie paracellulaire et donc une contribution minimale des électrolytes comme agents osmotiques primaires.

Les agents osmotiques primaires demeurent en fait encore à ce jour partiellement inconnus. Bien que plusieurs composés dont les anions organiques, le GSH et certains acides aminés soient des candidats potentiels, les acides biliaires sont les seuls composés clairement admis comme exerçant une force osmotique primaire dans la génération du flux biliaire (Graf, 1983; Oude Elferink et coll., 1991). Les évidences d'un tel rôle reposent sur la démonstration que l'administration exogène des acides biliaires provoque simultanément une

augmentation spontanée de leur présence dans le canalicule et un accroissement rapide du flux biliaire. Inversement, l'abolition de leur disponibilité hépatique, via l'interruption de la circulation entérohépatique, produit une diminution du flux biliaire qui, en grande partie, est rétablie par une infusion d'acides biliaires (Kakis et Yousef, 1980; Yousef et coll., 1987; Roy et coll., 1989).

2.2- Disponibilité canaliculaire des acides biliaires

Les acides biliaires sont des stéroïdes à 24 atomes de carbone dérivés du cholestérol. La réduction en *cis* de la double liaison en C5-C6 du cholestérol confère à ces molécules une structure incurvée avec une partie hydrophile et une partie hydrophobe, substratum de leurs propriétés amphiphiles. L'adjonction d'un ou plusieurs radicaux hydroxyles en position 7 et/ou en position 12 sur le noyau stérane ainsi que l'amidification de la fonction carboxylique terminale par conjugaison à la taurine ou à la glycine, augmentent cette amphiphilie et diminuent les constantes d'ionisation des acides biliaires, les rendant plus hydrophiles et donc dépendantes des transporteurs spécifiques pour traverser les membranes cellulaires et accéder à la lumière canaliculaire où ils exercent une grande force osmotique.

L'hépatocyte capte très efficacement les formes conjuguées d'acides biliaires circulant dans le sang, grâce à un transporteur actif dépendant du sodium, le NTCP (pour *Na⁺ taurocholate co-transporting polypeptide*), et plus accessoirement les formes non conjuguées via un système de transport d'anions

indépendant du sodium, l'OATP (pour *organic anion transporting polypeptide*) (Kullak-Ublick et coll., 1995). Le transporteur NTCP démontre une affinité beaucoup plus forte pour taurocholate et les autres acides biliaires conjugués présentant les mêmes caractéristiques chimiques. Il est exclusivement exprimé dans le foie et strictement localisée dans la membrane sinusoïdale des hépatocytes. Par contre, certains membres de la famille des transporteurs OATP sont principalement sinon exclusivement exprimés dans certains tissus extrahépatiques comme le cerveau, les reins, les poumons et les intestins. Les trois membres (OATP 1, OATP 2 et OATP 4) exprimés dans le foie présentent un spectre de substrats beaucoup plus large que celui du transporteur NTCP. Ils transportent une vaste gamme d'acides biliaires et une variété d'autres composés organiques comme la bromosulfophtaléine, la bilirubine, la phalloïdine, les stéroïdes conjugués et non conjugués, les hormones thyroïdiennes, les peptides, les mycotoxines et un grand nombre de médicaments (Kullak-Ublick et coll., 2000). Cependant, leur capacité à concentrer les acides biliaires dans l'hépatocyte est plus faible que celle du transporteur NTCP. D'autres transporteurs tels que MRP 1 et MRP3 localisés dans la membrane sinusoïdale, servent à éffluer les acides biliaires dans le sang et s'expriment uniquement en situation cholestatique pour compenser la défaillance de l'élimination de ces composés par voie canaliculaire (Soroka et coll., 2001; Meier et Stieger, 2002).

Dans les conditions normales, après le captage à travers la membrane basolatérale, les acides biliaires sont transportés dans le cytoplasme de

l'hépatocyte en direction de la membrane canaliculaire (Suchy et coll., 1983; Caperna et Failla, 1984; Stolz et coll., 1989; Oude Elferink et coll., 1993; Jacquemin et coll., 1994; Wolkoff, 1996). Les mécanismes régissant ce transport ne sont pas encore clairement établis. Toutefois, malgré de nombreuses controverses qui subsistent dans la littérature, les résultats s'accordent quant à l'implication des protéines dans ce processus. Au moins trois familles de protéines cytosoliques capables de lier les acides biliaires ont été caractérisées. Ce sont les familles des protéines Y', des protéines Z et des protéines aux activités GSH-S-transférase.

Les protéines aux activités GSH-S-transférase et les protéines Z démontrent des constantes de dissociation beaucoup plus élevées comparativement à la protéine Y' (Stolz et coll., 1989; Erlinger, 1990; Chari et coll., 1996). Cette dernière est dotée d'une activité 3-alpha-hydroxy-stéroïde déshydrogénase et semble non seulement jouer un rôle physiologique prépondérant (Stolz et coll., 1987; Crowford, 1996), mais aussi se lier plus spécifiquement aux acides biliaires (Stolz et coll., 1987). Certains auteurs pensent qu'une telle liaison puisse limiter la sécrétion des acides biliaires et favoriser leur rétention intracellulaire (Yousef et coll., 1984; Takikawa et coll., 1987; Weisiger, 1996; Zucker et coll., 1996; El-Seaidy et coll., 1997). Pour ces auteurs, le transfert des acides biliaires du pôle sinusoidal jusqu'au pôle canaliculaire de l'hépatocyte est régi principalement par transport vésiculaire.

En effet, il a été démontré que les acides biliaires s'associent à des structures cellulaires incluant le réticulum endoplasmique, le Golgi et des vésicules transcytotiques (Lamri et coll., 1988; Erlinger, 1990). Des systèmes de transport apparaissent même identifiés sur certaines de ces structures (Meier et coll., 1984; Simion et coll., 1984; Kast et coll., 1994; Wolkoff, 1996). Une analyse séquentielle avec des radio-marqueurs a révélé une association aux membranes plasmique et au réticulum endoplasmique, suivie de liaison au Golgi et aux vésicules péricanaliculaires (Suchy et coll., 1983; Oude Elferink et coll., 1993; Wolkoff, 1996), supportant la contribution du transport vésiculaire dans la transcytose des acides biliaires.

Dans tous les cas, le transfert des acides biliaires à travers la membrane canaliculaire constitue l'étape limitante dans tout le processus de transport des acides biliaires depuis leur captation basolatérale jusqu'à leur disponibilité dans la lumière canaliculaire. Ce transfert est principalement effectué par un transporteur membranaire actif de la famille des P-glycoprotéines, originalement appelé spgp (pour *sister P-glycoprotein*) et maintenant désigné bsep (pour *bile salt export pump*) (Childs et coll., 1995; Gerloff et coll., 1998). Cette protéine de 160 KDa est un membre de la superfamille des transporteurs ABC (pour *ATP-binding cassette*) et fut clonée à partir des foies de rats et de souris. Son homologue humain a été aussi cloné et présente 80% de similitude avec la souche des rongeurs (Strautnieks et coll., 1998). Chez l'humain, le gène de bsep a été identifié sur le bras long du chromosome 2q24. Plusieurs mutations de ce gène, résultant en une

absence de l'expression de bsep sur la membrane canaliculaire, ont été identifiées chez des personnes atteintes de la cholestase intrahépatique familiale progressive de type 2 (Strautnieks et coll., 1998), une maladie hépatique progressive caractérisée par une concentration des acides biliaires dans la bile en dessous de 1% de la normale (Jansen et coll., 1999). Cette découverte fut un élément important pour l'hypothèse que la bsep est le principal transporteur des acides biliaires à travers la membrane canaliculaire.

La délétion du gène codant pour la P-glycoprotéine bsep a permis de créer des souris mutantes totalement dépourvues de cette protéine (Wang et coll., 2001). Ces souris présentent une réduction de la sécrétion des acides biliaires ainsi que du flux biliaire, et développent une cholestase intrahépatique. Contrairement à l'humain, cette cholestase n'est pas progressive mais persistante et apparaît moins sévère que la cholestase causée par la mutation de l'homologue humain du gène bsep. Par ailleurs, ces souris présentent des modifications importantes au niveau du profil des acides biliaires dans leur bile (Wang et coll., 2001) et dans d'autres matrices biologiques (Perwaiz et coll., 2003). La sécrétion de l'acide cholique conjugué et de certaines espèces d'acides biliaires dihydroxylés est considérablement réduite pendant que la sécrétion des autres acides biliaires comme les muricholates demeure normale. De plus, une nouvelle espèce d'acide biliaire, inexistante chez les souches sauvages, est observée chez les souches mutantes. Cet acide biliaire présente quatre groupes hydroxyles dans

sa structure, ce qui suggère une activation de l'hydroxylation des acides biliaires chez ce phénotype.

Récemment, Perwaiz et coll., (2003) ont rapporté une augmentation de l'expression de cholestérol 7 α -hydroxylase dans les foies des souris mutantes knockout bsep, suggérant une augmentation de l'activité de cette enzyme chez ce phénotype. Ces auteurs ont également suggéré que les activités de 6 β et 12 α -hydroxylases seraient aussi augmentées chez ces souris et que la nouvelle espèce d'acide biliaire observée proviendrait d'une réaction entre les métabolites de ces deux enzymes impliquées dans la cascade d'hydroxylation des acides biliaires.

Il a été démontré que l'hydroxylation des acides biliaires amoindrit leurs propriétés cholestatique (Colman, 1987; Vu et coll., 1991), et que plus un acide biliaire est hydroxylé, moins il est hydrophobe et moins il est toxique (Rossi et coll., 1987; Setchell et coll., 1988; Oude Elferink et coll., 1996). Une sécrétion normale des acides biliaires très hydrophiles chez les mutants bsep indique que leur transport à travers la membrane canaliculaire est assuré par un système de transport alternatif. Il a été suggéré que l'hydroxylation accrue et le système de transport alternatif des acides biliaires hydrophiles, pourraient compenser la déficience de bsep et protéger les mutants des dommages cholestatiques sévères (Wang et coll., 2001). Les rongeurs sont connus pour disposer d'un mécanisme hépatique d'hydroxylation/détoxification plus efficace que l'humain (Colman, 1987),

ce qui pourrait constituer un argument important pour expliquer la différence entre l'humain et la souris dans le développement de la cholestase induite par la délétion du gène *bsep*. Aussi, il reste à investiguer si le système de transport alternatif suspecté chez la souris serait présent chez l'humain.

De nombreuses protéines dont MRP3 (Otiz et coll., 1997; Otiz et coll., 1999; Hirohashi et coll., 2000), ecto-ATPase (Sippel et coll., 1993; Sippel et coll., 1997) et FIC1 (pour *familial intrahepatic cholestasis 1*), une protéine de 140 KDa affectée dans le syndrome de la cholestase familiale (Strautnieks et coll., 1997; Bull et coll., 1998; Eppens et coll., 2001), ont été proposées comme transporteurs potentiels des acides biliaires au niveau de la membrane canaliculaire. Une étude récente effectuée avec la cyclosporine A, inhibiteur connu des P-glycoprotéines dont la *bsep*, supporte l'hypothèse que d'autres transporteurs d'acides biliaires pourraient exister au niveau de la membrane canaliculaire (Elamiri et coll., 2003). Néanmoins, *bsep* demeure considérée comme la principale protéine qui assure le transfert des acides biliaires à travers cette membrane.

Les performances de la P-glycoprotéine *bsep* dans le transport des acides biliaires ont été mises en évidence grâce aux vésicules membranaires des cellules Sf9 transfectées avec l'ADN recombinant de *bsep* (Gerloff et coll., 1998). Elle démontre une activité plus grande pour le transport de glycocholate, taurocholate, taurochénodéoxycholate et tauroursodéoxycholate (Gerloff et coll., 1998; Noe et coll., 2001). Des teneurs normales de muricholate et la présence d'un acide biliaire

tétrahydroxylé dans la bile des souris déficientes du gène *bsep*, pendant que les concentrations biliaires de taurocholate sont dramatiquement réduites, supportent que *bsep* est spécifique pour le transport des formes conjuguées d'acides biliaires à travers la membrane canaliculaire (Wang et coll., 2001; Perwaiz et coll., 2003).

Bien que la disponibilité canaliculaire de toute forme d'acides biliaires soit propice à l'attraction de l'eau et indispensable à la stimulation de l'excrétion des lipides biliaires (Graf, 1983; Yousef et coll., 1987; Roy et coll., 1989; Oude Elferink et coll., 1991), l'observation récente, chez les souris *bsep* knockout, d'une sécrétion accrue des lipides biliaires, a amené Wang et coll. (2001) à suggérer que c'est la concentration des acides biliaires intrahépatiques, et non intracaniculaires, qui constitue la force majeure dans l'excrétion des lipides biliaires.

2.3- Mécanisme d'excrétion des lipides biliaires

Les lipides retrouvés dans la bile sont essentiellement le cholestérol et les phospholipides, dont presque exclusivement la phosphatidylcholine (Alvaro et coll., 1986). Le processus d'excrétion de ces lipides est très complexe parce qu'il implique la sécrétion des acides biliaires et la solubilisation de la membrane canaliculaire. Une étape clé dans ce processus est la translocation des phospholipides à travers la membrane canaliculaire. La nécessité de cette étape a été démontrée par une absence quasi complète des phospholipides et du cholestérol dans la bile des souris déficientes de la protéine *mdr2* (pour *multidrug*

resistance) (Smit et coll., 1993). Il s'agit d'une P-glycoprotéine de la superfamille des transporteurs ABC (pour *ATP-binding cassette*). Elle est retrouvée essentiellement dans le foie et exprimée uniquement dans la membrane canaliculaire.

Smit et coll., (1993) ont rapporté que la délétion du gène codant pour *mdr2* n'affecte pas la viabilité des jeunes souris mais les expose à une maladie hépatique sévère et progressive dès l'âge de trois semaines. Bien que l'apparence extérieure de ces souris reste normale jusqu'à l'âge de 11 mois, les anomalies histologiques indiquant une inflammation portale et une prolifération des conduits biliaires sont détectables dès l'âge de trois semaines. Cependant, les hépatocytes commencent à démontrer une apparence dégénérée à partir d'un âge variant entre six et 14 semaines. À cet âge, les concentrations sériques de la bilirubine conjuguée et de certaines enzymes marqueurs de l'altération du parenchyme hépatique, notamment la phosphatase alcaline, l'aspartate aminotransférase et l'alanine aminotransférase sont considérablement élevées chez ces souris, tandis que la composition de leur bile est marquée par une absence totale des phospholipides et une réduction dramatique du cholestérol. Par contre, les concentrations de certains anions dont les acides biliaires, le glutathion et Cl^- , ou de certains cations comme Na^+ et K^+ , ne changent pas dans la bile au cours du développement de la maladie. Il fut suggéré que la maladie est causée par la toxicité des acides biliaires hydrophobes qui ne sont pas solubilisés dans la bile par manque de phospholipides. De plus, la sévérité de la maladie peut être

influencée par la modulation de l'hydrophobicité du pool des acides biliaires (Van Nieuwkerk et coll., 1997).

Bien que les concentrations biliaires de gamma-glutamyltransférase ne soient pas élevées chez ces souris mutantes, le phénotype global de leur maladie ressemble à celui de la cholestase intrahépatique familiale progressive de type 3 retrouvée chez l'humain. Cette cholestase se distingue des autres formes génétiques de cholestase par des taux sériques élevés de gamma-glutamyltransférase (Kullak-Ublick et coll., 2000). Elle est causée par une altération de l'excrétion des phospholipides due à un défaut génétique au niveau du gène MDR3 (Jacquemin et coll., 2001), l'équivalent humain de *mdr2* (Jansen et coll., 1999).

Avant la génération des souris mutantes dépourvues de la protéine *mdr2*, l'altération de l'excrétion des phospholipides n'était pas systématiquement prise en compte dans l'étiologie des maladies du foie, possiblement parce que la sécrétion des phospholipides était considérée comme une conséquence passive de la sécrétion des acides biliaires. Mais la reconnaissance de *mdr2* comme une flippase des phospholipides, a considérablement changé ces concepts et a apporté plus de précisions dans le processus de sécrétion des phospholipides.

Plusieurs travaux supportent le rôle de la protéine *mdr2* dans la translocation spécifique de la phosphatidylcholine à travers la membrane

canaliculaire (Berr et coll., 1988; Wirtz, 1991; Shamburek et Schwartz, 1993; Crawford et coll., 1997). Malgré la relation étroite entre l'excrétion de ce phospholipide et celle du cholestérol, il n'existe aucune évidence directe de l'implication de ladite protéine dans le transfert membranaire du cholestérol. Cette observation, cependant, n'exclut pas la possibilité que la translocation du cholestérol à travers la membrane canaliculaire requière un transporteur. D'autant plus que le transfert du cholestérol à travers les membranes biologiques par simple flip-flop spontané demeure incertain et controversé. De plus, de récentes évidences suggèrent que les protéines membranaires ABCG5 et ABCG8 exprimées dans les intestins et le foie, pourraient être impliquées dans l'élimination cellulaire des phytostérols et assurer la translocation membranaire du cholestérol (Oude Elferink et Groen, 2002).

Malgré des études intenses pour découvrir le processus d'élimination des lipides dans la bile, le mécanisme d'excrétion du cholestérol demeure encore inconnu. Toutefois, il est rapporté que le cholestérol n'est pas éliminé dans la bile en absence de l'excrétion des phospholipides (Berr et coll., 1997). De nombreuses spéculations attribuent cet inconvénient à la très faible capacité des micelles simples d'acides biliaires à solubiliser le cholestérol. Ces spéculations trouvent leur fondement dans l'hypothèse de Hardison et Apter énoncée en 1972, et voulant que le cholestérol soit éliminé via la formation des micelles mixtes. Selon cette hypothèse, les acides biliaires se concentrent dans la lumière canaliculaire. Une fois que leur concentration micellaire critique est atteinte, ils forment des sphères

chargées négativement appelées micelles simples. Ces dernières ont une forte capacité détergente pour les phospholipides mais pas pour le cholestérol. Elles pourvoient une extraction efficace des phospholipides membranaires.

Après extraction, les phospholipides s'incorporent ensuite dans les micelles simples et élèvent leur affinité pour le cholestérol, qui peut alors s'incorporer à son tour dans lesdites micelles. Cette incorporation subséquente du cholestérol génère des agrégats polymoléculaires plus importants appelés micelles mixtes, à l'intérieur desquelles le cholestérol est stabilisé et éliminé dans la bile.

Les évidences qui supportent ce mode d'élimination du cholestérol via la formation des micelles, reposent sur la démonstration que les acides biliaires très hydrophiles tels que déhydrocholate, muricholate et ursodéoxycholate, qui ne s'agglomèrent pas en micelles, n'augmentent pas les concentrations biliaires des phospholipides ou du cholestérol, tandis que la relation est étroite entre l'excrétion de ces lipides et celle de acides biliaires capables de former les micelles (Nakama et coll., 1979; Ninomiya et coll., 2003).

Bien que certains aspects dans le processus d'excrétion des lipides demeurent incompris, la découverte récente de mdr2 a permis d'amorcer une compréhension plus précise de ce processus. Ainsi, sur la base des données actuelles, Crawford et ses associés ont proposé un modèle dans lequel mdr2 transfère la phosphatidylcholine du côté intracellulaire vers le côté luminal de la

membrane canaliculaire en générant des microdomaines (FIG. 9). Les acides biliaires présents dans la lumière canaliculaire interagissent avec ces microdomaines pour promouvoir la vésiculation de la couche externe de la membrane et donc l'extraction des molécules de phosphatidylcholine. Le cholestérol qui défile entre les deux cotés de la membrane canaliculaire, peut ainsi être éliminé dans la bile en diffusant dans les vésicules de phosphatidylcholine naissantes (Crawford et coll., 1997).

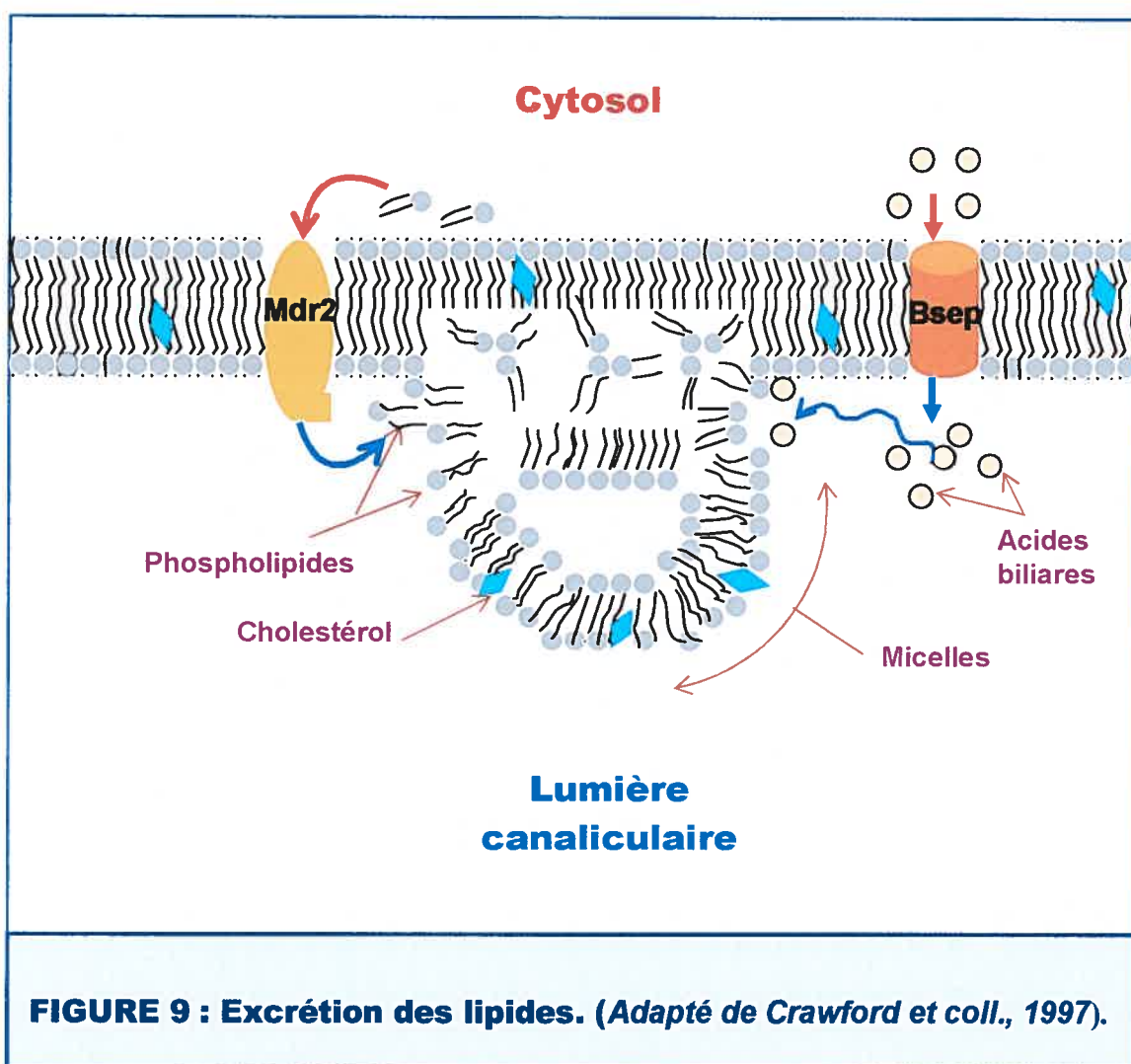


FIGURE 9 : Excrétion des lipides. (Adapté de Crawford et coll., 1997).

2.4- Excrétion des autres composés biliaires

Certains composés amphiphiliques retrouvés dans la bile sont activement excrétés sous forme de monomères par les protéines mdr1 ou MRP2 (pour *multi-drug resistance-associated protein*). Ces protéines membranaires de la superfamille des transporteurs ABC (pour *ATP-binding cassette*) disposent de domaines de transit à spécificité très large pour les composés organiques, ce qui explique le large spectre de leurs substrats respectifs. Elles sont retrouvées dans une variété d'organes et leur surexpression transcriptionnelle est associée à la résistance des tumeurs humaines aux agents chimiothérapeutiques (Silverman et Schrenk, 1997).

La protéine mdr1 est reconnue comme assurant la translocation de nombreux composés neutres et une variété de composés organiques chargés positivement dont les médicaments cationiques, les peptides hydrophobiques, les protéines, les acides aminés et certaines toxines (Sharma et coll., 1992; Silverman et Thorgeirsson, 1995; Müller et Jansen, 1997). Ce transporteur fut aussi démontré capable de servir à l'élimination des glycolipides atypiques (van Helvoort et coll., 1996) et des stéroïdes conjugués (Gosland et coll., 1993; Liu et coll., 1996).

Par ailleurs, plusieurs travaux supportent le rôle de MRP2 dans le transport spécifique des anions organiques autres que les acides biliaires. Ces anions peuvent être non conjugués ou conjugués au glutathion, au sulfate ou à l'acide glucuronique (Jedlitschky et coll., 1996; Ito et coll., 1998). Il est possible que

MRP2 se charge aussi de l'excrétion canaliculaire du glutathion réduit (Paulusma et coll., 1999) et de certains autres composés non chargés (Madon et coll., 1997).

3- Cholestase

3.1- Définition et classification

Le terme cholestase est utilisé dans les différentes branches de la médecine moderne et est définie par les spécialistes selon leur champ d'activité. Ainsi, le pathologiste définit la cholestase comme étant une accumulation manifeste des composés de la bile dans les hépatocytes et les conduits biliaires, tandis que le clinicien diagnostique une cholestase lorsqu'il y a une accumulation des marqueurs enzymatiques canaliculaires (phosphatase alcaline, aminopeptidase), et des composés biliaires (sels biliaires, bilirubine, glucuronides, cholestérol) dans le sang. Mais, la cholestase serait mieux définie par les physiologistes qui l'associent à une diminution et parfois à un arrêt total de l'écoulement du liquide biliaire, dont les constituants sont retenus dans les hépatocytes et peuvent éventuellement refluer dans le sang (Meier-Abt, 1990).

La cholestase peut se présenter sous plusieurs formes, mais la diversité des lésions tissulaires et des maladies associées à cette pathologie rend difficile une classification basée sur les mécanismes pathologiques communs. Par contre une classification en fonction du site anatomique d'obstruction a permis de distinguer deux types de cholestase notamment la cholestase extrahépatique et la cholestase intrahépatique.

La cholestase extrahépatique se rapporte à une obstruction anatomique des canaux biliaires extrahépatiques et se caractérise par une stagnation de la bile dans les canaux biliaires situés en dehors du hile du foie. Les causes les plus fréquentes sont la lithiase et les cancers des canaux biliaires, du pancréas et du cholédoque. Par contre, la cholestase intrahépatique trouve son origine au niveau cellulaire et se rapporte soit à une obstruction ou une inflammation des conduits biliaires intrahépatiques, soit à un arrêt ou à une diminution de la sécrétion de la bile après anomalie de fonctionnement des hépatocytes (Zimmerman et Lewis, 1987). Elle démontre une très large étiologie dont les facteurs incluent des désordres génétiques (cholestase familiale progressive, cholestase familiale chronique bénigne, déficience en oxostéroïde-5- β -réductase...), la nutrition parentérale, les infections, la grossesse, des désordres immunologiques et des médicaments (Zimmerman, 1998; Lewis et Zimmerman, 1999). La littérature médicale rapporte un nombre sans cesse grandissant des cas de cholestase intrahépatique dus à l'utilisation de médicaments (Lewis, 2000; Chitturi et Farrell, 2001; Levy et Lindor, 2003).

3.2- Modèles expérimentaux et pathomécanismes généraux

Les études de la physiopathologie de la cholestase ont été facilitées par plusieurs modèles animaux présentant des lésions qui ressemblent au point de vue morphologique et fonctionnel à la cholestase humaine. La ligature du canal cholédoque reproduit la cholestase extrahépatique tandis que la cholestase intrahépatique est reproduite et par la modification des gènes codant pour les

transporteurs de phospholipides (Smitt et coll., 1993) ou d'acides biliaires (Wang et coll., 2001) au niveau de la membrane canaliculaire, et par l'administration d'une variété de substances exogènes et endogènes, incluant les œstrogènes, les acides biliaires, la phalloïdine, la chlorpromazine, l' α -naphthylisothiocyanate, la combinaison manganèse–bilirubine, etc... (Davis et coll., 1978; Kakis et Yousef, 1978; Samuels et Carey, 1978; Plaa et coll., 1982; Reichein et Simon, 1994; Chisholm et coll., 1999).

Le recours à ces modèles a permis une meilleure compréhension de la pathogenèse de la cholestase. Toutefois, les concepts relatifs à ce phénomène continuent d'évoluer à mesure que les techniques exploratoires se perfectionnent et que les mécanismes moléculaires de la formation de la bile s'éclairent. Les données disponibles à ce sujet montrent que la cholestase de type intrahépatique, qui fait l'objet de notre projet, est un syndrome de plusieurs étiologies relevant, non pas d'un seul mécanisme précis, mais de plusieurs interactions; les lésions peuvent être multiples. Des altérations peuvent se produire à différents et multiples points dans la séquence d'événements menant à la production de la bile.

Les altérations les plus communes aux différents modèles de cholestase intrahépatique sont rapportées au niveau du captage basolatéral et de l'excrétion canaliculaire des constituants de la bile. Ces altérations peuvent résulter soit de la diminution de l'expression ou de l'activité des transporteurs membranaires (Bohan et Bover, 2002; Shaffer, 2002; Elferink, 2003), soit de la modification de la

composition lipidique des membranes qui peut affecter leur intégrité fonctionnelle et celle des transporteurs (Hyogo et coll., 2001). Le phénotype de la maladie va dépendre du type de transporteur altéré (Kullak-Ublick et coll., 2000; Balistreri, 2002). D'autres altérations, souvent postulées pour rendre compte de la diminution du débit biliaire sont induites au niveau du transport transcellulaire, de l'activité de la voie vésiculaire, des jonctions serrées engendrant la dissipation du gradient osmotique via l'augmentation de la perméabilité paracellulaire, de l'activité des voies de signalisation intracellulaire qui coordonnent les fonctions cellulaires dans les lobules hépatiques via les jonctions gap et stimulent les contractions canaliculaires, et aussi au niveau des petits conduits interlobulaires (Sellinger et Boyer, 1990; Larkin, 1993; Boyer, 1996; Vore et Brouwer, 1998; Elferink, 2003). Il peut être mentionné que tous les facteurs impliqués dans la fonction exocrine du foie peuvent être affectés, mais le degré d'altération de certains facteurs peut varier entre les modèles cholestatiques (Bohan et Boyer, 2002).

3.3- Cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine

Witzleben a été l'un des premiers chercheurs à observer que l'administration intraveineuse de fortes doses de manganèse ou de bilirubine pouvait provoquer une diminution rapide et réversible du débit biliaire chez le rat (Witzleben et coll., 1968; Witzleben, 1969, 1971). Cette diminution était plus prononcée lorsque l'injection de bilirubine était précédée par celle du manganèse (Witzleben, 1971). Mais la manifestation d'une nécrose 12 heures suivant un

traitement avec le manganèse administré seul ou en combinaison avec la bilirubine, rend l'approche de Witzleben inappropriée pour l'étude de la cholestase.

Les effets de la combinaison manganèse-bilirubine sur la fonction exocrine et l'ultrastructure du foie ont été mieux caractérisés comme modèle expérimental de cholestase par l'approche de Plaa et ses associés. Ces chercheurs ont trouvé que le débit biliaire restait inchangé lorsque les rats étaient traités séparément avec des faibles doses de manganèse ou de bilirubine, mais diminuait uniquement lorsque l'injection d'une faible dose de manganèse était suivie par celle de bilirubine (de Lamirande et Plaa, 1978, 1979; Plaa et coll., 1982; Ayotte et Plaa, 1988; Plaa et coll., 1998). Les changements cytologiques associés à cette baisse du débit biliaire consistent en une dilatation des canalicules biliaires, une perte ou un gonflement des microvillosités et une prolifération de l'appareil de Golgi avec une absence totale de nécrose. Ces changements sont similaires à ceux observés chez l'humain en situation cholestatique (Plaa et Priestly, 1976) et cadrent avec des manifestations ultrastructurales rapportées chez certains modèles de cholestase intrahépatique (Bonvicini et coll., 1978; Kakis et Yousef., 1978).

Dans leur investigation, les équipes de Plaa et Witzleben ont trouvé des relations très étroites entre le manganèse et la bilirubine. Des études menées par ces deux équipes ont démontré qu'il existe un intervalle de temps critique au cours duquel l'injection de la bilirubine doit suivre celle du manganèse pour pouvoir déclencher la réponse cholestatique (de Lamirande et Plaa, 1978; 1979). Cet

intervalle est indépendant de la dose de bilirubine, mais influencé par la dose de manganèse.

À faible dose de manganèse, le temps d'attente requis avant de procéder à l'injection de la bilirubine doit être suffisamment court. Ce temps peut être plus long pour des fortes doses de manganèse (de Lamirande et Plaa, 1979). Une durée de 15 min a été estimée adéquate et nécessaire pour une dose de 4,5 mg Mn/kg chez le rat (de Lamirande et Plaa, 1979). Avec cette dose, si on attend plus longtemps avant d'administrer la bilirubine, la diminution du débit biliaire ne sera pas observée. À cet égard, il fut proposé qu'une étape intermédiaire serait requise entre l'administration du manganèse et l'interaction subséquente avec la bilirubine. Cette étape pourrait être la formation d'un produit réactif ou l'altération d'une composante ou d'une activité cellulaire.

L'action du manganèse dans l'événement requis pour induire la cholestase manganèse-bilirubine semble être du type "tout ou rien". En effet, la dose de manganèse doit se situer au-dessus d'une dose-seuil pour pouvoir agir et causer la chute du débit biliaire (de Lamirande et Plaa, 1978). Néanmoins, l'amplitude de cette chute, reflétant la sévérité de la cholestase, n'est pas influencée par la dose de manganèse, mais dépend largement de la dose de bilirubine (de Lamirande et Plaa, 1978).

Plusieurs composés dont la phalloïdine, la bromosulfophthaléine (BSP), la dibromosulfophthaléine (DBSP) et le vert d'indocyanine (VIC) ont été montrés de prévenir la réduction du débit biliaire découlant du traitement combiné manganèse-bilirubine lorsqu'ils sont administrés avant le manganèse, pour certains, ou entre le manganèse et la bilirubine pour d'autres (Witzleben et Boyce, 1975; de Lamirande et Plaa, 1979). Bien que DBSP offre une protection plus efficace, son analogue BSP a été plus intensément étudié. Ce composé produit son action protectrice sous sa forme libre, et non sa forme conjuguée, lorsqu'il est administré après le manganèse et avant la bilirubine (de Lamirande et Plaa, 1978). Cette protection est complètement indépendante de la dose de manganèse administrée. L'intervalle de temps entre l'injection de manganèse et celle de BSP ne semble pas aussi être un facteur important. Par contre, l'injection de BSP doit s'effectuer approximativement 10 min avant d'administrer la bilirubine pour obtenir une protection efficace. Le degré de protection est lié à la quantité de BSP non excrétée au temps d'injection de la bilirubine plutôt qu'à la dose de BSP administrée. Toutefois, il existe une dose de BSP en dessous de laquelle cette protection n'est pas observée.

Par ailleurs, une relation linéaire a été rapportée entre la dose minimale protectrice de BSP et la dose de bilirubine (Witzleben et Boyce, 1975; de Lamirande et Plaa, 1978). Une augmentation de la dose de bilirubine ou une diminution de la dose de BSP annule l'effet protecteur de BSP et restitue la cholestase manganèse-bilirubine. La clarification du mécanisme d'action de BSP

pourrait aider à mieux caractériser le processus pathogénique de cette cholestase. Les études antécédentes ont révélé que les événements critiques impliqués dans ce processus se produisent au niveau de l'hépatocyte (de Lamirande et Plaa, 1979; de Lamirande et coll., 1981; Plaa et coll., 1982; Ayotte et Plaa, 1986; Duguay et coll., 1998; Plaa et coll., 1998).

Actuellement, l'augmentation de la perméabilité paracellulaire et l'altération de l'intégrité structurale de la membrane canaliculaire sont les deux principaux désordres rapportés par des études traitant de l'étiologie de la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine et sont considérées comme des causes prédominantes de l'altération de la fonction exocrine du foie chez ce modèle cholestatique (de Lamirande et coll., 1981; Ayotte et Plaa, 1986; Dahlström-King et coll., 1990; Duguay et coll., 1998; Plaa et coll., 1998).

Ayotte et Plaa (1986) ont observé une diminution partielle de l'excrétion des acides biliaires après un traitement cholestatique Mn-BR, et ont suggéré que la diminution du débit biliaire associée à ce traitement serait reliée à une diminution du débit biliaire indépendant des acides biliaires et résulterait d'une résistance accrue de la membrane canaliculaire au passage de l'eau et des solutés originant de l'hépatocyte. Les études effectuées pour vérifier cette hypothèse ont démontré que le traitement Mn-BR altère la perméabilité de l'arbre biliaire aussi bien au niveau des membranes canaliculaires qu'au niveau des complexes jonctionnels.

En effet, en appliquant la technique de rétro-injection segmentée intrabiliaire (RISI) développée par Imamura et Fujimoto (1980), Ayotte et Plaa (1986) ont trouvé que le traitement combiné Mn-BR augmente la perméabilité de l'arbre biliaire tant pour le mannitol qui emprunte la voie transcellulaire lors de son transit de la bile au perfusé, que pour l'inuline qui passe par la voie paracellulaire (Imamura et Fujimoto, 1980). Dahlström-King et coll. (1991) ont confirmé ces résultats et ont démontré que l'importance de cette altération dépend de la dose de bilirubine administrée. L'effet protecteur de la BSP contre l'augmentation de la perméabilité au mannitol mais pas à l'inuline, observé au cours de ces études a permis aux auteurs de soutenir que l'altération de la perméabilité de la membrane canaliculaire est importante dans la séquence d'événements menant à la cholestase, et de déduire que l'augmentation de la perméabilité des complexes jonctionnels associée au traitement Mn-BR n'est pas liée au potentiel cholestatique de ce traitement.

En général, la reconnaissance d'une augmentation de la perméabilité des complexes jonctionnels comme une cause primaire plutôt qu'une conséquence de la cholestase est controversée. Cette controverse repose sur la dissociation temporelle de la perméabilité des complexes jonctionnels avec la baisse du débit biliaire chez certains modèles de cholestase (Jaeschke et coll., 1987). Un accroissement modéré de la perméabilité des jonctions n'apparaît pas perturber la formation de la bile dans tous les cas (Krell et coll., 1982; Jaeschke, 1990; Roberts et coll., 1993). De plus, il semble que la perméabilité paracellulaire soit affectée

différemment au cours des différentes formes de cholestase. Certains modèles de cholestase manifestent une diffusion paracellulaire plus importante pour des composés neutres plutôt que pour des solutés biliaires chargés (Iqbal et coll., 1985). Ces données remettent fortement en question l'initiation ou le développement de la cholestase intrahépatique via un reflux paracellulaire significatif. Par contre, l'altération de l'intégrité de la membrane canaliculaire est perçue comme un facteur important dans la pathogenèse de la cholestase intrahépatique, quel que soit le modèle étudié.

Il a été démontré que les membranes canaliculaires des rats soumis au traitement combiné manganèse-bilirubine peuvent perdre leur dynamique fonctionnelle et structurale suite à une incorporation significative de manganèse et de bilirubine (Ayotte et Plaa, 1985). Il est cependant ignoré si cette incorporation se fait sous la forme d'un complexe ou comme des entités séparées de manganèse et bilirubine. Néanmoins, la bilirubine est connue de former les complexes avec des ions divalents, incluant le manganèse (Witzleben, 1971; Allen et coll., 1981). Compte tenu de la grande affinité de la bilirubine pour les phospholipides (Crawford et Gollan, 1993), la formation d'un complexe manganèse-bilirubine pourrait faciliter l'insertion ou la rétention du manganèse dans les membranes canaliculaires. Bien qu'un tel événement soit en mesure d'affecter la structure des membranes canaliculaires et altérer leur caractéristiques physico-chimiques, l'accroissement de leur teneur en cholestérol induit par la combinaison manganèse-bilirubine est considéré comme la principale cause de

l'altération de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des membranes canaliculaires chez le modèle cholestatique manganèse-bilirubine (de Lamirande et coll., 1981; Plaa et coll., 1982; Duguay et coll., 1998; Plaa et coll., 1998).

Bien que l'altération des propriétés morphologiques et physiques des membranes hépatocytaires ait été associée à une désorganisation de leur composition phospholipidique dans certains modèles de cholestase (Davis et coll., 1978; Rosario et coll., 1988; Smitt et Gordon, 1988), la teneur totale en phospholipides dans les membranes canaliculaires n'est pas modifiée chez le modèle Mn-BR. Ceci n'exclut pas la possibilité d'une différence dans la proportion des différents phospholipides présents dans ces membranes, ce qui pourrait influencer leur fluidité. Duguay et collaborateurs (2000) ont d'ailleurs récemment observé une diminution de la fluidité des membranes canaliculaires après le traitement cholestatique Mn-BR. Pour le moment, cette diminution est attribuée à l'augmentation du ratio cholestérol/phospholipides. Ce paramètre corrèle avec l'apparition de la cholestase Mn-BR (Plaa et coll., 1982; Duguay et coll., 1998).

Des études antérieures ont démontré que la cholestase Mn-BR peut être plus sévère et plus longue si les animaux sont traités au préalable avec des solvants cétoniques comme le méthyl isobutyl cétone (MiBK) et ses métabolites 4-méthyl-2-pentanol (4MPOL) et 4-hydroxyméthyl isobutyl cétone (4OHMiBK) (Vézina et Plaa, 1988) ou avec des agents cétoènes c'est-à-dire biotransformés en cétones tels que le 1,3-butanediol, l'isopropanol ou le 2-butanol (de Lamirande

et coll., 1981; Plaa et Hewitt, 1982). Dans le cas de MiBK, ce composé aggrave la réduction du débit biliaire résultante de la combinaison Mn-BR et aussi celle associée au manganèse lorsque celui-ci est administré seul à des doses élevées (Vézina et Plaa, 1988). Le degré de potentialisation de cette réduction dépend de la dose de MiBK, de la voie d'exposition et du délai entre l'exposition au MiBK et le traitement Mn-BR. La potentialisation est plus importante si le délai est plus long et si l'exposition au MiBK est faite par inhalation.

Duguay et Plaa (1997) ont récemment trouvé que MiBK augmente l'incorporation du cholestérol dans les membranes canaliculaires uniquement lorsqu'il est utilisé à des doses potentialisatrices. Ils ont aussi trouvé que la contribution du cholestérol nouvellement synthétisé dans les membranes canaliculaires était plus importante chez les animaux préalablement traités au MiBK comparativement aux animaux soumis directement au traitement Mn-BR. Ces observations ont amené les auteurs à suggérer que MiBK pourrait potentialiser la cholestase Mn-BR en induisant les protéines cytosoliques impliquées dans le transport du cholestérol vers les membranes canaliculaires. Bien que le mécanisme d'action de MiBK demeure spéculatif, la démonstration d'une relation étroite entre son effet potentialisateur et le niveau de cholestérol dans les membranes canaliculaires, supporte que l'accumulation du cholestérol dans ces membranes soit un événement déterminant dans le développement de la cholestase Mn-BR.

C- OBJECTIF GÉNÉRAL

La modification de la composition lipidique des membranes canaliculaires reflétée par l'augmentation de leur teneur en cholestérol est de plus en plus reconnue comme un événement important dans la pathogenèse de la cholestase expérimentale. Notre objectif général vise à clarifier les bases physiologiques et métaboliques associées à ce phénomène chez le modèle cholestatique manganèse-bilirubine.

1- Problématique

Le cholestérol est connu comme un composant structural essentiel des membranes. Mais son apport excessif dans les membranes peut diminuer leur fluidité et altérer leur intégrité fonctionnelle. Au cours des dix dernières années, plusieurs modèles de cholestase ont été associés à une accumulation du cholestérol dans les membranes canaliculaires. Toutefois, le modèle manganèse-bilirubine est celui qui retient le plus notre attention car il fait intervenir deux produits dont l'effet cholestatique dépend du temps et de la séquence des injections. La modification d'un seul de ces facteurs annule la cholestase. Une meilleure connaissance de la pathogenèse de ce modèle cholestatique pourrait s'avérer utile pour le développement des méthodes de contrôle ou de traitement de certaines formes de cholestase observées chez des patients soumis à la polymédication. Bien que l'accumulation du cholestérol dans la membrane canaliculaire soit considérée comme un facteur important dans la pathogenèse de

la cholestase induite par le traitement combiné manganèse-bilirubine (de Lamirande et coll., 1981; Plaa et coll., 1982; Duguay et coll., 1998), la séquence d'événements menant à cette accumulation n'est pas encore connue, excepté que l'administration du manganèse, pour des raisons encore indéterminées, doit précéder l'injection de la bilirubine (Plaa et coll., 1982), et que la contribution du cholestérol nouvellement synthétisé est majoritaire (Duguay et coll., 1998; Plaa et coll., 1998). Une investigation récente sur les mécanismes impliqués dans ce désordre physiologique, a rapporté que le traitement combiné manganèse-bilirubine inhibe l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de la synthèse du cholestérol (Duguay et coll., 2000). La combinaison de ce résultat à d'autres données relatives au cholestérol dans ce modèle, rend difficile la conception d'une approche mécanistique basée sur le métabolisme du cholestérol.

2- Hypothèse

Les études antérieures traitant de l'étiologie de la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine ont révélé que les événements critiques menant à la cholestase se produisent dans l'hépatocyte et ont suggéré que ces événements résulteraient de l'action biochimique d'un éventuel complexe manganèse-bilirubine. À cet égard, il fut suggéré qu'une étape intermédiaire entre l'administration du manganèse et l'injection de la bilirubine serait requise pour induire la cholestase (de Lamirande et Plaa, 1979). À la lumière des connaissances actuelles, cette étape pourrait être la formation d'un produit réactif capable d'affecter les facteurs régulateurs de l'homéostasie du cholestérol dans le

foie. Mais l'augmentation considérable du cholestérol nouvellement synthétisé dans les différentes fractions souscellulaires hépatiques alors que l'activité de l'enzyme de synthèse n'est pas augmentée (Duguay et coll., 2000), laisse plutôt présager une synergie des effets que le manganèse et la bilirubine pourraient engendrer séparément dans les voies métaboliques du cholestérol. Toutefois notre hypothèse de base veut que l'augmentation du cholestérol nouvellement synthétisé soit une conséquence de l'inhibition de sa conversion en acide biliaire dans ce modèle cholestatique.

3- Plan du travail

Notre travail a consisté en deux étapes principales. La première étape était consacrée à la mise au point d'une méthode permettant une évaluation simultanée de la synthèse et de la dégradation du cholestérol dans le foie. Cette étape consistait à choisir les techniques d'analyse et à élaborer le procédé relatif au traitement de l'échantillon. Pour satisfaire simultanément les exigences de rapidité et fiabilité, nous avons opté pour une méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse en tandem via une interface électrospray, et avons recouru à l'extraction sur phase solide pour la purification des analytes.

Le volet expérimental proprement dit était abordé dans la deuxième étape du travail. Dans un premier temps, nous avons examiné la redistribution souscellulaire des protéines et lipides dans le foie pour nous rassurer que la membrane canaliculaire est le site d'action dans le modèle cholestatique

manganèse-bilirubine, et que l'incorporation du cholestérol dans ces membranes est l'événement modificateur de leurs propriétés physico-chimiques. Pour vérifier notre hypothèse de travail et déterminer la base métabolique associée à cette déchéance physiologique, nous avons examiné l'effet des deux composantes du modèle, notamment le manganèse et la bilirubine administrés seuls ou en combinaison, sur la synthèse et la dégradation du cholestérol. Cette série d'expérience était réalisée avec des rats car les résultats formant la base de notre hypothèse étaient antérieurement générés en utilisant cette espèce. La deuxième série d'expériences était effectuée avec les souris, tant normales que transgéniques. Ces expériences visaient à vérifier si le modèle cholestatique manganèse-bilirubine est reproductible chez la souris et à examiner le rôle de la protéine mdr2 dans la pathogenèse ou dans la prévention de la cholestase manganèse-bilirubine.

RÉSULTATS

ARTICLE 1

Titre: Simultaneous Evaluation of HMG-CoA Reductase and Cholesterol
7 α -Hydroxylase Activities by Electrospray Tandem Mass Spectrometry

Auteurs: Marie-Yvonne Ndong-Akoume ^{a,b}, Diane Mignault ^{a,b}, Shahid Perwaiz ^{a,b},
Gabriel L. Plaa ^a, and Ibrahim M. Yousef ^{a, b*}

^aDépartement de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Canada H3C
3J7, and ^bCentre de Recherche de l'hôpital sainte-Justine, Montréal, Canada H3T
1C5

Mots clés: HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase, CN cartridge,
Electrospray, Mass spectrometry

Publié dans: *Lipids*, 37 (11): 1101-1107 (2002)

ABSTRACT:

Simultaneous evaluation of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities by electrospray tandem mass spectrometry (ES/MS/MS) was performed. The assay was based on the measurement of mevalonolactone (MVL) and 7 α -hydroxycholesterol (7 α -OHC) produced by the incubation of HMG-CoA with hepatic microsomes in the presence of NADPH and glucose-6-phosphate dehydrogenase. Following extraction and purification using a cyanopropyl (CN) cartridge, MVL and 7 α -OHC were analyzed, without derivatization, by ES/MS/MS. The analysis was achieved in 5 min. Calibration curves were made for MVL and 7 α -OHC, and were linear from 1 to 100 μ g. The recovery was \geq 97 %. The procedure was validated under similar calibration and recovery experiments, by measuring the above mentioned products as dimethylsilyl ether derivatives using the classical technique of gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Data obtained by ES/MS/MS and GC/MS showed a good correlation, with no significant differences. In conclusion, the ES/MS/MS is a simple and reliable method for the evaluation of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities in liver microsomal preparations.

INTRODUCTION

Cholesterol homeostasis in the body is preserved mainly through the modulation of the activities of two enzymes located in the endoplasmic reticulum: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase), which catalyzes the formation of mevalonic acid (MVA) from HMG-CoA, considered as the rate-determining step in cholesterol synthesis (1), and cholesterol 7 α -hydroxylase, which catalyzes the rate-limiting step in the major pathway of degradation of cholesterol to bile acids (2).

In view of the critical role played by these enzymes in cholesterol metabolism, many efforts have been made to develop rapid and accurate methods for the simultaneous estimation of their activities. The measurement of the actual amount of MVL and 7 α -OHC enzymatically formed is considered to be a more accurate indication of the activities of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase, respectively (3). For this purpose, several approaches, direct and indirect, are available for measuring the mass of these products. These include double labeling techniques (4-6), ion-exchange column chromatography (7), paper chromatography (8), HPLC (9, 10) and GC-MS with selected ion monitoring (SIM) (3, 11-13). GC/MS is considered to be the best method because of its superior sensitivity and accuracy, but its use entails a laborious sample preparation and a long analytical process. Although the availability of electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS) offers opportunities to overcome these disadvantages, there has been no study using this technique to evaluate HMG-CoA reductase and

cholesterol 7 α -hydroxylase activities simultaneously. The purpose of the present work is to test this technique for this assay in rat liver microsomal preparations.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

NADPH, EDTA, mevalonic acid lactone, HMG-CoA, glucose-6-phosphate dehydrogenase (500 U / mL) and glucose-6-phosphate were purchased from Sigma Chemical Co., (St Louis, MO). 7 α -hydroxycholesterol (7 α -OHC) and 6 β -hydroxycholestanol (6 β -OHC) were available from Steraloids Inc., (Wilton, NH). Dimethylethylsilyl imidazole (DMESI) was obtained from Kogyo Inc., (Tokyo, Japan), and Bond Elut cyanopropyl (CN, 500 mg) from Varian (Harbor City, CA.). All other reagents and solvents were of analytical grade and used without further purification.

Preparation of internal standard for the MVL quantification

MVL (1 mg) was acetylated in 1 mL of a mixture of 7 mL glacial acetic acid, 5 mL acetic anhydride and 10 drops of perchloric acid 70 %. Following incubation at 37 °C for 60 min, 5 mL of water and 10 mL of diethyl ether were added and contents were mixed for 20 min. The ether layer was then transferred to other tubes and dried under nitrogen. The residue was redissolved in 1 mL methanol and stored at - 20 °C, then used as stock solution in the following analyses.

Preparation of liver microsomes

Liver microsomes were prepared at 4 °C as described previously (11). Briefly, rat livers were excised, washed in ice-cold normal saline solution, weighed

and placed into 3 mL of ice-cold 50 mM tris-HCl buffer (pH 7.4), containing 0.3 M sucrose, 10 mM DTT, 10 mM EDTA and 50 mM sodium fluoride. The livers were minced with scissors and homogenized in a Dounce homogenizer with a loosely fitting Teflon pestle. The homogenate (10 %) was centrifuged at 18, 000 x g for 20 min (SS-34 rotor, Sorval RC2-B refrigerated centrifuge) and the supernatant was centrifuged at 100, 000 x g for 60 min (50.2Ti rotor, Beckman L centrifuge). The resulting microsomal fraction was suspended in 3 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 mM EDTA and 5 mM DTT. Aliquots were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at - 80 °C to be used as the enzymatic and endogenous cholesterol sources. A small aliquot was used for protein determination according to Lowry et al (14).

Simultaneous assay of HMG-CoA reductase and 7 α -hydroxylase activities

A microsomal suspension of 500 μ L, containing 5 mg protein, was preincubated for 5 min at 37 °C with 450 μ L of 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA and 12 mM glucose-6-phosphate. The assay was initiated by adding 50 μ L of cofactor-substrate solution (0.1 mM HMG-CoA, 3 mM NADPH and 2 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase), and the incubation was performed for 30 min at 37 °C. Care was taken to avoid exposure to light to prevent cholesterol autoxidation. The incubation was terminated by the addition of 50 μ L of 1 M NaOH; 10 μ g each of acetylated-MVL and 6 β -OHC dissolved in methanol were added as internal standards. The sample was applied to the CN cartridge (preconditioned by successive elution with 2 mL each of hexane,

methanol and distilled water) and washed with 4 mL of acetonitrile-water (2:3, v/v) to extract MVA. After removing cholesterol with 4 mL of hexane, 7 α -OHC was eluted with 4 mL of methanol.

The fraction containing MVA was acidified to pH 1 with 0.6 N HCl to promote the generation of MVL. Following incubation at 37 °C for 60 min, the suspension was applied to a CN cartridge (cleaned in advance with 2 mL each of hexane, methanol and distilled water, successively) and MVL was eluted with 4 mL of acetonitrile.

Both eluate fractions were mixed and divided into two portions. One portion was used for ES-MS-MS analysis and the other for the GC-MS analysis.

Analysis by ES-MS-MS

The eluate mixture was evaporated under nitrogen and the residue was analyzed by the ES-MS-MS after reconstitution in 100 μ L of methanol.

The ES-MS-MS system consisted of Hewlett-Packard model HP1100 liquid chromatograph (HPLC) connected to a Quattro II electrospray tandem mass spectrometer (ES-MS-MS), obtained from Micromass, Manchester, U.K. The HPLC system was operated isocratically without column at a 10 μ L/min flow rate for a mobile phase (acetonitrile-water, 1:1), at room temperature. Sample (10 μ L) was injected in the ES-MS-MS by the automatic injector. Liquid nitrogen was used as nebulizer, and argon was used as collision gas. Cone voltage was set at 25 volts. Positive ion mass spectra of the eluents were recorded using the selective ion

recording mode. Quantification of MVL and 7 α -OHC was carried out using Micromass Mass Lynx 2.22 software by determining the peak area ratios of each compound with its internal standard. The enzymatic activities expressed as pmol/min/mg of protein, were calculated by subtracting the amount present at zero time from that at the end of the incubation. Zero time was realized using microsomes previously inactivated with 1 M NaOH.

Analysis by GC-MS

After evaporation of eluate mixture (MVL and 7 α -OHC) under nitrogen, the products were converted to dimethylsilyl (DMES) ether by treatment with 50 μ L pyridine-DMESI (10:2, vol/vol) at 80 °C for 60 min. The residue was dissolved in 100 μ L of chloroform.

GC-MS analysis was performed on an Hewlett Packard 5890 series II gas chromatograph equipped with HP-5 MS capillary column and connected to a HP 5971A mass spectrometer. Helium was used as the carrier gas. The column was maintained at 100 °C for 2 minutes, then programmed from 100 to 160 °C at 10 °C/min and from 160 to 280 °C at 20 °C /min. The column temperature was kept at 280 °C for 5 minutes. The MS transfer line was maintained at 280 °C while the injection port was at 250 °C. 2 μ L were injected manually and the selected-ion monitoring mode was used for quantitative determination.

Assay validation

The assay was validated with calibration standards prepared by adding a constant amount (10 µg) of acetylated-MVL or 6β-OHC as internal standards, to a series of tubes containing varied amounts (1-100 µg) of MVL or 7α-OHC, respectively. The content of each tube was subjected to the same procedure as microsomal preparations and analyzed by ES-MS-MS or GC-MS. A linear regression line was fitted over the concentration range for both assays. Reproducibility of the assay was investigated into five samples processed each in triplicate, while the recovery study was carried out by adding 15, 30 or 60 µg of MVL and 7α-OHC to duplicate samples of 500 µL of the microsomal suspension. Recoveries were calculated using the following equation: Recovery = [(amount found – basic amount) / amount added] X 100.

Statistical analysis

The statistical significance of differences between the ES-MS-MS and GC-MS methods was evaluated by a Student's t-test, and statistical significance was accepted at the level of $p < 0.05$.

RESULTS

ES-MS-MS analysis

Figure 1 shows the mass spectra of MVL, acetylated-MVL, 7 α -OHC and 6 β -OHC obtained in positive mode. MVL gave a high-abundance fragment ion at m/z 131, which corresponded to the peak of its protonated molecule. The molecular ions of acetylated-MVL, 7 α -OHC and 6 β -OHC were not observed. However, a high-abundance fragment ion, which is formed by the loss of 2H₂O from each molecule, was detected at m/z 138.9, 367 and 369 for acetylated-MVL, 7 α -OHC and 6 β -OHC, respectively.

GC/MS analysis

The DMES ether derivatives of MVL and its internal standard, produced symmetrical peaks with elution times of 5.27 and 7.51 min, respectively (FIG. 2A). The DMES ether derivative of 7 α -OHC eluted from the gas chromatography column at 11.14 min, while the DMES ether derivative of its internal standard appeared at 12.34 min (FIG. 2B). Figure 3 shows the mass spectra of DMES ether derivatives obtained in the electron ionization mode. The fragment ions of [M - 71]⁺ produced at m/z 145 for MVL, [M - 146]⁺ at m/z 202 for acetylated-MVL, [M - 104]⁺ at m/z 470 for 7 α -OHC and [M - 104]⁺ at m/z 472 for 6 β -OHC, had the highest abundances and were selected for ion monitoring analysis.

Linearity, precision and accuracy of the assay

The assay was validated over the range 1-100 µg. Representative calibration curves for MVL and 7α-OHC generated by ES-MS-MS are shown in figure 4. TABLE 1 lists parameters for calibration curves obtained by ES-MS-MS and GC-MS. The correlation coefficients were ≥ 0.97 for all curves.

The precision and accuracy were checked by calculating the intra-assay variation into five different samples processed in triplicate. As shown in TABLE 2, the CV for each sample was less than 1 %. The recoveries of MVL and 7α-OHC determined at three different levels, varied from 97 to 100 % (TABLE 3). There was no significant difference between data obtained using ES-MS-MS or GC/MS analytical technique.

DISCUSSION

The high incidence of diseases associated with the increased levels of cholesterol in plasma and liver continually stimulates the interest in development of rapid and sensitive methods for the determination of the activities of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase, two key enzymes in the synthesis and degradation pathways of cholesterol (1, 2). Because of the high sensitivity and accuracy of GC-MS, it is widely used in the evaluation of activities of these enzymes in vitro. In this method, the mass of MVL and 7 α -OHC formed is determined. However, this method has the drawback of being labor-intensive and slow. In the method described here, we demonstrated that the use of ES-MS-MS offers the opportunity to overcome these disadvantages. Indeed, the use of ES-MS-MS does not require preliminary derivatization procedures and takes only 5 min for analysis. Compounds are identified by their molecular mass and their characteristic fragmentations. The fragment ions at m/z 131 and 367.7 were selected to identify MVL and 7 α -OHC, respectively. Quantitative determination of these compounds requires the addition of internal standards. Deuterated-MVL (3) and 6 β -OHC (15) have been reported to be suitable internal standards for MVL and 7 α -OHC, respectively. However, since deuterated-MVL is not commercially available and is difficult to synthesize, we made an alternative internal standard, acetylated-MVL. This compound was not present in the microsomal preparation and was separated clearly from MVL by GC, suggesting that it could be a suitable internal standard. In addition, the fragment ions at m/z 131 for MVL and 138.9 for

acetylated-MVL, selected for the ES-MS-MS analysis, were detected with the same degree of sensitivity. The validity of this approach was achieved by comparing the results obtained by the ES-MS-MS with those obtained by the more traditional technique GC-MS, using similar conditions. No significant differences were noted. In addition, the values obtained were in agreement with the values reported by other investigators (16-23). The internal standard described is another advantage since it could be prepared easily and was found to be stable during storage and sample preparation.

We have also simplified the solid-phase extraction procedure used for the simultaneous extraction and purification of 7 α -OHC and MVL, by reducing the number of different Bond Elut cartridges used. We have used only CN cartridges to extract and purify these two reaction products. Del Puppo et al (24) found that the lactone was more readily extracted and purified than the free acid. However, the lactonization of MVA requires the use of a strong monobasic mineral acid such as hydrochloric acid, but cholesterol oxidation products are sensitive to acids (25). It was therefore necessary to separate MVA from 7 α -OHC prior to lactonization. For this procedure, it was necessary to demonstrate that significant quantities of MVL or 7 α -OHC are not lost during sample preparation, and the preparation leads to adequate recovery of these products. These two aspects were examined by adding MVL or 7 α -OHC directly to a fraction of microsomal suspension. Extraction and purification were then carried out as described. An adequate separation of MVA and 7 α -OHC was achieved on the CN cartridges. With the purification conditions chosen, excellent recoveries of 7 α -OHC and the lactone form of MVA, were

obtained. The use of Bond Elut CN cartridges to perform the extraction and purification simultaneously simplified greatly the pre-analytic preparation of samples and offered greater potential for automation.

The approach described here has significant advantages over other procedures used for the evaluation of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities in liver microsomal preparations. First, the sample preparation time is dramatically reduced and no derivatization steps are required. Second, the data acquisition time is also considerably reduced when the analysis is processed by ES-MS-MS. In conclusion, we have developed a simple, rapid and accurate method for the simultaneous evaluation of the activities of hepatic microsomal HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase, using the ES-MS-MS technique, a new internal standard and a simple pre-analytic procedure.

ACKNOWLEDGMENTS:

This work was supported by a grant from the Canada Institute of Health Research and the Canadian Liver Foundation. Marie-Yvonne Ndong-Akoume holds a Studentship from the Republic of Gabon.

REFERENCES

1. Rodwell, V. W., Nordstrom, J. L., and Mitschelen, J. J. (1976) Regulation of HMG-CoA reductase, *J. Lipid. Res.* 14, 1-74.
2. Myant, N. B., and Mitropoulos, K. A. (1977) Cholesterol 7 α -hydroxylase, *J. Lipid. Res.* 18, 135-153.
3. Galli Kienle, G., Galli, G., Bosisio, E., Cighetti, G., and Paoletti, R. (1984) Evaluation of enzyme activities by gas chromatography-mass spectrometry: HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase, *J. Chromatogr.* 289, 267-276.
4. Kekki, M., Miettinen, T. A., and Wahlstrom, B. (1977) Measurement of cholesterol synthesis in kinetically defined pools using fecal steroid analysis and double labeling technique in man, *J. Lipid. Res.* 18 (1), 99-114.
5. Mitropoulos, K. A., and Balasubramaniam, S. (1972) Cholesterol 7 α -hydroxylase in rat liver microsomal preparations, *Biochem. J.* 128, 1-9.
6. Einarsson, K., Angelin, B., Ewerth, S., Nilzell, K., and Bjorkhem, I. (1986) Bile acid synthesis in man: assay of hepatic microsomal cholesterol 7 α -hydroxylase activity by isotope dilution-mass spectrometry, *J. Lipid. Res.* 27, 82-8.
7. Ong, K. K., Khor, H. T., and Tan, D. T. (1991) Assay of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity using anionic exchange column chromatography, *Anal. Biochem.* 196, (2), 211-4.
8. Shapiro, D. J., Imblum, R. L., and Rodwell, V. W. (1969) Thin-layer chromatographic assay for HMG-CoA reductase and mevalonic acid, *Anal.*

Biochem. 31, 383-390.

9. Guchhait, R. B., and Porter J. W. (1966) A gas liquid chromatographic method of assay for mevalonic acid, *Anal. Biochem.* 15, 509-16.
10. Ogishima, T., and Okuda, K. (1986) An improved method for assay of cholesterol 7- α -hydroxylase activity, *Anal. Biochem.* 158 (1), 228-32.
11. Honda, A., Shoda, J., Tanaka, N., Matsuzaki, Y., and Osuga, T. (1991) Simultaneous assay of the activities of the key enzymes in the cholesterol metabolism by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr.* 565, 53-66.
12. Bjökchem, I., and Danielsson, H. (1974) Assay of liver microsomal cholesterol 7 α -hydroxylase using deuterated carrier and gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 59, 508-516.
13. Sanghvi, A., Grassi, E., Bartman, C., Lester, R., Galli Kienle, M., and Galli, G. (1981) Measurement of cholesterol 7 α -hydroxylase activity with selected ion monitoring, *J. Lipid. Res.* 22, 720-724.
14. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265.
15. Hahn C., Reichel, C., and Bergmann, K. V. (1995) Serum concentration of 7 α -hydroxycholesterol as an indicator of bile acid synthesis in humans, *J. Lipid. Res.* 36, 2059-2066.
16. Brown, M. S., Goldstein, J. L., and Dietschy, J. M. (1979) Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver of the rat, *J. Biol. Chem.* 254, 5144-5149.

17. Hunter, C. F., and Rodwell, V. W. (1980) Regulation of vertebrate liver HMG-CoA reductase via reversible modulation of catalytical activity, *J. Lipid. Res.* 21, 399-405
18. Makino, I., Chijiwa, K., Fukushima, K., Kameoka, N., Komura, M., Kuroki, S., Yamashita, H., and Tanaka, M. (1997) Cholesterol and bile acid metabolism after selected portal vein ligation, *J. Surg. Res.* 68, 91-98.
19. Rudling, M., Parini, P., and Angelin, B. (1997) Growth hormone and bile acid synthesis: key role for the activity of hepatic microsomal cholesterol 7 α -hydroxylase in the rat, *J. Clin. Invest.* 99, 2239-2245.
20. Parini, P., Angelin, B., and Rudling, M. (1998) Cholesterol and lipoprotein metabolism in aging: reversal of hypercholesterolemia by growth hormone treatment in old rats, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 832-839.
21. Duguay, A. B., Yousef, I. M., and Plaa, G. L. (2000) Manganese-bilirubin effect on cholesterol accumulation in rat bile canalicular membranes, *Toxicol. Sci.* 53, 150-155.
22. Post, S. M., de Wit, E. C. M., and Princen, H. M. G. (1997) Cafestol, the cholesterol-raising factor in boiled coffee suppresses bile acid synthesis by down regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase in rat hepatocytes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 3064-3070.
23. Koopen, N. R., Post, S. M., Wolters, H., Havinga, R., Stellaard, F., Boverhof, R., Kuipers, F., and Princen, H. M. G. (1999) Differential effects of 7-ethinylestradiol on the neutral and acidic pathways of bile salts synthesis in the rat, *J. Lipid. Res.* 40, 100-108.

24. Del Puppo, M., Cighetti, M., Galli Kienle, G., and de Angelis, L. (1989) Measurement of mevalonate in human plasma and urine by multiple selected ion monitoring, *Biomed. Environ. Mass. Spectrom.* 18, 174-176.
25. Dzeletovis, S., Breuer, O., Lund, E., and Diczfalusy, U. (1995) Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 225, 73-80.

TABLE 1

Parameters for calibration curves generated by electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS) and GC-MS

Methods	Analytes	Correlation coefficients	Calibration curve equation
ES-MS-MS	MVL	0.98	$Y = 0.190458 X$
	Acetylated-MVL		
	7 α -OH-C	0.97	$Y = 0.008223 X$
	6 β -OH-C		
GC-MS	MVL	0.99	$Y = 0.085332 X$
	Acetylated-MVL		
	7 α -OH-C	0.98	$Y = 0.008135X$
	6 β -OH-C		

Calibration curves were obtained by adding a constant amount (10 μ g) of acetylated mévalonolactone (MVL) or 6 β -hydroxycholesterol (6 β -OHC) as internal standards, to a series of tubes containing varied amounts (1-100 μ g) of MVL or 7 α -hydroxycholesterol (7 α -OHC), respectively. The contents of each tube were submitted to the same procedure as the microsomes.

TABLE 2

Reproducibilities of HMG-CoA reductase and 7 α -hydroxylase activities in the rat liver microsomes

		HMG-CoA reductase		7 α -Hydroxylase	
		Activity		Activity	
		(μ mol/min/mg	CV	(μ mol/min/mg	CV
Methods	Samples	protein)	(%)	protein)	(%)
ES-MS-MS	A	141.73 \pm 0.25	0.17	33.00 \pm 0.08	0.24
	B	131.01 \pm 0.10	0.08	27.74 \pm 0.06	0.21
	C	133.90 \pm 0.06	0.07	31.05 \pm 0.12	0.35
	D	136.52 \pm 0.27	0.19	30.00 \pm 0.10	0.33
	E	142.32 \pm 0.10	0.04	36.38 \pm 0.15	0.41
GC-MS	A	140.43 \pm 0.24	0.17	31.69 \pm 0.02	0.06
	B	134.18 \pm 0.09	0.06	27.24 \pm 0.16	0.58
	C	134.25 \pm 0.06	0.04	32.50 \pm 0.11	0.33
	D	137.44 \pm 0.16	0.11	31.66 \pm 0.10	0.31
	E	141.57 \pm 0.06	0.04	36.14 \pm 0.19	0.52

Each sample was processed in triplicate. C.V. is the intra-assay coefficient of variation and was calculated using the following formula: C.V. = (Standard deviation / mean) X 100.

TABLE 3

Recovery of mevalonolactone and 7 α -hydroxycholesterol from microsomes analyzed by ES-MS-MS and GC-MS

Methods	Amount Added (μ g)	MVL		7 α -OHC	
		Amount found (μ g)	Recoveries (%)	Amount found (μ g)	Recoveries (%)
		ES-MS-MS	0	10.72 \pm 0.03	
	15	25.42 \pm 0.18	98.30 \pm 1.17	22.06 \pm 0.12	98.83 \pm 0.93
	30	40.28 \pm 0.36	98.43 \pm 1.07	36.89 \pm 0.18	98.84 \pm 0.42
	60	69.86 \pm 0.26	98.59 \pm 0.47	65.85 \pm 0.54	97.69 \pm 0.84
GC-MS	0	10.72 \pm 0.07		7.23 \pm 0.03	
	15	25.58 \pm 0.17	99.04 \pm 1.04	21.97 \pm 0.01	98.25 \pm 0.34
	30	40.20 \pm 0.33	98.25 \pm 1.07	37.23 \pm 0.34	100 \pm 1.11
	60	70.15 \pm 0.06	99.06 \pm 0.47	66.19 \pm 0.38	98.27 \pm 0.62

Values are mean \pm S.D (n = 3), and represent the recovery of different amounts of MVL and 7 α -OHC added to aliquots of 500 μ L of the microsomal suspension, containing 5 mg of protein. The assay recovery at each amount was calculated using the following equation: Recovery = 100 X (amount found - basic amount) / amount added. For abbreviations see TABLE 1.

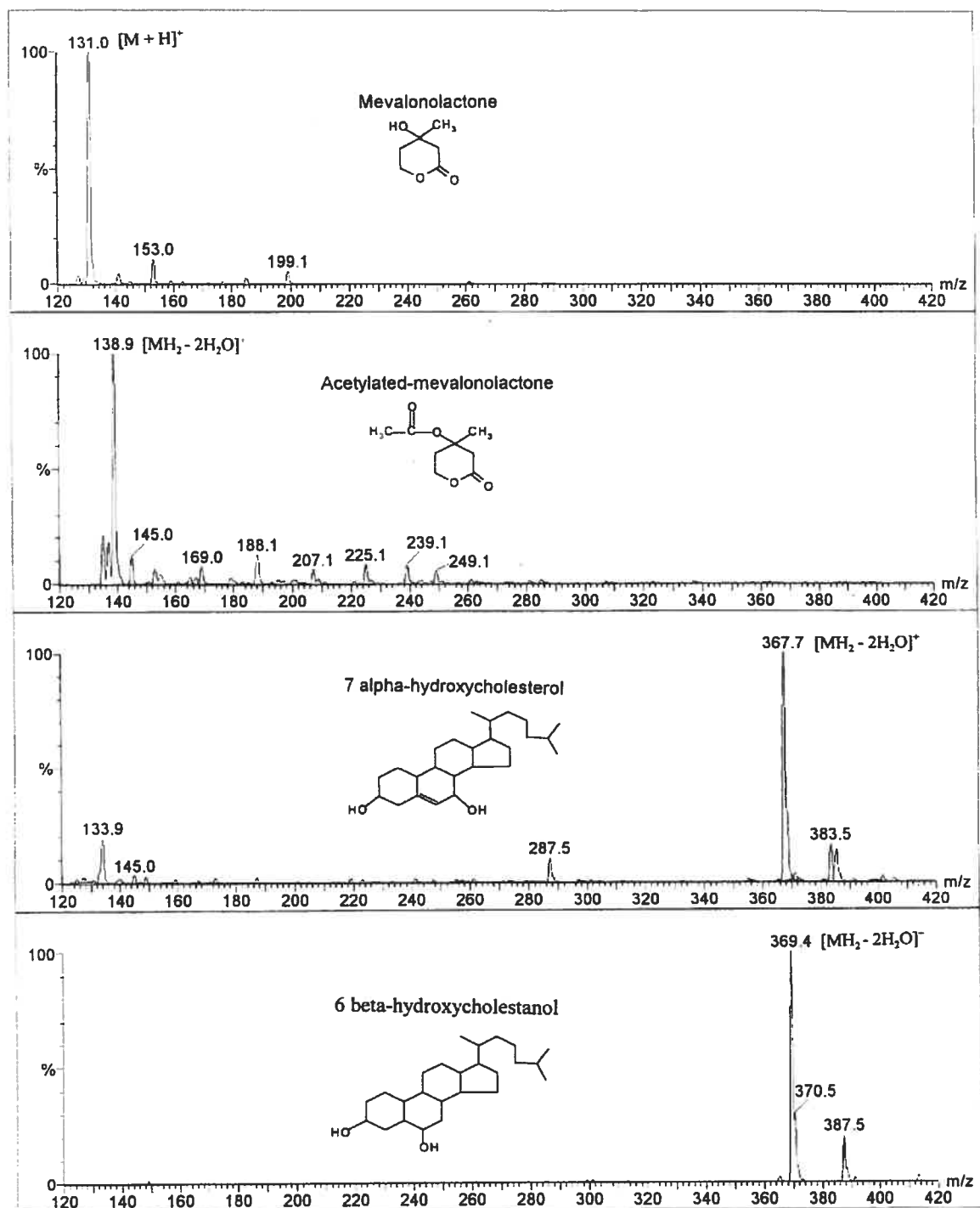


FIG. 1. Positive ion electrospray mass spectra of mevalonolactone, acetylated-mevalonolactone, 7 α -hydroxycholesterol and 6 β -hydroxycholestanol. Electrospray tandem MS conditions were as described in the materials and methods section.

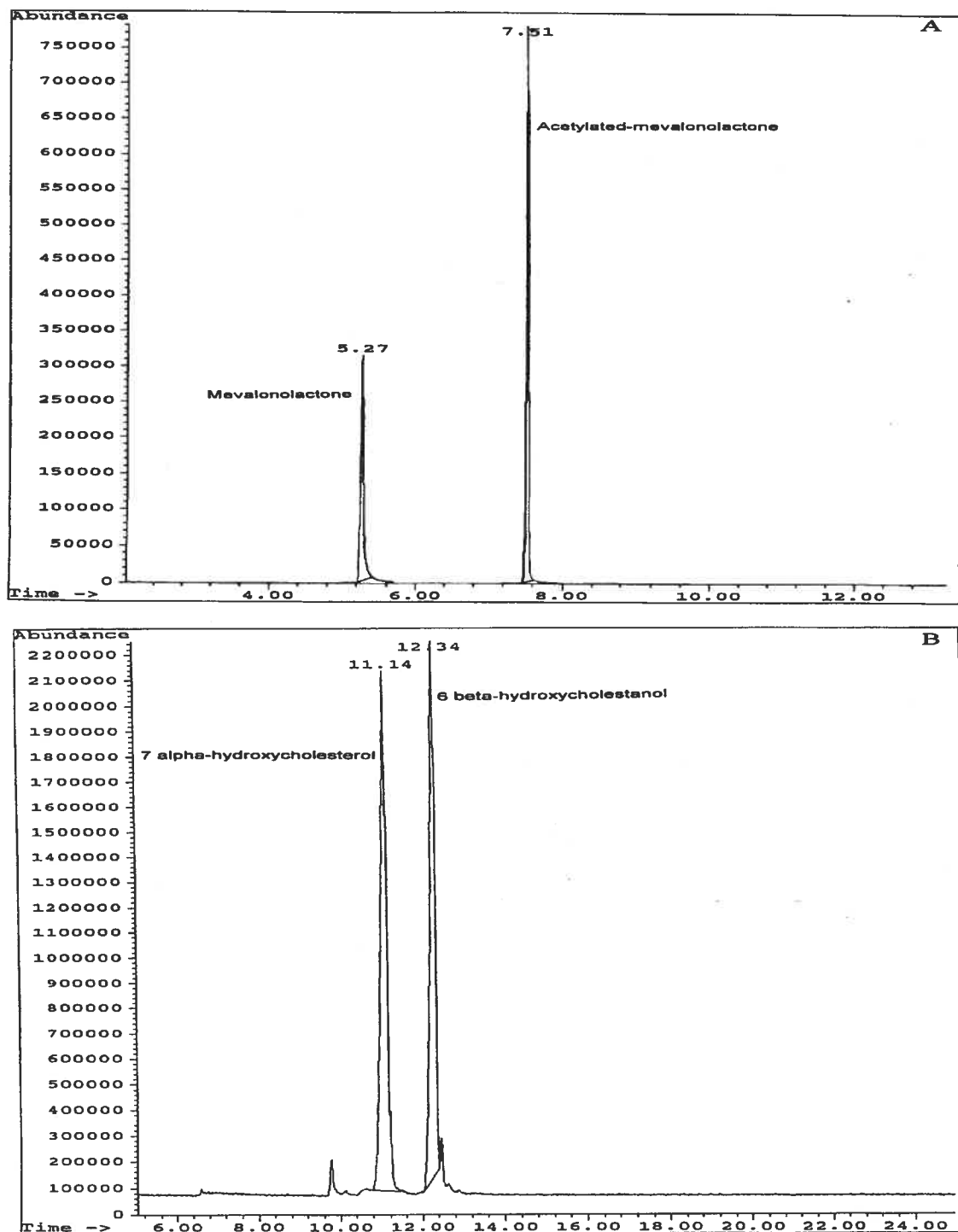


FIG. 2. Representative GC-MS chromatograms of the mixture of (A) mevalonolactone and its internal standard, acetylated-mevalonolactone, and (B) 7 α -hydroxycholesterol and 6 β -hydroxycholestanol, used as internal standard. See in the materials and methods section for derivatization and GC-MS conditions.

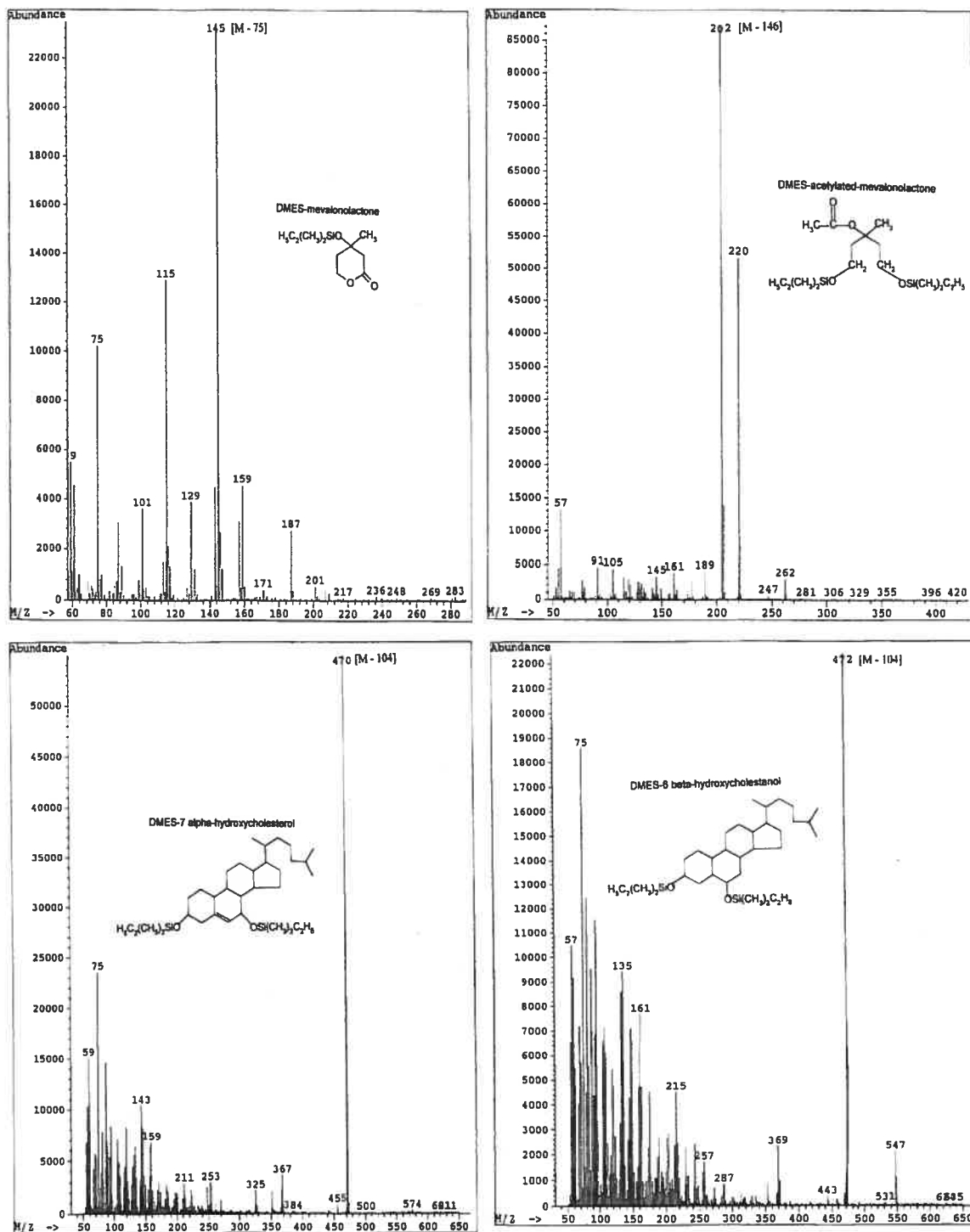


FIG. 3. Electron impact mass spectra of the DMES ether derivatives of (A) mevalonolactone, (B) acetylated-mevalonolactone, (C) 7 α -hydroxycholesterol and (D) 6 β -hydroxycholesterol, obtained by GC/MS analysis in conditions given in the materials and methods section

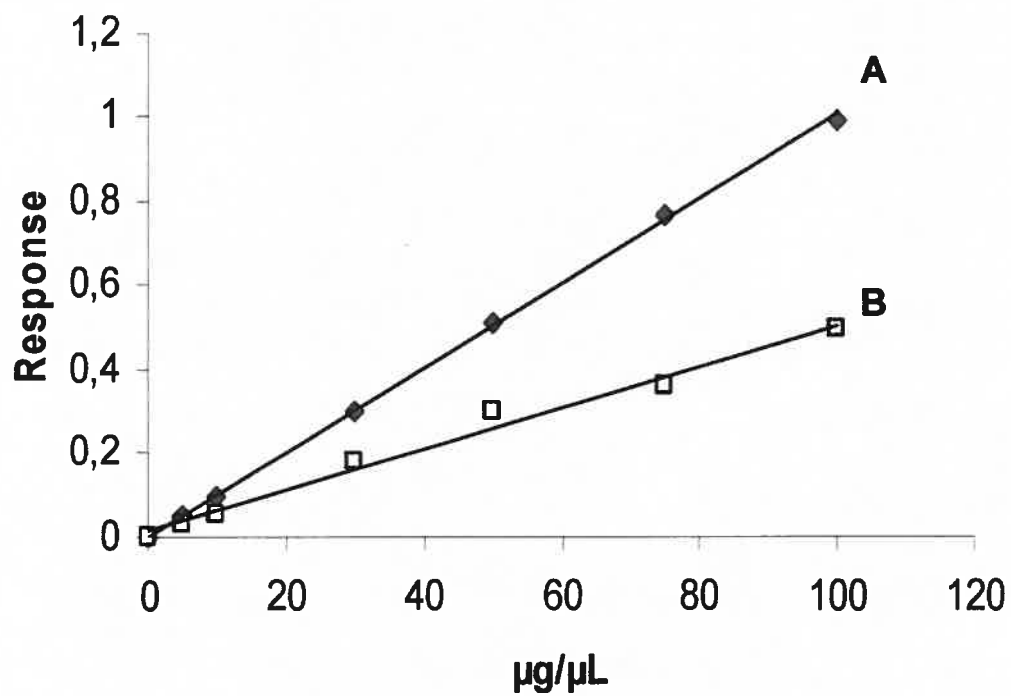


FIG. 4. Calibration curves for (A) mevalonolactone and (B) 7 α -hydroxycholesterol obtained by linear regression analysis of the peak-area ratios of the compound to the internal standard vs. the concentrations of the compound ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Calibration standards were prepared as described in the materials and methods section.

ARTICLE 2

Titre: Synergistic Role of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase and Cholesterol 7 α -Hydroxylase in the Pathogenesis of Manganese-Bilirubin-Induced Cholestasis in Rats

Auteurs: Marie-Yvonne Akoume^{*†}, Shahid Perwaiz^{*†}, Ibrahim M. Yousef^{*†,1}, and Gabriel L. Plaa^{*}

^{*}Département de Pharmacologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Mots clés: Cholesterol, phospholipid, cholate, canalicular membrane, HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase

Publié dans: *Toxicological sciences*, 73: 378-385 (2003)

ABSTRACT

Manganese (Mn) and bilirubin (BR) induce intrahepatic cholestasis when injected sequentially. It was suggested that accumulation of newly synthesized cholesterol in the canalicular membrane is an initial step in the development of cholestasis. To clarify the involvement of cholesterol in the pathogenesis of Mn-BR-induced cholestasis, we examined biliary secretion and liver subcellular distribution of lipids in the cholestatic conditions (Mn-BR combination). We also examined hepatic metabolism of cholesterol under cholestatic and noncholestatic (Mn or BR given alone) conditions. The Mn-BR combination reduced bile flow by 50%, and bile acid, phospholipids and cholesterol output by 42, 75 and 90%, respectively. There was a dramatic impairment of cholate excretion but not chenodeoxycholate excretion. Phosphatidylcholine species secreted into bile were unchanged, and microsomal total phospholipid content was significantly increased. Although there were no changes in liver membrane phospholipid content, the cholesterol/phospholipids ratio was increased by more than 50% in the canalicular fraction. Despite the increased concentration of cholesterol in the canalicular membrane, the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, key enzyme in cholesterol synthesis, and cholesterol 7 α -hydroxylase, key enzyme in cholesterol conversion to bile acids, were significantly reduced. However, the injection of Mn alone significantly increased both enzymes, while BR alone inhibited cholesterol 7 α -hydroxylase by 62%, without affecting HMG-CoA reductase. In conclusion, the critical cholestatic events in Mn-BR-induced

cholestasis appear to be mediated through the synergistic effects of Mn and BR acting on synthesis and degradation of cholesterol.

INTRODUCTION

Intrahepatic cholestasis is defined as a disturbance of bile secretion without anatomic obstruction (Feur and Difonzo, 1992). This situation results most often as an adverse consequence of drug therapy (Chan et al., 1998; Plaa and Priestly, 1976; Stieger et al., 2000). However, the pathologic mechanisms underlying cholestatic liver disease in patients remain uncertain. Several hypotheses have emerged from various laboratory models as possible mechanisms leading to intrahepatic cholestasis. Among these hypothesis is the accumualation of cholesterol in the canalicular membrane (BCM) (Duguay et al., 1998, 2000; Yeagle, 1991; Yousef et al., 1988). Such accumulation of cholesterol in BCM was suggested to result in disappearance of microvilli and disorganization of the canalicular lumen (Yousef et al., 1984), leading to failure of bile secretion and impairment of bile flow. The biochemical and morphologic changes occur in various experimental models of intrahepatic cholestasis such as cholestasis induced by lithocholic acid (Kakis and Yousef, 1978), ethinylestradiol (Simon et al., 1980), and manganese-bilirubin combination (Plaa et al., 1982).

In general, cholesterol synthesis and conversion of cholesterol into bile acids represent key metabolic response to conserve hepatic cholesterol at normal physiologic levels (Kuipers et al., 1996). Cholesterol homeostasis is preserved mainly through the modulation of the activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase (Rodwell et al., 1976) and cholesterol 7 α -hydroxylase (Myant and Mitropoulos, 1977), two key enzymes involved in

synthesis and degradation of cholesterol, respectively. Although the increase in hepatic cholesterol synthesis and accumulation of newly synthesized cholesterol in the canalicular membrane was reported in Mn-BR induced cholestasis, the activity of HMG-CoA reductase was markedly suppressed (Duguay et al., 2000).

The aim of the present study was to clarify the metabolic basis associated with the accumulation of newly synthesized cholesterol in the canalicular membrane in this cholestatic model.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Monohydrated manganese sulphate ($\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$), bilirubin (BR), urethane, mevalonic acid lactone, HMG-CoA, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), dithiotreitol (DTT), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form, NADPH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (500 U/1 mL) and glucose-6-phosphate were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). 7α -hydroxycholesterol and 6β -hydroxycholestanol were available from Steraloids Inc. (Wilton, NH). Dimethylethylimidazol was procured from Kogyo Inc. (Tokyo, Japan) and Bond Elut cyanopropyl (CN, 500 mg) from Varian (Harbor City, CA). All other reagents and solvents were of analytical grade.

Animals and experimental protocol

Male Sprague-Dawley rats (200 – 250g) were purchased from Charles River Inc (St-Constant, Québec, Canada) and were kept in animal facilities and maintained on Charles River rat chow and water ad libitum for three days prior to their use in the experiments. Animals were anaesthetized with urethane (1 g/kg ip). After opening the abdomen, the bile duct was cannulated with polyethylene tubing (PE-10) to allow sampling of bile. Bile was collected in 15-min intervals into pre-weighed tubes for 120 min, and volumes were determined assuming $1\ \mu\text{L} = 1\ \mu\text{g}$. Body temperature was maintained during the experiment at $37\ ^\circ\text{C}$ using a rectal probe and a thermostatically controlled infrared lamp. Through catheters (PE-10)

placed in the femoral vein, animals received freshly prepared aqueous solutions of Mn and BR. $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ was dissolved in saline (0.9 %, NaCl) and injected as a single dose of 4.5 mg / kg in 1 min. BR was dissolved in the BR-buffer (0.52 g NaCl and 0.52 g Na_2CO_3 per 100 mL) and injected as a single dose of 25 mg/kg in 2 min. To induce cholestasis, both Mn and BR were administered; Mn was given 15 min before BR; the maximum reduction in bile flow was obtained 30 min after BR administration (45 min after Mn injection). At this moment, livers were removed to prepare subcellular fractions.

To investigate hepatic cholesterol metabolism, livers were removed in six different experimental situations: (1) treatment with Mn and BR vehicles (control); (2) 15 min after Mn injection (Mn-15); (3) 45 min after Mn injection (Mn-45); (4) 30 min after BR injection (BR-30); (5) 15 min after sequential compound treatment of Mn and BR (Mn-BR-15); (6) 30 min after sequential compound treatment of Mn and BR (Mn-BR-30). In each situation, the enterohepatic circulation was interrupted 2 h prior to treatment by cannulating the bile duct with polyethylene tubing (PE-10) and connecting it to a bile collector.

Preparation of subcellular organelles from rat liver

Separation of basolateral and canalicular membranes and isolation of subcellular organelles such as microsomes, mitochondria, Golgi complexes, lysosomes, nuclear fraction and cytosol, as well as assessment of the purity of these fractions, were performed as previously described (de Lamirande et al., 1981; Duguay et al., 1998; Yousef and Tuchweber, 1984). Liver microsomes,

which are used to investigate cholesterol metabolism, were prepared as previously described (Yamashita et al., 1989). Briefly, liver was homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), containing 0.3 M sucrose, 10 mM DTT, 10 mM EDTA and 50 mM sodium fluoride. The homogenate was centrifuged at 20,000 X g for 15 min, and the supernatant was centrifuged at 100,000 X g for 60 min. The resulting microsomal fraction was suspended in 3 mL of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 mM EDTA and 5 mM DTT. Aliquots were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

Analysis of protein

Protein determination was performed according to the method of Lowry (Lowry et al., 1951), using bovine serum albumin as the standard.

Assay of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities

Microsomal suspensions of 500 μ L, containing 5 mg protein, were pre-incubated for 5 min at 37 °C with 450 μ L of 0.1 M potassium phosphate buffer (PH 7.4), containing 1 mM EDTA and 12 mM glucose-6-phosphate. The assay was initiated by adding 50 μ L of cofactor-substrate solution (0.1 mM HMG-CoA, 3 mM NADPH and 2U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase). The incubation was performed at 37 °C for 30 min and was terminated by the addition of 50 μ L of 1 M NaOH. Purification of reaction products (mevalonolactone and 7 α -hydroxycholesterol) and their analysis by electrospray tandem mass spectrometry were carried out as described by our laboratory (Akoume-Ndong et al., 2002).

Lipid and bile acid analyses

Lipids were extracted from liver subcellular fractions and bile according to the method of Folch (Folch et al., 1957). Total cholesterol was assayed using a commercially available method (Boehringer, Mannheim, Germany), and phospholipids were determined by the colorimetric procedure of Bartlett (Bartlett, 1959). Phosphatidylcholine molecular species were identified by electrospray tandem mass spectrometry (Brügger et al., 1997).

Total bile acid concentration in bile was determined enzymatically with the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase method (Turley and Dietschy, 1978). Electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were used for the identification and determination of biliary bile acids (Perwaiz et al., 2001). Briefly, for the ES-MS-MS analysis, bile acids were extracted with a C18 (octadecyl) reversed-phase column, and were analysed by simultaneous monitoring of parent and daughter ions for the identification of glycine and taurine conjugates. For the GC-MS analysis, conjugated bile acids were hydrolysed in 2.5 M NaOH at 120 °C overnight. Bile acids were then extracted, methylated, and acetylated. Identification and quantification of bile acids were achieved using a Hewlett-Packard 5896 gas chromatograph equipped with a Hewlett-Packard 5971A mass selective detector operating in selected-ion monitoring mode (SIM). Quantification was carried out by using a correction factor obtained with 5 β -cholanic acid as internal standard (Perwaiz et al., 2001).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis of data was performed with the Graph-Pad Prism® computer program and the statistical significance of difference between experimental groups was evaluated by a Student's t-test. For multiple comparisons to the same group, a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett test was employed. Probability values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Bile flow and biliary lipid secretion

Table 1 depicts bile flow and secretion rates of biliary bile acid, phospholipids and cholesterol during the cholestatic phase (60- to 75-min interval). In comparison to control values, bile flow and bile acids output were decreased by 50% and 42%, respectively. However, phospholipids and cholesterol output were dramatically reduced by 75 and 90%, respectively.

Biliary bile acids

The results obtained show a significant reduction in the biliary excretion of trihydroxylated glycine and taurine conjugated bile acids (Table 2). Despite the reduction in bile acid by the Mn-BR treatment, there was no change in the percent contribution of glycine and taurine conjugated bile acids. The percentage of glycine conjugated bile acid was 36.7% in control versus 33.4 in Mn-BR. The percentage of taurine conjugated bile acid averaged 63.7% in control versus 66.4 in Mn-BR. Although there was no change in the amount of dihydroxylated bile acids in Mn-BR as compared to control, there was a significant increase in the percent contribution of dihydroxylated bile acids conjugated by glycine and taurine (18.6% versus 11.6% for the glycine dihydroxylated bile acid in Mn-BR versus control, and 25.16% versus 16.0% in the taurine conjugated dihydroxylated bile acids for the Mn-BR versus control respectively; Table 2).

Similar changes were observed in the total bile acid profile (glycine, taurine conjugated bile acids, and free bile acids). The contribution of cholic acid was reduced from 78.5 to 58.1% in control and Mn-BR, respectively. However, the contribution of the dihydroxylated bile acid chenodeoxycholate and its metabolites α and β muricholate, was not significantly changed from the control values (Table 2).

Biliary and microsomal phosphatidylcholine

Analysis of phosphatidylcholine (PC) showed that the molecular species secreted into bile remained unchanged as compared to control; however, there were changes in the intensities of these species as shown by the electrospray mass spectra (Fig. 1). The intensities of all PC species increased in microsomes from Mn-BR-treated rats, while they decreased in the bile. The PC species found in bile were 16:0/18:2; 16:0/20:4 & 16:0/18:1 and 16:0/22:6. The Mn-BR treatment affected the intensities of 16:0/18:2; 16:0/20:4 and 16:0/18:1 in bile more than the intensity of 16:0/22:6 species.

Lipid composition of hepatic subcellular fractions

The subcellular distribution of hepatic protein was similar in control and Mn-BR groups, as shown in Table 3. However, the percentage of cholesterol was increased in canalicular and cytosolic fractions, and reduced in the microsomal fraction, indicating a redistribution of subcellular cholesterol. The percentage of total phospholipids was increased in microsomal and cytosolic fractions. The

cholesterol/phospholipid ratio was significantly increased in the canalicular membrane from 2.01 to 5.64. The lipid distribution in other subcellular fractions was not affected by the Mn-BR treatment.

Marker Enzymes of SM and BCM Fractions

Table 4 shows the enzymatic activities for glucose-6-phosphatase (G-6-Pase), leucine aminopeptidase (LAP), and 5'-nucleotidase, the marker enzymes for microsome, canalicular membrane and for liver cell plasma membrane fractions. The G-6-Pase activity was reduced to 15% of that of the homogenate activities in BCM fraction and to 33% in SM fraction in the control group. In Mn-BR, the G-6-Pase activities were reduced by similar percentages, 14% in BCM and 39% in SM. The LAP and 5'-nucleotidase were enriched in both the BCM and SM. However, the LAP activity was much higher in BCM as compared to SM. This indicates that the Mn-BR treatment does not affect the purity or the isolation of the BCM and SM fractions.

Hepatic HMG-CoA Reductase and 7 α -Hydroxylase activities

The Mn-BR combined treatment affected significantly hepatic cholesterol 7 α -hydroxylase and HMG-CoA reductase activities (Fig. 2). Measurement of these enzymes from the moment of BR injection revealed a 55% decrease in cholesterol 7 α -hydroxylase activity at 15 min that progressed and reached 75% at 30 min. The activity of HMG-CoA reductase was inhibited by 62% at 15 min, and by 53% at 30 min. Thirty minutes after a single administration, BR alone caused the same

degree of inhibition for cholesterol 7 α -hydroxylase but exerted no effects on HMG-CoA reductase (Fig.3). In contrast, Mn alone produced a significant increase of both enzymes, 67 and 63% for HGM-CoA reductase and 7- α hydroxylase respectively 15 minutes after injection. This enzymatic stimulation decreased with time to 54% for HMG-CoA reductase, and to 41% for cholesterol 7 α -hydroxylase (Fig. 3).

DISCUSSION

Alteration in BCM molecular organization, particularly an increase in the BCM cholesterol and an increase in cholesterol/phospholipid ratio, is associated with defect in bile formation and was suggested to be an important event in the development of certain forms of intrahepatic cholestasis (Kakis and Yousef, 1978; Simon et al., 1980; Yousef et al., 1984), including Mn-BR induced cholestasis (de Lamirande et al., 1981; Duguay et al., 1998). The present results confirm that the Mn-BR combined treatment increases the cholesterol content in BCM (from 1.61 to 4.23% of the total content of hepatocyte) with no significant changes in phospholipid content (Duguay et al., 2000). Such accumulation of cholesterol in BCM increased the cholesterol/phospholipid ratio which is an index of membrane fluidity (Chen et al., 1999), and consequently might cause a decrease in 5'-nucleotidase and leucine aminopeptidase activities, which are the marker enzymes of the liver cell membrane fractions.

Previous results showed that the cholesterol accumulated in BCM in the Mn-BR induced cholestasis model was newly synthesized; however, the activity of HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme for cholesterol synthesis, was not increased (Duguay et al., 2000). Consequently, the increase in BCM newly synthesized cholesterol content can only be explained by a reduction in degradation of newly synthesized cholesterol as well as a decrease in its biliary secretion. The data obtained in the present study support such hypothesis.

Furthermore, the data suggest a synergistic effect for Mn and BR in the development of the cholestasis induced by the Mn-BR combination.

Although extrahepatic cholesterol is an important source of hepatic cholesterol (Oliver, 1990), the liver is quantitatively the most important organ for cholesterol synthesis (Steinberg, 1989). Furthermore, the liver maintains hepatic cholesterol balance by coordinated regulation of de novo synthesis, degradation to bile acids and direct excretion of cholesterol (Steinberg, 1989). The degradation of cholesterol to bile acids occurs by two different pathways leading to the formation of cholate, a trihydroxylated bile acid, and chenodeoxycholate, a dihydroxylated bile acid, which is precursor of other bile acids such as muricholate (Bandsma et al., 2000; Scheibner et al., 1993). The production of cholate is essentially assured through the main pathway initiated by cholesterol 7 α -hydroxylase (Bandsma et al., 2000), which uses preferentially newly synthesized cholesterol (Scheibner et al., 1993). The secondary pathway initiated by 27-hydroxylase yields predominantly chenodeoxycholate (Bandsma et al., 2000), and the extrahepatic pool of cholesterol is the preferred source of cholesterol for this enzyme (Scheibner et al., 1993). Thus, analysis of bile acids in bile during the development of cholestasis may be used to indicate the source of cholesterol used for the formation of bile acids. This is true in this study as the bile acid pool was depleted for 2 h prior to treatment and thus the majority of bile acids secreted are newly synthesized. In the Mn-BR combined treatment, the secretion of cholate was significantly reduced, but there were no changes in the secretion of all other bile acids, including muricholate, another trihydroxylated bile acid. These data suggest that cholate

synthesis rather than canalicular transport is impaired, as evidenced by a marked decrease in activity of cholesterol 7 α -hydroxylase. Therefore, the newly synthesized cholesterol was not degraded; resulting in its accumulation in the liver. The observation that chenodeoxycholate secretion was normal after Mn-BR treatment indicated that the secondary pathway for bile acid synthesis was not affected. Previously, data derived from experiments with differentially radio-labelled cholesterol were interpreted to indicate that the major contribution to cholesterol accumulation in BCM following Mn-BR treatment was newly synthesized cholesterol (Duguay et al., 2000). The bile acid results described in the present study, using differential bile acid profiles, are consistent with the hypothesis and further support the importance of newly synthesized cholesterol as the major source of the accumulating cholesterol in the Mn-BR model.

In addition, a direct positive relation was shown to exist between the increase in the detergent effect of bile acids and biliary lipid secretion (Coleman and Rahman, 1992). Because the detergent properties of chenodeoxycholate are stronger than those of cholate (Coleman, 1987), the changes induced by the Mn-BR combination in bile acid pattern should theoretically increase the secretion of cholesterol and phospholipids into bile. However, in bile obtained from the Mn-BR treated rats both cholesterol and phospholipids were drastically reduced. This strongly suggests that the Mn-BR combination might affect Mdr2, the transporter of biliary lipids (Smit et al., 1993). This possibility is supported by the low excretion of the phosphatidylcholine species 16:0/18:2 and 16:0/20:4 & 16:0/18:1, as Mdr2 has specificity for the transport of these species (Berr et al., 1993). However, further

work by direct measurement of the Mdr2 protein or activity is needed before this aspect can be clarified. It is also possible that the high amount of phosphatidylcholine species in microsome may not be due to the impairment of Mdr2 alone. Since other species notably 18:0/20:4 and 18:0/22:6, which are increased in microsome, are not secreted into the bile. Some investigators (Bernasconi et al., 2000; Kim et al., 2002) also showed that an increase in liver cholesterol content increased the proportions of phosphatidylcholine species in microsomes.

An interesting feature of the present study is that only the Mn-BR combination induces cholestasis. Injection of Mn alone leads to significant increase in the activities of cholesterol metabolism key enzymes, HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase. This enzymatic stimulation diminished with time. BR injection alone, however, reduced the activity of cholesterol 7 α -hydroxylase with no effect on HMG-CoA reductase. It appears that in the sequential regimen of Mn plus BR, Mn injection increased cholesterol synthesis as well as bile acid synthesis. The BR injection 15 min later decreased 7 α -hydroxylase activity, leading to reduced bile acid synthesis, expressed mainly as a reduction in cholate secretion. The time interval between Mn and BR injection is critical for the induction of cholestasis (de Lamirande and Plaa, 1979). Our results show that the inhibition of cholesterol degradation by BR coincides with the period where the activation of cholesterol synthesis by Mn is higher. Taken together, these data indicate that BR injection preceded by that of Mn, promote the accumulation of newly synthesized cholesterol in liver and favour its redistribution in tissue and specifically in the BCM

leading to the cholestasis. This, in turn, may depress hepatic cholesterol synthesis, since it is possible that the intracellular concentration of free cholesterol exerts a negative feedback on HMG-CoA reductase activity in the liver (Hwa et al., 1992). In addition, the activity of this enzyme as well as that of cholesterol 7 α -hydroxylase may be affected by changes in bile acid profile (Naito et al., 1996).

Of particular interest from this study are the common features characterized by the disturbance in cholesterol homeostasis and the increased availability of cholesterol in liver and its redistribution in tissue organelles in experimental cholestasis induced by the administration of certain drugs (Andrade et al., 1993; Chisholm et al., 1999; Ishizaki et al., 1997; Simon et al., 1980). In all those models, cholesterol predominantly accumulated in canalicular membranes where the proteins involved in the hepatic transport of endogens and exogenous substances are localized. The consequences of such accumulation are a failure of the functions of these transporters, which are involved in bile formation, resulting in cholestasis. This suggests that cholesterol is an important component in the development of cholestasis induced by chemical substances, which is becoming prevalent with the occurrence of multidrug therapy (Chitturi and Farrell, 2001).

In conclusion, these results provide evidence that the increase in hepatic availability of newly synthesized cholesterol, which is associated with the pathogenesis of Mn-BR-induced cholestasis, is caused at least in part by the synergistic effect of Mn and BR acting separately on cholesterol synthesis and degradation. These findings may help to further elucidate the biochemical mechanism of drug-induced cholestasis in humans and lead to possible

therapeutic manoeuvres to prevent or treat the cholestasis induced by drug interactions.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grant from the Canadian Liver Foundation. We thank Diane Mignault for the ES-MS-MS analysis of biliary phospholipids.

REFERENCES

- Andrade, R. J., Lucena, M. I., Gonzalez-Correa, J. A., Garcia-Arias, C., and Gonzalez-Santos, P. (1993). Short-term effect of various doses of cyclosporine A on plasma lipoproteins and its distribution in blood: an experimental study. *Hum. Exp. Toxicol.* 12: 141-6.
- Bandsma, R. H., Kuipers, F., Vonk, R. J., Boverhof, R., Sauer, P. J., Nagel, G. T., Elzinga, H., Neese, R. A., Hellerstein, M. K., and Stellaard, F. (2000). The contribution of newly synthesized cholesterol to bile salt synthesis in rats quantified by mass isotopomer distribution analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1483, 343-351.
- Bartlett, G. R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466-8.
- Bemasconi, A. M., Garda, H. A., and Brenner, R. R. (2000). Dietary cholesterol induces changes in molecular species of hepatic microsomal phosphatidylcholine. *Lipids* 35: 1335-1344.
- Berr, F., Meier, P. J., and Stieger, B. (1993). Evidence for the presence of a phosphatidyl choline translocator in isolated rat liver canalicular plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 268, 3076-3079.
- Bjornbeth, B. A., Labori, K. J., Hvattum, E., Lyberg, T., Chistensen, T., Woldseth, B., and Reader, M. G. (1999). Effect of intravenous bilirubin infusion on biliary phospholipid secretion, hepatic P-glycoprotein expression, and biliary cytotoxicity in pigs. *Scand. J. Gastroenterol.* 34, 1042-1049.

- Brügger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F. T., and Lehmann, W. D. (1997). Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem, mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 2339-2344.
- Chen, Q. J., Biancari, A. P., and Behar, J. (1999). Excess membrane cholesterol alters human gallbladder muscle contractility and membrane fluidity. *Gastroenterology* 112: 679-685.
- Chisholm, J. W., Nation, P., Dolphin, J. P., and Agellon, L. B. (1999). High plasma cholesterol in drug-induced cholestasis is associated with enhanced hepatic cholesterol synthesis. *Am. J. Physiol.* 276, G1169-G1173.
- Chitturi, S., and Farrell, G. C. (2001). Drug-induced cholestasis. *Semin Gastrointest. Dis* 12: 113-24.
- Coleman, R., and Rahman, K. (1992). Lipid flow in bile formation. *Biochim. Biophys Acta* 1125, 113-133.
- de Lamirande, E., and Plaa, G. L. (1979). Dose and time relationships in Mn-BR cholestasis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 49, 257-263.
- de Lamirande, E., Tuchweber, B., and Plaa, G. L. (1981). Hepatocellular membrane alteration as a possible cause of manganese-bilirubin-induced cholestasis. *Biochem. Pharmacol.* 30, 2305-2312.
- Davis, R. A., Kern, F., Showalter, R. Jr., Sutherland, E., Sinensky, M., and Simon, F. R. (1978). Alterations of hepatic Na⁺, K⁺ -ATPase and bile flow by estrogen: effects on liver surface membrane lipid structure and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 4130-4134.

- Duguay, A., Yousef, I. M., Tuchweber, B., and Plaa, G. L. (1998). Alteration of lipid composition of hepatic membranes associated with manganese-bilirubin induced cholestasis. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12, 213-219.
- Duguay, A., Yousef, I. M., and Plaa, G. L. (2000). Manganese-bilirubin effect on cholesterol accumulation in rat bile canalicular membranes. *Toxicol. Sci.* 53, 150-55.
- Feur, G., and Difonzo, C. J. (1992). Intrahepatic cholestasis: a review of biochemical-pathological mechanisms. *Drug Metab. Drug Interact.* 10, 1-165.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. R. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Hwa, J., Zollman, S., Warden, C. H., Taylor, B. A., Edwards, P. A., Fogelman, A., and Lusic, A. J. (1992). Genetic and dietary interactions in the regulation of HMG-CoA reductase gene expression. *J. Lipid. Res.* 33, 711-725.
- Ishizaki, K., Kinbara, S., Miyazawa, N., Takeuchi, Y., Hirabayashi, N., Kasai, H., and Araki, T. (1997). The biochemical studies on phalloidin-induced cholestasis in rats. *Toxicol. Lett.* 90: 29-34.
- Kim, H. J., Miyazaki, M., and Ntambi, J. M. (2002). Dietary cholesterol opposes PUFA-mediated repression of the stearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism. *J. Lipid. Res.* 43: 1750-7.
- Kakis, .G, and Yousef, I. M. (1978). Pathogenesis of lithocholate and taurolithocholate induced-cholestasis in rat. *Gastroenterology* 75, 595-607.
- Kuipers, F., van Ree, J. M., Hofker, M. H., Wolters, H., In't Veld, G., Havinga, R.,

- Vonk, R. J., Princen, H. M., and Havekes, L. M. (1996). Altered lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice does not affect cholesterol balance across the liver. *Hepatology* 24, 241-247.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Myant, N. B., and Mitropoulos, K. A. (1977). Cholesterol 7 α -hydroxylase. *J. Lipid. Res.* 18, 135-153.
- Naito, T., Kuroki, S., and Tanaka, M. (1996). Bile acid synthesis and biliary hydrophobicity during obstructive jaundice in rats. *J. Surg. Res.* 65: 70-76.
- Ndong-Akoume, M. Y., Perwaiz, S., Mignault, D., Plaa, G. L., and Yousef, I. M. (2002). Simultaneous evaluation of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities by electrospray tandem mass spectrometry. *Lipids* 37: 1101-1107
- Oliver, M. F. (1990). Introduction: lipids and coronary disease resolved and unresolved problems. *Br. Med. Bull.* 46, 865-872.
- Perwaiz, S., Tuchweber, B., Mignault, D., Gilat, T., and Yousef, I.M. (2001). Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Lipid. Res.* 42, 114-119.
- Plaa, G. L., and Priestly, B. G. (1976). Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals. *Pharmacol. Rev.* 28, 207-273.
- Plaa, G. L., de Lamirande, E., Lewittes, M., and Yousef, I. M. (1982). Liver cell plasma membrane lipids in manganese-bilirubin-induced intrahepatic cholestasis. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3698-3701.

- Rodwell, V. W., Nordstrom, J. J., and Mitschelen. (1976). Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv. Lipid. Res.* 14, 1-74.
- Schachter, D. (1984). Fluidity and function of hepatocyte plasma membranes. *Hepatology* 4: 140-151.
- Scheibner, J., Fuchs, M., Tauber, G., Hornmann, E., and Stange, E. F. (1993). Bile acid synthesis from newly synthesized vs preformed cholesterol precursor pools In the rat. *Hepatology* 17, 1095-102.
- Simon, F. R., Gonzalez, M., Sutherland, E., Accatino, L., and Davis, R. A. (1980). Reversal of ethinyl estradiol-induced bile secretory failure with Triton WR-1339. *J. Clin. Invest.* 65, 851-860.
- Simon, F. R., Fortune, J., Iwahashi, M., Gartung, C., Wolkoff, A., and Sutherland, E. (1996). Ethinyl estradiol cholestasis involves alterations in expression of liver sinusoidal transporters. *Am. J. Physiol.* 271: 1043-1050.
- Smit, J. J., Schinkel, A. H., Oude Elferink, R. P., Groen, A. K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., Ottenhoff, R., van Roon, M. A., van der Valk, M. A., Offerhaus, G.J., Bens, A.J., and Borst, P. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75, 451-462.
- Steinberg, D. (1989). The cholesterol controversy is over. Why did it take so long? *Circulation* 80, 1070-1078.
- Tazuma, S., Ochi, H., Teramen, K., Yamashita, Y., Sasaki, M., Aihara, N., and

- Hatsushika, S. (1994) Degree of fatty acyl chain unsaturation in biliary lecithin dictates cholesterol nucleation and crystal growth. *Biochem. Biophys. Acta.* 1215: 74-8.
- Tulenko TN, Chen M, Mason PE, Mason RP. (1998) Physical effects of cholesterol on arterial smooth muscle membranes: evidence of immiscible cholesterol domains and alterations in bilayer width during atherogenesis. *J Lipid Res.* 39:947-956.
- Turley, S. D., and Dietschy, J. M. (1978). Reevaluation of the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *J. Lipid Res.* 19, 924-928.
- Yamashita, H., Kuroki, S., and Nakayama, F. (1989). Assay of cholesterol 7 α -hydroxylase utilizing a silica cartridge column and 5 α -cholestane-3 β , 7 β -diol as an internal standard. *J. Chromatogr.* 496, 255-268.
- Yeagle PL. (1991) Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie* 73:1303-1310.
- Yousef, I. M., Lewittes, M., Tuchweber, B., Roy, C. C., and Weber, A. M. (1984). Lithocholic acid-cholesterol interactions in rat liver plasma membrane fractions. *Biochim. Biophys. Acta.* 796, 345-353.
- Yousef, I. M., and Tuchweber, B. (1984). Effect of lithocholic acid on cholesterol synthesis and transport in the rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* 796, 336-344.
- Yousef IM, Tuchweber B, Morazain R, Kugelmass R, Gauvin M, Roy CC, Weber AM. (1988). Cholesterol synthesis in the pathogenesis of lithocholic acid-induced cholestasis. *Lipids*; 23:230-233.

TABLE 1. Bile flow and biliary secretion of lipids

	Control	Mn-BR
Bile flow ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ liver)	2.15 ± 0.13	$1.07 \pm 0.09^*$
Bile acids ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g}$ liver)	28.52 ± 2.03	$16.39 \pm 1.41^{***}$
Phospholipids ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g}$ liver)	11.03 ± 3.1	$2.76 \pm 1.14^*$
Cholesterol ($\text{nmol}/\text{min}/\text{g}$ liver)	0.98 ± 0.20	$0.10 \pm 0.07^{**}$

Note. Values are mean \pm SEM of six rats. All data were calculated from mean values of the collection period from 60 to 75 min corresponding to the effective cholestatic phase.

* $P < 0.05$, significantly different from control group.

TABLE 2. Bile acid pattern in bile

Bile acids	Secretion rates (nmol/min/g liver)	
	Control	Mn-BR
Cholate	21.63 ± 2.25 (79)	8.78 ± 1.22* (58)
Chenodeoxycholate	1.56 ± 0.70 (6)	1.94 ± 0.41 (13)
α-Muricholate	1.07 ± 0.39 (4)	1.17 ± 0.50 (8)
β-Muricholate	1.35 ± 0.35 (5)	1.38 ± 0.50 (9)
Ursodeoxycholate	0.94 ± 0.13 (3)	0.95 ± 0.09 (6)
Deoxycholate	0.84 ± 0.21 (3)	0.72 ± 0.25 (5)
Lithocholate	0.14 ± 0.05 (1)	0.16 ± 0.05 (1)
Glycine conjugates		
Monohydroxyl-bile acids	Not detected	Not detected
Dihydroxyl-bile acids	0.83 ± 0.05 (12)	0.85 ± 0.19 (19)
Trihydroxyl-bile acids	6.20 ± 0.53 (87)	3.60 ± 0.67* (79)
Tetrahydroxyl-bile acids	0.08 ± 0.04 (1)	0.11 ± 0.02 (2)
Taurine conjugates		
Monohydroxyl-bile acids	Not detected	Not detected
Dihydroxyl-bile acids	1.97 ± 0.55 (16)	2.29 ± 0.39 (25)
Trihydroxyl-bile acids	10.18 ± 0.98 (83)	6.67 ± 0.53* (73)
Tetrahydroxyl-bile acids	0.12 ± 0.05 (1)	0.14 ± 0.05 (2)

Note. Values are mean ± SEM of six rats. Bile was analyzed by GC-MS for free bile acids and by ES-MS-MS for conjugates. Values in parentheses represent the percentage of contribution in bile acid pool or in the conjugated class.

*P < 0.05, significantly different from control.

TABLE 3. Subcellular distribution of hepatic protein and lipids

Fractions	Proteins		Phospholipids		Cholesterol	
	Control	Mn-BR	Control	Mn-BR	Control	Mn-BR
Homogenate (mg/g liver)	229 ± 22	223 ± 20	43.3±3.78	50.6±4.21	11.8±0.72	12.0 ± 1.03
Nuclear	19.3±1.90	18.9±1.46	20.4± 0.94	17.7± 1.02	17.6± 0.47	17.5 ± 0.53
Mitochondrial	19.2 ± 1.25	20.3 ± 2.20	22.2± 0.71	18.8 ± 0.55	25.9± 1.43	26.3 ± 1.41
Lysosomal	0.65 ± 0.20	0.71 ± 0.21	1.68± 0.37	1.38 ± 0.40	1.18± 0.08	1.33 ± 0.12
Golgi	2.31 ± 0.61	2.18 ± 0.58	8.14± 0.53	6.94 ± 0.78	4.83± 0.42	5.49 ± 0.33
Sinusoidal	0.52 ± 0.13	0.59 ± 0.16	0.76± 0.04	0.59 ± 0.09	2.37± 0.25	3.09 ± 0.16
Canalicular	0.17 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.80± 0.07	0.75 ± 0.04	1.61± 0.08	4.23±0.16*
Cytosolic	40.4 ± 4.49	39.6 ± 4.11	8.21± 0.18	11.3±0.33*	12.1± 1.80	32.8±2.28*
Microsomal	15.7 ± 1.23	15.8 ± 1.19	37.8± 1.67	42.5± .30*	34.2± 2.29	8.74±1.49*

Note. Values in subcellular fractions are expressed as % of content in homogenates and represent means ± SEM of six rats.

*P < 0.05, significantly different from control group.

TABLE 4. Marker enzyme activities and relative enrichment in homogenate, bile canalicular membrane (BCM) and sinusoidal membrane (SM) of control and Mn-BR treated rats

Enzymes	Control group			Mn-BR group		
	Homogenate	BCM	SM	Hom.	BCM	SM
G-6-Pase ($\mu\text{mol/h/mg protein}$)	8.17 \pm 0.60	1.20 \pm 0.3 (0.15 \pm 0.04)	2.66 \pm 0.5 (0.33 \pm 0.06)	8.18 \pm 0.5	1.18 \pm 0.2 (0.14 \pm 0.02)	3.2 \pm 0.6 (0.39 \pm 0.06)
LAP ($\mu\text{g/h/mg protein}$)	0.18 \pm 0.01	5.30 \pm 0.32 (29.4 \pm 5.1)	0.76 \pm 0.05 (4.22 \pm 0.3)	0.09 \pm 02*	2.54 \pm 3.6* (28.2 \pm 6.2)	0.40 \pm 0.07* (4.44 \pm 0.8)
5'-Nase ($\mu\text{mol/h/mg protein}$)	2.15 \pm 0.05	54.32 \pm 2.3 (25.2 \pm 1.08)	29.71 \pm 3.7 (13.8 \pm 1.7)	1.56 \pm 0.08*	41.02 \pm 2.4* (26.2 \pm 2.3)	14.83 \pm 2.4* (9.50 \pm 1.5)

Note. Results represent mean \pm SEM of six rats. Values in parentheses indicate the relative enrichment (the ratio of enzyme activity of BCM or SM, to that of homogenate). LAP, leucine aminopeptidase; G-6-Pase, glucose-6-phosphatase; 5'-Nase, 5'-nucleotidase

*P < 0.05, significantly different from control group.

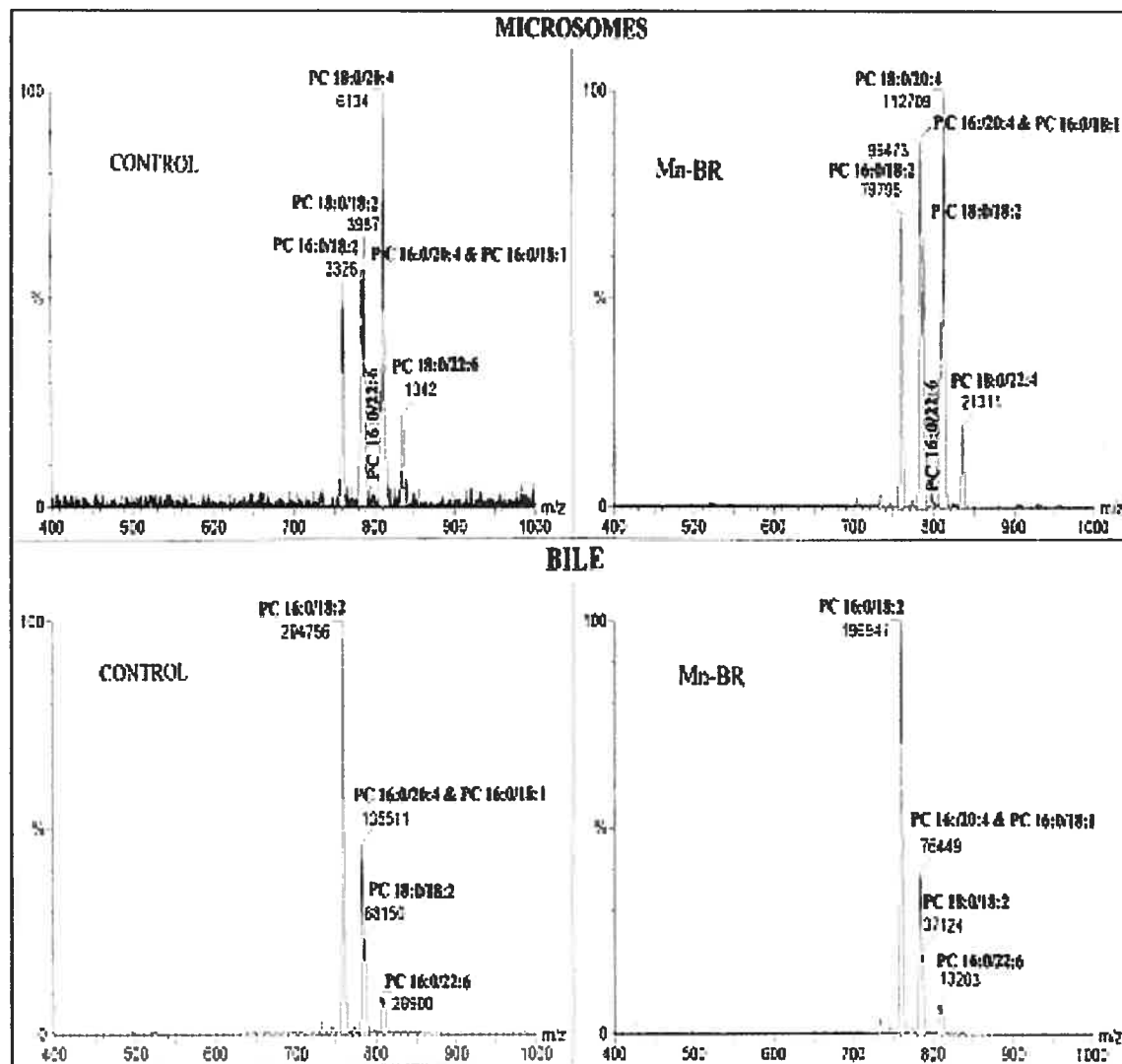


FIG.1. Electrospray mass spectra of phosphatidylcholine (PC) obtained from microsomal and biliary lipid extracts. The intensities of PC molecular species (16:0/18:2; 16:0/20:4 & 16:0/18:1; 18:0/18:2; 16:0/22:6; 18:0/20:4; 18:0/22:6), referred by the number beneath each species designation, increased in microsomes and decreased in bile following Mn-BR treatment.

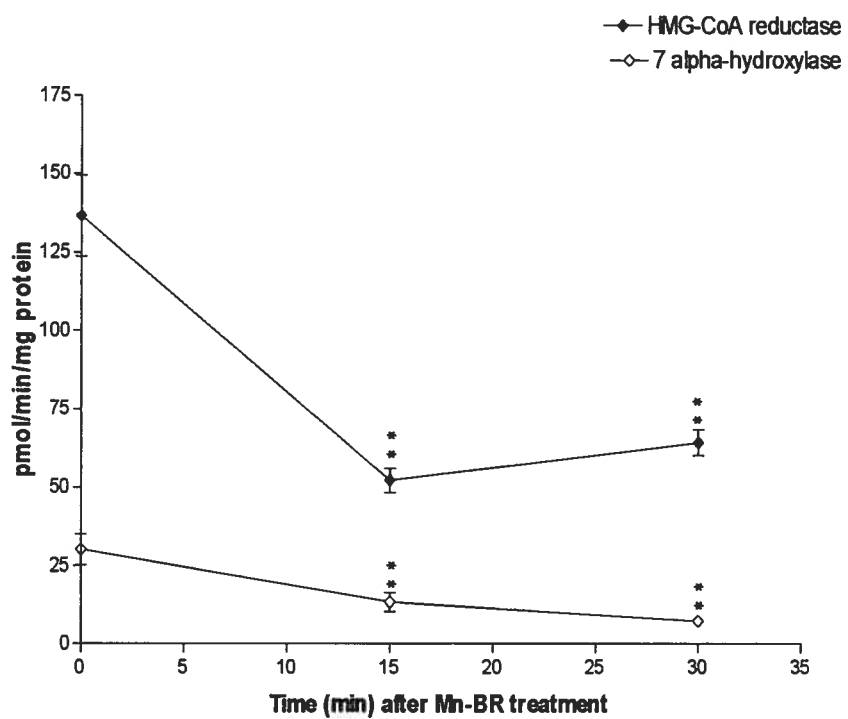


FIG. 2. Changes in microsomal HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities after Mn-BR treatment. Values are mean \pm SEM of six rats. **P < 0.01, significantly different from zero time.

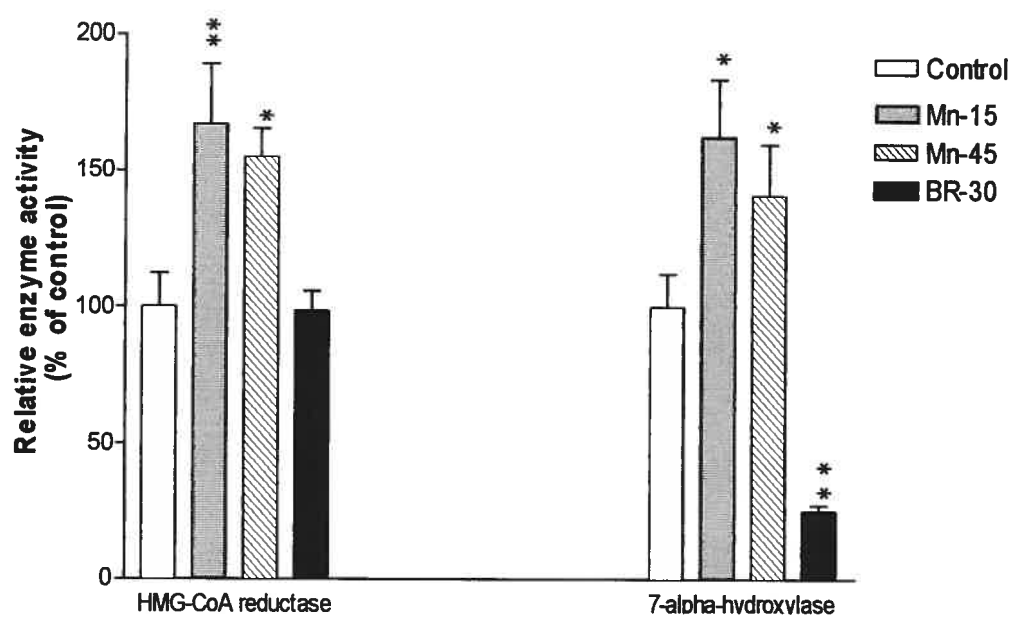


FIG. 3. Relative activities of HMG-CoA reductase and 7 α -hydroxylase. Values are mean \pm SEM of six rats and are expressed relative to controls.

*P < 0.05, ** P < 0.01, significantly different from control group.

ARTICLE 3

Titre: The Role of Mdr2 in Manganese-Bilirubin-Induced Cholestasis in Mice

Auteurs: Marie-Yvonne Akoume^{1,2}, Beatriz Tuchweber², Gabriel L. Plaa¹ and
Ibrahim M. Yousef^{1,2*}

¹Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine Université de Montréal,
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7, and ²Centre de Recherche de l'Hôpital
Sainte Justine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5.

Mots clés: Cholestasis, manganese, bilirubin, mdr2, mice

Publié dans: *Toxicology Letter, 148 : 41-51 (2004)*

ABSTRACT

The pathogenesis of manganese-bilirubin (Mn-BR) induced cholestasis has only been studied in rats and is associated with alteration in the hepatic homeostasis of cholesterol and phospholipids. Multidrug resistance-2 (mdr2) transporter, which mediates excretion of these lipids, is suggested to be involved in this phenomenon. The present study was undertaken to examine if Mn-BR induced cholestasis is reproducible in mice, then to clarify the role of mdr2 in pathogenesis, using mice with disrupted mdr2 gene (mdr2 (-/-)). Results showed that Mn-BR combination decreased bile flow in mice. This reduction in bile flow was similar in mdr2 (-/-) and the wild type mdr2 (+/+). Furthermore, the change in biliary lipid excretion was comparable in both genotypes. These data indicate that Mn-BR induced cholestasis is reproducible in mice and provide evidence that mdr2 alteration is not a primary event in this form of cholestasis.

INTRODUCTION

Intrahepatic cholestasis is defined as a disturbance of bile flow without anatomic obstruction (Feur and Difonzo, 1992), and results most often as an adverse consequence of drug therapy (Plaa and Priestly, 1976; Chitturi and Farrell, 2001). The manganese-bilirubin (Mn-BR) combination has been used in numerous studies as a means of investigating the pathogenesis of cholestasis in rats (de Lamirande and Plaa 1979; Witzleben et al, 1987; Ayotte and Plaa, 1988; Plaa et al., 1998; Duguay et al., 1998, 2000; Akoume et al., 2003). A single dose of Mn administrated intravenously followed by bilirubin results in a severe and reversible diminution in bile flow, without evidence of necrosis (de Lamirande and Plaa, 1979). The severity of this cholestatic response was shown to be related to the bilirubin dosage independent of the Mn load (Boyce and Witzleben, 1973; de Lamirande and Plaa, 1979). However, the time interval after Mn administration during which bilirubin can be injected and provoke the cholestasis, is influenced by the dose of Mn.

Recent studies from our laboratory (Duguay et al., 1998; Akoume et al., 2003), reported interesting data on the pathogenesis of Mn-BR cholestasis. It was shown that alteration of hepatic cholesterol homeostasis is an important component in this cholestatic model and may be due to the combined effects of increased hepatic cholesterol synthesis, inhibition of cholesterol conversion to bile acids, and impaired cholesterol excretion into bile (Akoume et al., 2003). Since biliary cholesterol and phospholipid excretion are coupled together in most

situations, and since the excretion of biliary phospholipids is regulated by the mdr2 protein, we suggested that mdr2 gene may play a role in the pathogenesis of this cholestasis. Although the mouse is the most extensively utilized animal model for investigation of molecular mechanisms of cholestasis, it is not known if Mn-BR combination can induce cholestasis in this species. Thus, the first aim of the present study was to examine whether the Mn-BR combination produces cholestasis in mice and provide the basic information required to the utilization of transgenic mice for the further understanding of the pathogenic processes of Mn-BR induced cholestasis. Secondly, we evaluated the effect of Mn-BR combination in mice with disrupted mdr2 gene to examine the possible role of mdr2 in the Mn-BR cholestatic model.

MATERIALS and METHODS

Animal and experimental protocol

In the first part of the study, male swiss CD1 mice (30-35 g) were purchased from Charles River Inc (St-Constant, Québec, Canada) and kept in animal facilities for 5 days prior to their use in the experiments. The animals were anesthetized with urethane (1 g/kg i.p.). After laparotomy, the bile duct was cannulated with polyethylene tubing (PE 10) to allow sampling of bile. Bile was collected at 15-min intervals into pre-weighed tubes for up to 165 min. Bile volume was determined gravimetrically assuming $1 \mu\text{L} = 1 \mu\text{g}$. Body temperature was maintained during the experiment at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ using a thermostatically controlled infrared lamp. Through catheters (PE 10) placed in the femoral vein, animals received freshly prepared aqueous solutions of Mn and BR. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ was dissolved in saline (0.9 %, NaCl) and injected as a single dose of 2 mg Mn / kg in 1 min. BR was dissolved in the BR buffer (0.52 g NaCl and 0.52 g Na_2CO_3 per 100 mL) and injected as a single dose of 15 mg BR / kg in 2 min. One group was administered equal volumes of the vehicles.

Bile flow, biliary excretion of bile acids and biliary lipids were examined in five treatment regimens: (1) injection of Mn alone (Mn); (2) injection of BR alone (BR); (3) injection of Mn followed by BR injection 15 min later (Mn-BR); (4) injection of saline followed by BR-buffer injection 15 min later (vehicle). During the 75-90 min bile collection period, small samples of heparinized tail blood were collected. The animals were killed by cardiac puncture at the end of the experiment.

In the second set of experiments, mice with a homozygous disruption of the *mdr2* gene (*mdr2* (-/-)) and wild type (*mdr2* (+/+)) mice were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and bred in our own mouse colony. On the day of the experiment, male mice (30-35 g) of each genotype were anaesthetized and operated as described above. To induce cholestasis, Mn and BR were sequentially injected; Mn was given 15 min before BR. Animals were sacrificed after four different regimens: (1) 60 min after injection of Mn alone (Mn); (2) 45 min after injection of BR alone (BR); (3) 45 min after sequential injection of Mn and BR (Mn-BR); (4) 45 min after sequential injection of saline and BR-buffer (vehicle). Bile samples were collected 15 min before sacrifice and frozen at -20°C until analysis. Livers were then perfused with ice-cold saline, excised, weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until they were used for the preparation of isolated canalicular membrane, performed as previously described (Duguay et al., 1998; Akoume et al., 2003). Protein content in the canalicular membranes was determined according to Lowry et al., (1951), and their relative purity was assessed by measurements of leucine aminopeptidase (Goldberg and Rutenburg, 1958).

Lipid and bile acid analysis

Lipids were extracted from bile, plasma and canalicular membrane according to Folch et al., (1957). Total cholesterol was assayed using a commercially available kit (Boehringer, Mannheim, Germany), and phospholipids were determined by the colorimetric procedure of Bartlett (Bartlett, 1959). Electrospray tandem mass spectrometry was used for the identification of

phospholipid molecular species and the quantification of bile acid profiles (Brügger et al., 1997; Perwaiz et al., 2001; Ndong-Akoume et al., 2002). Total bile acid concentration in bile and plasma was determined enzymatically using the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase method (Turley and Dietschy, 1978).

Statistical analysis

In experiments where the effects of Mn and BR were studied individually as well as in combination, statistical analysis was performed using multiple regression linear models according a 2 x 2 factorial design for multiple comparaisons. In experiments involving only the Mn-BR combination and the vehicle treatment, a Student's t-test was used. Probability values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Bile flow

Figure 1A shows bile flow following various treatments in normal mice. The treatment with Mn alone, or BR alone did not affect bile flow. Bile flow remained relatively stable for the duration of the experiment. There were no significant differences between values obtained from these three treatments and the basal bile flow in mice from vehicle group. In contrast, the treatment with the Mn-BR combination produced a significant reduction in bile flow within 15 min after BR injection, when compared to basal levels. The maximum decrease in bile flow was observed at 75 min of the experimental period (45 min after BR injection) and persisted until 105 min after which time it started to increase. However, values remained significantly lower than the basal values or the values obtained for the vehicle group until the end of the experiment.

Bile acid excretion

No significant changes in bile acid excretion were observed in animals treated with BR alone, when compared to vehicle group (FIG 1B). In contrast, Mn treatment alone increased significantly bile acid output. However, animals treated with Mn-BR combination showed a significant decrease in bile acid excretion when compared to the vehicle group. This effect lasted throughout the entire bile collection period. The reduction was more pronounced in the 75-90 min period. Analysis of bile collected during this (75-90 min) period revealed a significant

reduction only for trihydroxyl-bile acids in the Mn-BR treated animals; other bile acids were not significantly affected by Mn-BR treatment when compared to vehicle group (TABLE1).

Cholesterol excretion

Figure 1C shows that injection of Mn alone did not produce any observable effect on biliary cholesterol excretion when compared to the vehicle group. In contrast, BR alone reduced significantly cholesterol excretion. This reduction was greater when Mn was combined with BR. The maximal decrease in cholesterol excretion was observed in the 75-90 min period and cholesterol excretion started to rise at the 105-120 min period. However, the values for cholesterol excretion in BR or Mn-BR treated animals were still less than the vehicle group at the end of the bile collection period.

Phospholipid excretion

As with cholesterol, only BR and the Mn-BR combination caused a significant decrease in biliary phospholipid content when compared to vehicle group (Fig 1D). The maximum decrease was observed in the 75-90 min period.

Lipid composition in plasma

Changes in plasma lipid composition at the maximal decrease in bile flow following the Mn-BR combined treatment are summarized in TABLE 2. Compared to the vehicle group, the Mn-BR combination increased cholesterol and

phospholipid concentrations in plasma. However, this treatment reduced plasma bile acid levels mainly by reducing only trihydroxyl-bile acids.

Bile secretion in transgenic mice

Figure 2 presents effects of various treatments on bile formation in *mdr2* (-/-) and *mdr2* (+/+) mice at 75-90 minutes after canulation. Injection of Mn alone did not produce any significant effect on bile flow either in *mdr2* (-/-) or in *mdr2* (+/+) when compared with their respective controls (FIG. 2A). BR alone decreased bile flow in *mdr2* (-/-), but not in *mdr2* (+/+); however the Mn-BR combination decreased bile flow in both genotypes. In both *mdr2* (+/+) and *mdr2* (-/-), bile acid excretion was increased by Mn alone, unaffected by BR alone, but decreased by Mn-BR combination (FIG. 2B). Cholesterol and phospholipid output were impaired in *mdr2* (-/-) when compared with *mdr2* (+/+) (FIG 2C & 2D), and did not change following treatment with Mn alone or BR alone or Mn-BR combination. However, in *mdr2* (+/+), the excretion rates of cholesterol and phospholipids were unaffected by Mn, but reduced by the other treatments (BR, Mn-BR) (FIG. 2C & 2D). Analysis of the biliary profile of phosphatidylcholine revealed that all phosphatidylcholine species (16:0/18:2, 16:0/18:1, 16:0/20:4, 18:0/18:2, 16:2/22:6, 18:0/20:4 and 18:0/22:6) were similar between *mdr2* (+/+), *mdr2* (-/-) and Mn-BR-treated *mdr2* (+/+) (data not shown).

Lipid composition of canalicular membrane in transgenic mice

Figure 3 presents effects of various treatments on lipid composition of canalicular membrane in *mdr2* (-/-) and *mdr2* (+/+) mice. Treatment with Mn alone did not have a significant effect on canalicular membrane cholesterol levels in the *mdr2* (-/-) or *mdr2* (+/+) group when compared to respective controls (FIG. 3A). BR, or Mn-BR treatment increased canalicular membrane cholesterol content in *mdr2* (-/-) and *mdr2* (+/+), as compared to control. The molar ratio of cholesterol to phospholipids was significantly increased by BR in *mdr2* (-/-), but not in *mdr2* (+/+), while Mn-BR combination increased this ratio in both genotypes. All other treatments did not modify significantly the cholesterol to phospholipid ratio (FIG. 4).

DISCUSSION

One of the main objectives of the present study was to assess the effect of Mn-BR treatment in mice as a model of intrahepatic cholestasis. The results clearly demonstrate that the Mn-BR combination promotes a reversible intrahepatic cholestasis in mice. Injection of BR 15 min after Mn injection resulted in a significant reduction in bile flow and cholesterol, phospholipid and bile acid output. The maximal decrease in these parameters occurred 45 min after BR injection, returning to higher values by 165 min. The onset of cholestasis was followed by elevated levels of cholesterol and phospholipids in plasma, while plasma bile acid concentration was decreased. The bile acid pattern showed a marked decrease in the contribution of trihydroxylated bile acids in the bile acid pool. Thus, the hepatic biliary changes observed in normal mice following Mn-BR treatment are similar to those observed in rats (Akoume et al., 2003).

The dosage required to induce cholestasis in mice suggests that mice may be more sensitive to Mn-BR combination than rats. The dose required in mice was 2 mg Mn/kg plus 15 mg BR/kg, whereas in rats effective dosages are 4.5 mg Mn/kg plus 25 mg BR/kg (de Lamirande and Plaa, 1979; Ayotte and Plaa, 1988; Duguay et al., 1998). However, the intensity and duration of the acute cholestatic phase in mice appear comparable to those observed in rats (Ayotte and Plaa, 1988; Duguay et al., 1998). In mice, treatment with Mn-BR combination caused reduction of bile acid concentrations in bile and plasma, which may be related to a

decrease in bile acid synthesis and lipid excretion as seen in rats (Akoume et al., 2003).

The accumulation of cholesterol in the canalicular membrane is regarded as an important event in the pathogenesis of Mn-BR induced cholestasis in rats (Plaa et al., 1982; Duguay et al., 1998, 2000; Plaa et al., 1998). We demonstrated that this event is a consequence of the combined effects of increased cholesterol synthesis, impaired cholesterol conversion to bile acids and decreased biliary cholesterol excretion (Akoume et al., 2003). Although the precise mechanism of cholesterol excretion into bile is unknown, it appears that cholesterol is co-secreted with phospholipids and the process is mediated by *mdr2*, a P-glycoprotein that translocates phosphatidylcholine (PC) species from the internal to the external hemileaflet of the canalicular membrane, generating microdomains of biliary-type phosphatidylcholines in which cholesterol diffuses (Crawford et al., 1997). Bile acid excretion into the canalicular lumen is necessary to evoke lipid secretion and the efficiency of this extraction increases with hydrophobicity of the bile acid species (Verkade et al., 1995).

A previous study showed that cholestasis induced by the Mn-BR combined treatment is not related to a defect in bile acid excretion in rats (Ayotte and Plaa, 1988). This finding was confirmed with our recent data demonstrating that Mn-BR treatment affected modestly biliary concentrations of bile acids in this species, reducing exclusively trihydroxylated bile acids (Akoume et al., 2003). Similar changes in biliary bile acid composition were also observed in our present study using mice.

Indeed, we found that the Mn-BR combined treatment reduced significantly trihydroxylated bile acids in bile of mice, but there were no changes in the excretion of dihydroxylated and monohydroxylated bile acids. Because the detergent properties of both these bile acid categories are stronger than those of trihydroxylated bile acids (Coleman, 1987), the changes induced by the Mn-BR combination in bile acid pattern should theoretically increase the excretion of cholesterol and phospholipids into bile. However, in bile obtained from the Mn-BR treated mice, both cholesterol and phospholipids were drastically reduced.

From previous data on rats (Akoume et al., 2003), together with the present findings in mice, it therefore seems plausible that the reduction in cholesterol and phospholipid concentrations in bile is not due to a deficiency of availability of the hydrophobic bile acids in canalicular lumen, but would rather result from an alteration of *mdr2* in canalicular membrane. Mice with a homozygous disruption of the *mdr2* gene lack biliary phospholipid and cholesterol excretion, and develop a progressive disease, characterized histologically by portal inflammation, proliferation of the bile duct epithelium, and fibrosis (Smit et al., 1993). These histological changes (except fibrosis) are similar to those induced by the Mn-BR combination in rats (Plaa et al., 1982). Hence, to evaluate the contribution of the *mdr2* alteration in the pathogenesis of Mn-BR cholestasis, we wished to investigate the Mn-BR effects in mice where the *mdr2* gene was disrupted.

We observed that the biliary excretion of cholesterol and phospholipids was markedly diminished in *mdr2*-deficient mice, as one would expect, but total bile flow and bile acid excretion were more than adequate. Yet, the Mn-BR combined

treatment resulted in cholestasis in both *mdr2* (-/-) and *mdr2* (+/+) mice. The onset of cholestasis as well as the intensity and duration of the acute cholestatic phase were indistinguishable in both genotypes, indicating that *mdr2* alteration is not a primary event leading to cholestasis following the Mn-BR combined treatment.

Interestingly, we have recently found that Mn-BR treatment reduced dramatically the degradation of cholesterol to bile acids (Akoume et al., 2003), which is the major pathway of elimination of cholesterol excess in the liver (Bandsma et al., 2000). We demonstrated that this effect is mediated by BR (Akoume et al., 2003). Indeed, our study revealed that BR inhibits cholesterol 7 α -hydroxylase, which initiates the degradation pathway of newly synthesized cholesterol (Scheibner et al., 1993). Newly synthesized cholesterol was shown to predominate in the total cholesterol accumulated in canalicular membranes in the Mn-BR cholestatic model (Duguay et al., 2000; Akoume et al., 2003). Because of the marked similarity between the present results in mice and previous results in rats (Ayotte and Plaa, 1988; Akoume et al., 2003), it appears that there are no important species differences in the HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase responses to Mn or BR between rats and mice.

It is interesting to note that the injection of BR alone decreased bile flow and increased cholesterol/phospholipid ratio in canalicular membranes in *mdr2* (-/-), but not in *mdr2* (+/+) mice. Previously, an increase in HMG-CoA reductase in *mdr2* (-/-) mice was reported (Voshol et al., 1998), suggesting increased cholesterol synthesis in this genotype. Thus, in the present study, an inhibitory effect of BR on the degradation pathway of cholesterol (via cholesterol 7 α -hydroxylase), combined

with increased hepatic availability of newly synthesized cholesterol (via HMG-CoA reductase) could account for the BR bile flow response in *mdr2* (-/-) mice. Mn alone, on the other hand, did not affect bile flow either in *mdr2* (-/-) or *mdr2* (+/+) mice. In contrast to BR, Mn enhances cholesterol production (via HMG-CoA reductase), but prevents its accumulation in canalicular membranes by increasing its degradation (via cholesterol 7 α -hydroxylase). In the present study, Mn alone increased bile acid contents in bile in both genotypes, suggesting increased degradation. Thus, plausible explanations exist for both the BR alone and Mn alone responses. In both situations, cholesterol 7 α -hydroxylase appears as a possible rate-limiting step for the onset of Mn-BR cholestasis.

In conclusion, the factors involved in the pathogenesis of cholestasis in the Mn-BR model are probably multiple. However, results of the present study suggest that alteration of *mdr2* is not a decisive event in initiation of this process. Furthermore, these results confirm that the increased cholesterol levels and cholesterol/phospholipid ratio in canalicular membranes are determinants in the onset of Mn-BR cholestasis, and support the hypothesis that the critical events involved in this phenomenon are associated with the synthesis and degradation of cholesterol.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Canadian Liver Foundation.

REFERENCES

Akoume, M.Y., Perwaiz, S., Mignault, D., Yousef, I.M., Plaa, G.L., 2003.

Synergistic role of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase in the pathogenesis of manganese-bilirubin-induced cholestasis in rats. *Toxicol. Sci.* 73, 378-385.

Ayotte, P., Plaa, G.L., 1988. Biliary excretion in Sprague-Dawley and Gunn rats during manganese-bilirubin-induced cholestasis. *Hepatology* 8, 1069-178.

Bartlett, G.R., 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466-8.

Boyce, W., Witzleben, C.L., 1973. Bilirubin as cholestatic agent. II. Effect of variable doses of bilirubin on the severity of Mn-BR cholestasis. *Am. J. Pathol.* 72, 427-432.

Brügger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F.T., Lehmann, W.D., 1997.

Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem, mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 2339-2344.

Brandsma, R.H., Kuipers, F., Vonk, R.J., Boverhof, R., Sauer, P.J., Nagel, G.T.,

Elzinga, H., Neese, R.A., Hellerstein, M.K., Stellaard, F., 2000. The contribution of newly synthesized cholesterol to bile salt synthesis in rats quantified by mass isotopomer distribution analysis. *Biochem. Biophys. Acta* 1483, 343-351.

Chitturi, S., Farrell, G. C. 2001. Drug-induced cholestasis. *Semin. Gastrointest.*

Dis. 12, 113-124.

Crawford, A.R., Smith, A.J., Hatch, V.C., Oude Elferink, R.P.J., Borst, P., Crawford, J.M., 1997. Hepatic secretion of phospholipids vesicles in the mouse critically depends on mdr2 or MDR3 P-glycoprotein expression. *J. Clin. Invest.* 10, 2562-2567.

de Lamirande, E., Plaa, G.L., 1979. Dose and time relationships in Mn-BR cholestasis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 49, 257-263.

Duguay, A., Yousef, I.M., Tuchweber, B., Plaa, G.L., 1998. Alteration of lipid composition of hepatic membranes associated with manganese-bilirubin induced cholestasis. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12, 213-219.

Duguay, A., Yousef, I.M., Plaa, G.L., 2000. Manganese-bilirubin effect on cholesterol accumulation in rat bile canalicular membranes. *Toxicol. Sci.* 53, 150-55.

Feur, G., Difonzo, C.J., 1992. Intrahepatic cholestasis: a review of biochemical-pathological mechanisms. *Drug Metab. Drug Interact.* 10, 1-165.

Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G.R., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

Goldberg, J.A., Rutenberg, A.M., 1958. The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other disease. *Cancer*, 11, 283-291.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Ndong-Akoume, M.Y., Perwaiz, S., Mignault, D., Plaa, G.L., Yousef, I.M., 2002.

Simultaneous evaluation of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities by electrospray tandem mass spectrometry. *Lipids* 37, 1101-1107.

Perwaiz, S., Tuchweber, B., Mignault, D., Gilat, T., Yousef, I.M. 2001.

Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Lipid. Res.* 42, 114-119.

Plaa, G. L., Priestly, B.G., 1976. Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals. *Pharmacol. Rev.* 28, 207-273.

Plaa, G.L., de Lamirande, E., Lewittes, M., Yousef, I.M., 1982. Liver cell plasma membrane lipids in manganese-bilirubin-induced intrahepatic cholestasis. *Biochem. Pharmacol.* 31, 3698-3701.

Plaa, G.L., Duguay, A.B., King, L.M., Hewitt, W.R., 1998. Cholestasis produced by combination of manganese and bilirubin. In: Plaa, G.L., Hewitt, W.R. (Eds.), *Toxicology of the liver*, 2nd edition. Taylor & Francis, Washington, DC, pp. 383-400.

Scheibner, J., Fuchs, M., Schiemann, M., Tauber, G., Hormann, E., Stange, E.F., 1993. Bile acid synthesis from newly synthesized vs. preformed cholesterol precursor pools in the rat. *Hepatology* 17, 1095-102.

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., van der Valk, G.J., Offerhaus, A.J., Bems, M., Borst, P., 1993. Homozygous

disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75, 451-62.

Turley, S.D., Dietschy, J.M., 1978. Reevaluation of the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile. *J. Lipid. Res.* 19, 924-928.

Verkade, H.J, Vonk, R.J, Kuipers, F., 1995. New insights into the mechanism of bile acid-induced biliary lipid secretion. *Hepatology* 21, 1174-89.

Voshol, P.J., Havinga, R., Wolters, H., Ottenhoff, R., Princen, H.M., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Kuipers, F., 1998. Reduced plasma cholesterol and increased fecal sterol loss in multidrug resistance gene 2 P-glycoprotein-deficient mice. *Gastroenterology* 114, 1024-34.

Witzleben, C.L., Boyer, J.L., Oi-Cheng, N.G., 1987. Manganese-bilirubin cholestasis. *Studies in pathogenesis. Lab. Invest.* 56, 151-154.

TABLE 1. Effect of Mn-BR treatment on biliary bile acid composition.

Bile acids	Concentration (mM)	
	Vehicle	Mn-BR
Monohydroxyl-bile acids	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02
Dihydroxyl-bile acids	2.08 ± 0.05	3.14 ± 1.07
Trihydroxyl-bile acids	16.43 ± 1.03	8.27 ± 1.02**

Values are mean ± SEM of six mice. The bile acids were determined by ES/MS/MS at the period 75-90 minutes of bile collection. ** P < 0.01 significantly different from vehicle group.

TABLE 2. Changes in plasma lipid composition at the maximal decreased bile flow following the Mn-BR combined treatment.

Lipids	Concentration (μM)	
	Vehicle	Mn-BR
Cholesterol	2.05 \pm 0.08	3.13 \pm 0.08**
Phospholipids	4.98 \pm 0.17	8.29 \pm 0.15**
Bile acids	8.96 \pm 0.23	6.10 \pm 0.12**
Monohydroxyl-bile acids	0.10 \pm 0.03	0.10 \pm 0.03
Dihydroxyl-bile acids	1.86 \pm 0.72	2.12 \pm 0.71
Trihydroxyl-bile acids	6.36 \pm 0.77	3.28 \pm 0.22**

Values are mean \pm SEM of six mice. Parameters were examined in blood collected during the period from 75 to 90 min where decrease in bile flow was maximal.

**P<0.01, significantly different from vehicle group.

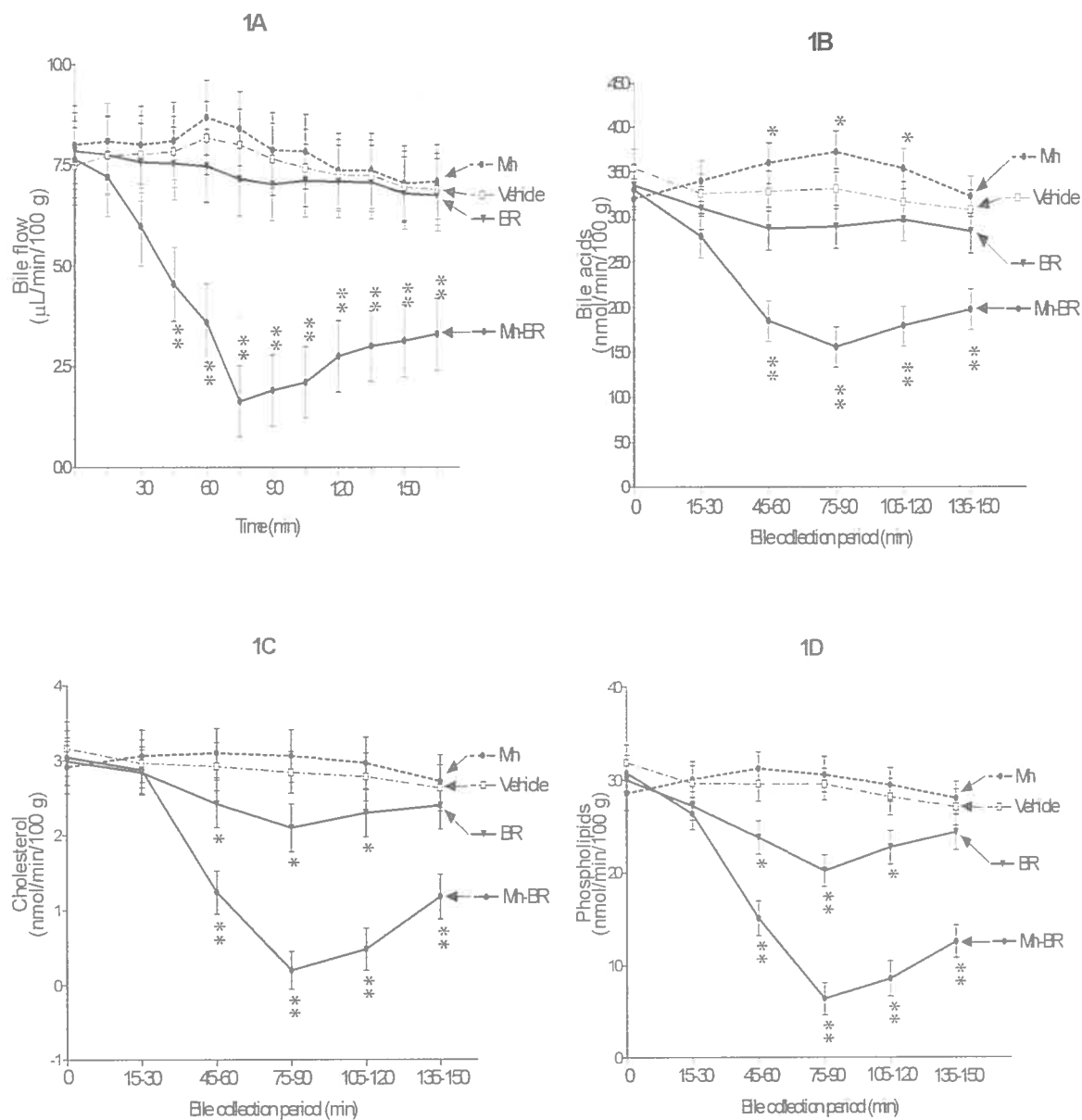


FIG. 1. Bile flow (A) and excretion rates of bile acids (B), cholesterol (C) and phospholipids (D) after various treatments. Mn or BR alone was injected at 15 min; in the combined treatment Mn and BR were injected at 15 min and 30 min, respectively. Each point represents mean \pm SEM of eighteen mice for bile flow or eight mice for biliary lipids. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from vehicle group.

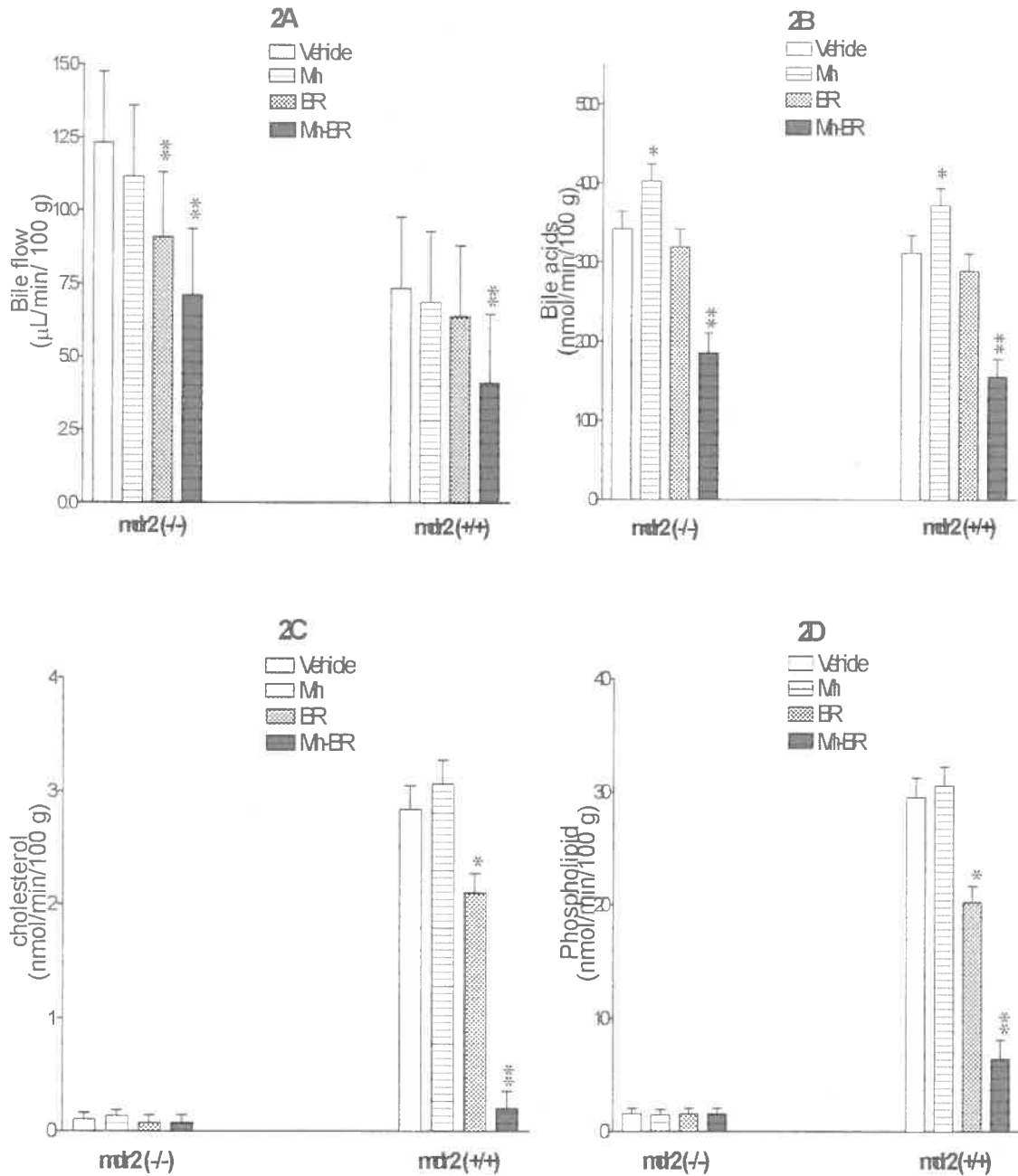


FIG. 2 Bile flow (A) and secretion rates of bile acids (B) cholesterol (C), phospholipids (D) in *mdr2* (-/-) and *mdr2* (+/+) after treatment with manganese (Mn) and bilirubin (BR) alone or in combination. Treatment design is described in section 2. Values are mean \pm SEM of six mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from control *mdr2* (-/-) or *mdr2* (+/+).

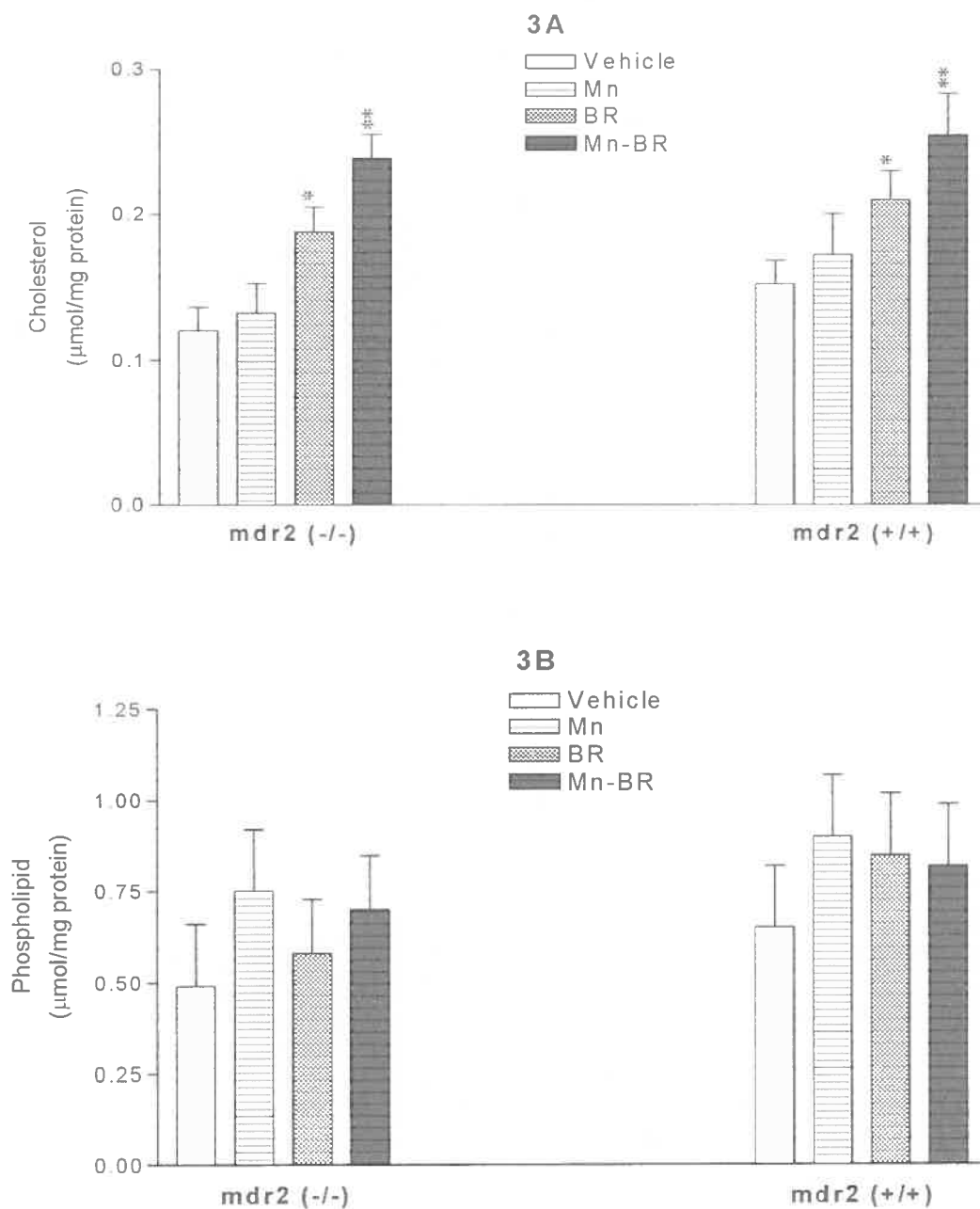


FIG. 3. Content of cholesterol (A) and phospholipids (B) in canalicular membrane from *mdr2* (-/-) and *mdr2* (+/+) after treatment with manganese (Mn) and bilirubin (BR) alone or in combination. Treatment design is described in section 2. Values are mean \pm SEM of six mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from vehicle group.

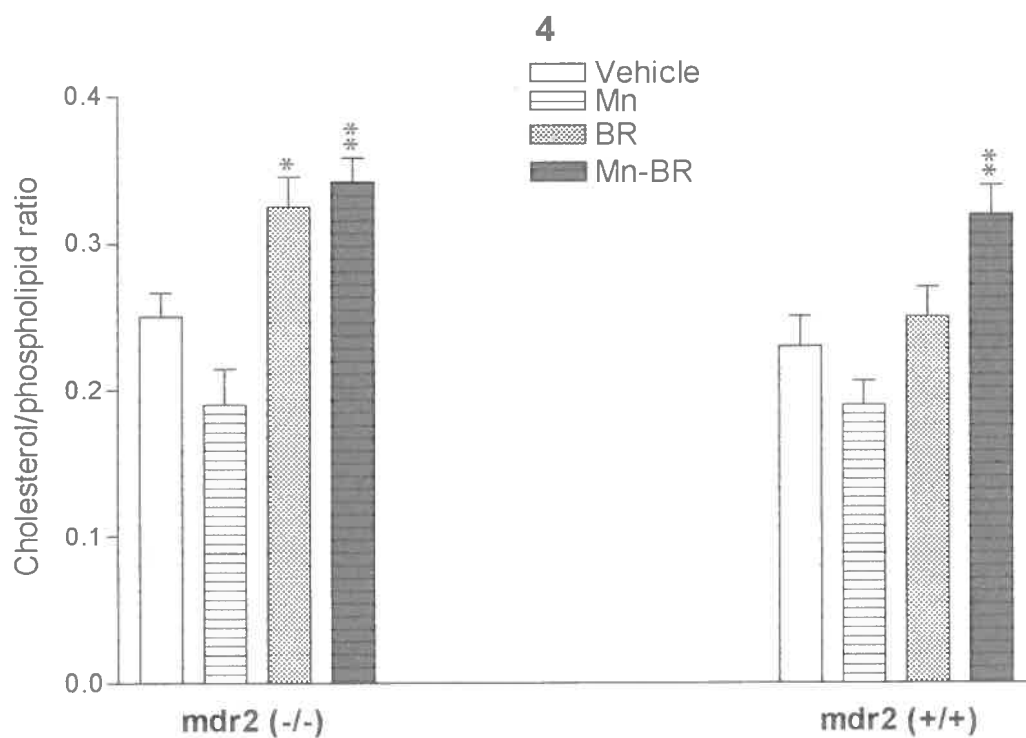


FIG. 4. Effects of various treatments on the cholesterol/phospholipid ratio in canalicular membranes in *mdr2* (-/-) and *mdr2* (+/+). Treatment design is described in section 2. Values are mean \pm SEM of six mice. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different from vehicle group.

ARTICLE 4

Titre : Relation entre le cholestérol, les phospholipides et mdr2 dans la pathogenèse et la prévention de la cholestase manganèse-bilirubine.

Auteurs: Marie-Yvonne Akoume^{1, 2}, Beatriz Tuchweber², Gabriel L. Plaa¹ et Ibrahim M. Yousef^{1, 2*}

¹Département de Pharmacologie, Faculté de Médecine Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7, et ²Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte Justine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5.

Mots clés : Cholestase, membranes canaliculaires, mdr2, BSP, phospholipides, cholestérol, manganèse, bilirubine.

Situation : Article non soumis

RÉSUMÉ

Les concentrations de cholestérol dans les membranes canaliculaires sont modulées par les phospholipides et leur transporteur *mdr2*, mais altérées par la combinaison manganèse-bilirubine (Mn-BR) et par la bromosulfophthaléine (BSP) qui induisent et préviennent respectivement la cholestase Mn-BR. La présente étude examine une relation possible entre le cholestérol et les phospholipides dans la pathogenèse de la cholestase Mn-BR, et un rôle éventuel de *mdr2* dans la prévention, en utilisant les souris dépourvues de la protéine *mdr2* et leur souche sauvage. Chez les deux génotypes, le débit biliaire et l'excrétion des acides biliaires étaient réduits par Mn-BR mais n'étaient pas affectés par BSP. Cependant, les deux traitements ont réduit l'excrétion du cholestérol et des phospholipides, et augmenté les concentrations de cholestérol dans les membranes canaliculaires. BSP a augmenté les concentrations de phospholipides dans ces membranes sans altérer le ratio cholestérol/phospholipides (C/P), tandis que Mn-BR a augmenté le ratio C/P sans modifier la teneur en phospholipides. Par contre, Mn-BR a modifié le profil des phospholipides dans les membranes canaliculaires en élevant les intensités de lysophosphatidylcholine (Lyso-PC) et sphingomyéline (SgM) et en réduisant celles de phosphatidylcholine (PC). L'expression des P-glycoprotéines était aussi réduite par ce traitement pendant qu'elle était augmentée par BSP. Le traitement préventif Mn-BSP-BR a produit les effets identiques à ceux obtenus avec la BSP seule. Ces résultats indiquent que l'événement reliant le cholestérol et les

phospholipides à la cholestase Mn-BR implique une modification du profil phospholipidique favorable à l'incorporation du cholestérol dans les membranes canaliculaires, et suggèrent que mdr2 peut être essentiel dans la prévention de cet événement.

INTRODUCTION

Le cholestérol et les phospholipides sont des composés structuraux essentiels et obligatoires des membranes cellulaires dans presque toutes les lignées des cellules eucaryotes (Bloch, 1983). Au sein de chaque lignée cellulaire, la teneur membranaire en cholestérol, exprimée sous forme de ratio molaire de cholestérol sur phospholipide (C/P), est relativement stable. L'importance de maintenir cette stabilité a été prouvée par des études effectuées avec des membranes biologiques et artificielles (Evans et Needham, 1986; Needham et Nunn, 1990; Leonard et Dufourc, 1991). Ces études ont démontré que l'altération du ratio C/P dans les membranes cellulaires due à une modification de leur teneur en cholestérol, peut affecter leurs caractéristiques morphologiques, physiologiques et physiques. Ceci peut influencer l'activité des protéines membranaires et affecter les fonctions cellulaires dans divers tissus.

Dans le foie, l'augmentation du ratio C/P dans les membranes canaliculaires mène à une altération de la formation de la bile et a été associée à la cholestase intrahépatique dans plusieurs modèles expérimentaux (Kakis et Yousef, 1978; Samuel et Carey, 1978; Plaa et coll., 1982; Duguay et coll., 1998; Akoume et coll., 2003), mais la cause de cette augmentation peut varier entre les modèles de cholestase.

Dans la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine, l'altération du ratio C/P dans les membranes canaliculaires a été associée à une augmentation de leur teneur en cholestérol sans modification de leur teneur en

phospholipides (de Lamirande et al., 1981; Duguay et al., 1998; Akoume et al., 2003). Par contre, la BSP qui prévient cette cholestase, augmente aussi bien le cholestérol que les phospholipides dans les membranes canaliculaires (de Lamirande et coll., 1981).

D'autre part, bien que la combinaison Mn-BR augmente la disponibilité du cholestérol dans le cytosol pour sa distribution souscellulaire, les niveaux de cholestérol se retrouvent élevés uniquement dans les membranes canaliculaires, pendant qu'ils restent inchangés dans les autres membranes hépatocytaires (de Lamirande et al., 1981; Duguay et al., 1998; Akoume et al., 2003). Le rationnel de cette spécificité n'a jamais été exploré. Néanmoins, l'hétérogénéité des niveaux de cholestérol entre les membranes cellulaires est connue pour être modulée par des espèces de phospholipides bien déterminées (Niu et Litman, 2002). À cet égard, la présente étude vise à examiner les effets de la combinaison Mn-BR sur le profil des phospholipides dans les membranes canaliculaires afin d'identifier la possible relation entre le cholestérol et les phospholipides dans la pathogenèse de la cholestase Mn-BR. L'utilisation des souris dépourvue de la protéine mdr2 permet de vérifier l'hypothèse que la protéine mdr2 peut être impliquée dans les mécanismes de prévention de cette cholestase par la BSP.

MATÉRIEL ET METHODES

Animaux

Les souris transgéniques (*mdr2* (-/-)) et les souris sauvages (*mdr2* (+/+)) utilisées, pesant entre 30-35 g, étaient âgées de 2 mois et provenaient d'élevage fait dans nos laboratoires. Deux couples pour effectuer cet élevage avaient été achetés chez Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). La préparation des solutions de manganèse (Mn) et bilirubine (BR) ainsi que l'induction de la cholestase et la procédure opératoire pour prélever la bile, étaient effectuées tel que décrit par Akoume et coll., (2003). Pour prévenir la cholestase, la BSP (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) dissoute dans la solution saline 0.9% était injectée par intraveineuse à une dose de 7 mg/Kg, 10 min avant la bilirubine. Cette injection était faite en moins de 1 min. Les animaux étaient sacrifiés 45 min après chaque traitement séquentiel. Les animaux témoins étaient traités avec les véhicules et furent sacrifiés dans la même période. La bile prélevée 15 min avant le sacrifice était conservée à -20 °C jusqu'au moment de l'analyse. D'autres animaux ont reçu uniquement le Mn, la BR ou la BSP pour examiner l'expression des P-glycoprotéines. Le sacrifice suivant l'injection avait eu lieu après 15 min pour le Mn, 45 min pour la BR et 55 min pour la BSP. Les foies étaient prélevés et l'isolation des membranes sinusoïdales et canaliculaires était effectuée le même jour, suivant la procédure décrite par Duguay et coll., (1998). Puis la détermination des niveaux de protéines dans les membranes était faite avec la

méthode de Lowry et coll., (1951) en utilisant l'albumine sérique de bœuf (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) comme substance étalon.

Analyse des lipides et des acides biliaires

Les lipides étaient extraits de la bile et des membranes sinusoïdales et canaliculaires selon la méthode de Folch et coll. (1957). Le cholestérol total était dosé en utilisant la trousse de la compagnie Boehringer (Boehringer, Mannheim, Germany), et les phospholipides étaient déterminés par la méthode de Bartlett (1959). Les espèces moléculaires de phospholipides étaient identifiées par spectrométrie de masse en tandem opérant dans un mode d'ionisation électrospray (Brügger et coll., 1997). La concentration totale des acides biliaires dans la bile était mesurée par la méthode enzymatique de Turley et Dietschy (1978).

Western blot

Les protéines (30 mg) des membranes canaliculaires étaient séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (12 %) en présence de Sodium DodécylSulfate (SDS) et transférées sur une membrane de nitrocellulose en utilisant le système de transfert de la compagnie Bio-Rad. Le transfert des protéines était vérifié en utilisant le Rouge de Ponceau. Les membranes étaient bloquées pendant 1h dans un tampon Tris-HCl de 20 mM (pH 7.4) contenant 0.05% de Tween 20 et 5% de lait séché. Elles étaient ensuite incubées toute la nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire contre les P-glycoprotéines (C129)

préalablement dilué à 1:1000 avec un tampon Tris de 20 mM (pH 7.4) contenant 0.05% de Tween 20 et 1% d'albumine sérique de bœuf. Après cette incubation, les membranes étaient lavées toutes les 10 minutes avec une solution TBS+T (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) pendant 1h avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué à l'alkaline phosphatase (Pierce # 31340). Le complexe immunitaire était révélé avec le réactif de chemiluminescence Plus (NEN, Boston, MA). Le niveau de protéine dans les bandes était déterminé par densitométrie.

Analyse statistique

Les données obtenues pour chaque paramètre étaient analysées statistiquement selon un plan factoriel 2 x 2. La différence entre les groupes était considérée significative si la probabilité était inférieure ou égale à 0.05.

RÉSULTATS

Les résultats présentés dans le tableau 1 montrent que la BSP seule ou sa combinaison avec le manganèse et la bilirubine, ne provoque aucun changement significatif dans le débit biliaire et l'excrétion des acides biliaires, aussi bien chez les souris *mdr2* (-/-) que chez les souris *mdr2* (+/+). De plus, ces traitements ne modifient pas l'excrétion du cholestérol et des phospholipides chez les souris *mdr2* (-/-), mais la réduisent chez les souris *mdr2* (+/+).

Le tableau 2 résume les effets de ces traitements sur la composition lipidique des membranes canaliculaires chez les deux génotypes. La teneur de cholestérol et de phospholipides dans les membranes canaliculaires était augmentée par le traitement combiné Mn-BSP-BR aussi bien chez les souris *mdr2* (-/-) que chez les souris *mdr2* (+/+). Cependant, les ratios cholestérol/phospholipides, sont restés comparables aux valeurs des groupes témoins, chez les deux génotypes (Tableau 2).

L'analyse par électrospray a révélé une similarité entre les phospholipides identifiés dans les membranes canaliculaires (FIG. 1) et sinusoïdales (FIG. 2). Nous avons noté une prépondérance pour les espèces de la phosphatidylcholine, aussi bien chez les souris témoins que chez les souris traitées. Néanmoins, l'intensité de la réponse de ces espèces était modifiée par le traitement. Les intensités de toutes les espèces de la phosphatidylcholine étaient réduites dans les

membranes canaliculaires, pendant qu'elles augmentaient dans les membranes sinusoidales. Par contre, l'intensité des autres phospholipides, notamment deux espèces de la lysophosphatidylcholine (lyso-PC16:0 et lyso-PC18:0) et une espèce de la sphingomyéline (SgM 16:0), étaient augmentées dans les membranes canaliculaires alors qu'elles demeuraient inchangées dans les membranes sinusoidales, suivant le traitement.

La figure 2 montre l'effet du manganèse (Mn), de la bilirubine (BR) ou de la bromosulfophthaléine (BSP) injectés seuls ou en combinaison, sur l'expression des transporteurs P-glycoprotéines dans les membranes canaliculaires. L'évaluation de ces effets était faite par Western blot en utilisant les anticorps C219 qui détectent toutes les P-glycoprotéines. L'immunoblot présente une seule bande dans chaque groupe (FIG. 2A). L'épaisseur et la teneur protéique des bandes étaient similaires entre le groupe Mn et le groupe témoin. Ces paramètres étaient cependant modifiés dans les autres groupes. L'épaisseur de la bande était considérablement réduite dans le groupe BR pendant qu'elle était quasi inexistante dans le groupe Mn-BR et relativement augmentée dans les groupes BSP et Mn-BSP-BR. La réduction dans la teneur protéique était de 63% dans le groupe BR et de 92% dans le groupe Mn-BR, puis l'augmentation était de 38% dans le groupe BSP et de 43% dans le groupe Mn-BSP-BR, comparativement au groupe témoin (FIG. 2B).

DISCUSSION

La cholestase manganèse-bilirubine se caractérise par une augmentation des concentrations de cholestérol et du ratio C/P dans les membranes canaliculaires sans modification de la teneur totale en phospholipide, ni changement dans la composition lipidique des autres membranes hépatocytaires (de Lamirande et al., 1981; Duguay et al., 1998; Akoume et al., 2003). Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que cette particularité peut être associée aux effets du traitement cholestatique Mn-BR sur le profil phospholipidique dans les membranes canaliculaires. De plus, notre étude suggère que l'activation de mdr2 dans les membranes canaliculaires peut prévenir la désorganisation lipidique associée à l'altération du ratio C/P dans ce modèle cholestatique.

Les phospholipides sont connus pour moduler la distribution du cholestérol à travers les différents compartiments cellulaires (Ridgway, 2000), et ont été démontrés être à l'origine de la répartition hétérogène du cholestérol dans les membranes cellulaires (Niu et Litman, 2002). La composition phospholipidique diffère généralement entre les membranes plasmiques, fortement enrichies en cholestérol, et les membranes intracellulaires relativement pauvres en cholestérol (Niu et Litman, 2002). Cette distinction est imputable à la différence entre les espèces de phospholipides au niveau de leur degré d'affinité pour le cholestérol (Higgins et Evans, 1978; Schachter, 1988). La présence de certaines espèces telle que la lysophosphatidylcholine qui a beaucoup d'affinité pour le cholestérol,

favorise particulièrement l'incorporation de celui-ci dans les membranes biologiques (Kitagawa et coll., 1976). Dans la présente étude, nous avons trouvé des intensités élevées de Lyso-PC dans les membranes canaliculaires et sinusoïdales chez les souris traitées avec la combinaison manganèse-bilirubine. Le fait que le degré d'élévation était plus important dans les membranes canaliculaires pourrait expliquer en partie l'accumulation prédominante de cholestérol induite par la combinaison Mn-BR dans ces membranes comparativement aux membranes sinusoïdales.

Il était particulièrement intéressant de voir que l'augmentation de lyso-PC était accompagnée par une augmentation parallèle des intensités de PC dans les membranes sinusoïdales. Ceci, à notre avis, est la conséquence d'une augmentation de l'activité catalytique de la phospholipase A₂ (PA₂). Cette enzyme assure la production de lyso-PC en hydrolysant la PC dans les membranes cellulaires (McKean et coll., 1981). Il est possible que son activité augmente lorsque la PC est en excès dans les membranes cellulaires (McKean et coll., 1981). La réduction de PC notée dans les membranes canaliculaires pourrait être la conséquence d'une dégradation excessive de PC, suggérant une plus grande activation de PA₂ dans ces membranes après le traitement Mn-BR. D'autre part, contrairement aux membranes sinusoïdales, les membranes canaliculaires sont soumises à l'action détergente des acides biliaires présents dans l'espace canaliculaire et qui détachent continuellement les phospholipides et particulièrement la PC (Evans et coll., 1976).

Nous avons récemment trouvé que le traitement Mn-BR réduit les concentrations de cholate dans l'espace canaliculaire, mais augmente la contribution de chénodéoxycholate (Akoume et coll., 2003) qui a des propriétés détergentes plus élevées que cholate (Coleman et Rahman, 1992). Ceci indique que ce traitement renforce l'extraction de la PC. Quelques évidences supportent que les espèces de PC extraites par les acides biliaires au niveau des membranes canaliculaires sont continuellement renouvelées par mdr2 (Frijters et coll., 1999; van Nieuwerk et coll., 1997). Mais, nous avons observé une réduction dramatique de l'expression des P-glycoprotéines dans les membranes canaliculaires suite au traitement Mn-BR. En tenant compte de toutes ces considérations, il pourrait être suggéré que le traitement Mn-BR active la dégradation de PC en lyso-PC et favorise son extraction par les acides biliaires plus détersifs tout en empêchant son remplacement par mdr2 dans les membranes canaliculaires. L'augmentation parallèle de la sphingomyéline (SgM) induite par le même traitement dans ces membranes pourrait être une réaction homéostatique pour compenser la perte importante de PC résultant de la combinaison de ces effets.

Cependant, il est bien connu que le maintien du rapport PC/SgM à un niveau constant dans les membranes canaliculaires est essentiel pour préserver l'homéostasie du cholestérol dans ces membranes. La PC qui est le principal phospholipide destiné à l'excrétion, sert de voie d'élimination pour le cholestérol, tandis que la SgM qui est le principal phospholipide destiné à la structure membranaire, retient le cholestérol dans les membranes. D'autre part, comparativement à la PC, la SgM a une plus grande affinité pour le cholestérol.

Donc, en augmentant le niveau de SgM dans les membranes canaliculaires, le traitement Mn-BR élève la force d'attraction du cholestérol dans ces membranes.

De plus, nous avons récemment trouvé que ce traitement active la synthèse du cholestérol, mais réduit sa dégradation en acide biliaires (Akoume et al., 2003), augmentant de ce fait la disponibilité de ce stérol dans le foie pour sa distribution souscellulaire. Cette disponibilité importante combinée avec l'attraction exercée par la forte teneur de SgM, peut constituer une base solide pour une explication rationnelle de l'accumulation spécifique du cholestérol dans les membranes canaliculaires suivant le traitement Mn-BR.

Nous avons récemment trouvé que l'augmentation du cholestérol menant à l'altération de l'homéostasie suivant le traitement Mn-BR est une conséquence de l'activation de la synthèse par le Mn suivie par l'inhibition de la dégradation par la BR. Par ailleurs, des études antérieures ont démontré que la réponse cholestatique associée à ce traitement peut être prévenue par la bromosulfophthaléine (BSP) lorsque celle-ci est administrée après le Mn et avant la BR (Witzleben et Boyce, 1975; de Lamirande et Plaa, 1978). Dans la présente étude, nous avons trouvé que l'expression des P-glycoprotéines n'était pas affectée par l'injection du Mn, mais était réduite par la BR et augmentée par la BSP. Cette classe de protéines englobe la protéine mdr2 qui garantit l'excrétion du cholestérol et phospholipides. À première vue, l'ensemble de ces données semble indiquer que dans un traitement séquentiel de Mn plus BSP plus BR, l'injection de BSP prévient l'augmentation du cholestérol hépatique qui devrait résulter de l'inhibition de sa dégradation par l'injection subséquente de la BR, en

augmentant préalablement l'excrétion des lipides. Cependant, les faibles concentrations de cholestérol et phospholipides obtenues dans la bile des souris traitées avec la BSP ou la BSP combinée avec Mn et BR, ne soutiennent pas cette hypothèse. De plus, certaines études ont rapporté que BSP réduit l'excrétion du cholestérol et phospholipides, mais n'affecte pas celle des acides biliaires (Shafter et Preshaw, 1981; Yamashita et coll., 1992). Ce découplage est causé par l'interaction entre la BSP et les acides biliaires dans la lumière canaliculaire (Yamashita et coll., 1992). Cette interaction empêche les acides biliaires de détacher les vésicules lipidiques exposées à la face luminale de la membrane canaliculaire pour les dissoudre dans la bile. Donc, l'augmentation des teneurs de cholestérol et phospholipides causée par BSP dans la présente étude, peut être reliée à cette action. Cependant, le fait que cette augmentation était significative chez les souris sauvages et pas chez les souris déficientes en *mdr2*, suggère que *mdr2* pourrait être important dans les mécanismes d'action de la BSP.

La P-glycoprotéine *mdr2* est ancrée dans les membranes canaliculaires où elle transfère continuellement les phospholipides et probablement le cholestérol, du côté intracellulaire vers le côté canaliculaire. Nous avons trouvé que la BSP administrée seule ou en combinaison avec le Mn et BR, augmente aussi bien le cholestérol que les phospholipides dans les membranes canaliculaires, sans affecter le ratio C/P. Il apparaît qu'en augmentant simultanément le cholestérol et les phospholipides, la BSP permet de maintenir la normalité du ratio C/P dans les membranes canaliculaires, évitant de ce fait les modifications de la fluidité et de perméabilité qui pourraient résulter de la désorganisation lipidique associée à

l'altération du ratio C/P dans ces membranes lorsque l'injection de Mn est suivie directement par celle de la BR. Cette présomption supporte que l'augmentation des concentrations de cholestérol dans les membranes canaliculaires soit déterminante dans la séquence d'événements menant à la cholestase Mn-BR.

En conclusion, notre étude indique que le traitement Mn-BR procure à la membrane canaliculaire un profil phospholipidique qui favorise l'incorporation du cholestérol, et suggère que *mdr2* peut être une cible pour la prévention de la réponse cholestatique à ce traitement.

REFERENCES

- Akoume MY, Perwaiz S, Yousef IM, Plaa GL. Synergistic role of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase in the pathogenesis of manganese-bilirubin-induced cholestasis in rats. *Toxicol Sci.* 2003; 73(2):378-385.
- Bartlett, G.R., 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234, 466-468.
- Bloch KE. Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem.* 1983, 14(1):47-92.
- Brügger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F.T., Lehmann, W.D., 1997. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem, mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 2339-2344
- Coleman R, Rahman K. Lipid flow in bile formation. *Biochim Biophys Acta.* 1992, 23; 1125(2):113-133.
- de Lamirande E, Plaa GL. Dose and time relationships in manganese-bilirubin cholestasis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1979, 30; 49(2):257-263.
- de Lamirande E, Tuchweber B, Plaa GL. Hepatocellular membrane alteration as a possible cause of manganese-bilirubin-induced cholestasis. *Biochem Pharmacol.* 1981, 15; 30(16):2305-2312.
- Duguay A, Yousef IM, Tuchweber B, Plaa GL. Alteration of lipid composition of

- hepatic membranes associated with manganese-bilirubin induced cholestasis. *Fundam Clin Pharmacol.* 1998; 12(2):213-219.
- Evans WH, Kremmer T, Culvenor JG. Role of membranes in bile formation. Comparison of the composition of bile and a liver bile-canalicular plasma-membrane subfraction. *Biochem J.* 1976, 15;154(3):589-595.
- Evans E, Needham D. Giant vesicle bilayers composed of mixtures of lipids, cholesterol and polypeptides. Thermomechanical and (mutual) adherence properties. *Faraday Discuss Chem Soc.* 1986;(81):267-280.
- Higgins JA, Evans WH. Transverse organization of phospholipids across the bilayer of plasma-membrane subfractions of rat hepatocytes. *Biochem J.* 1978, 15; 174(2):563-567.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G. R. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Frijters CM, Tuijn CJ, Ottenhoff R, Zegers BN, Groen AK, Elferink RP. The role of different P-glycoproteins in hepatobiliary secretion of fluorescently labeled short-chain phospholipids. *J Lipid Res.* 1999; 40(11):1950-1958.
- Kakis G, Yousef IM. Pathogenesis of lithocholate- and tauroolithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterology.* 1978; 75(4):595-607.
- Kitagawa T, Inoue K, Nojima S. Properties of liposomal membranes containing lysolecithin. *J Biochem (Tokyo).* 1976; 79(6):1123-1133.
- Leonard A, Dufourc EJ. Interactions of cholesterol with the membrane lipid

- matrix. A solid state NMR approach. *Biochimie*. 1991; 73(10):1295-1302.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- McKean ML, Smith JB, Silver MJ. Formation of lysophosphatidylcholine by human platelets in response to thrombin. Support for the phospholipase A2 pathway for the liberation of arachidonic acid. *J Biol Chem*. 1981, 25; 256(4):1522-1524.
- Needham D, Nunn RS. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys J*. 1990; 58(4):997-1009.
- Niu SL, Litman BJ. Determination of membrane cholesterol partition coefficient using a lipid vesicle-cyclodextrin binary system: effect of phospholipid acyl chain unsaturation and headgroup composition. *Biophys J*. 2002; 83(6):3408-3415.
- Plaa GL, de Lamirande E, Lewittes M, Yousef IM. Liver cell plasma membrane lipids in manganese-bilirubin-induced intrahepatic cholestasis. *Biochem Pharmacol*. 1982, 15; 31(22):3698-3701.
- Ridgway ND. Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta*. 2000,12; 1484(2-3):129-141.
- Samuels AM, Carey MC. Effects of chlorpromazine hydrochloride and its metabolites on Mg²⁺- and Na⁺,K⁺-ATPase activities of canalicular-enriched rat liver plasma membranes. *Gastroenterology*. 1978; 74(6):1183-1190.

Shafter EA, Preshaw RM. Effects of sulfobromophthalein excretion on biliary lipid secretion in humans and dogs. *Am J Physiol.* 198; 240(1):85-89.

van Nieuwerk CM, Groen AK, Ottenhoff R, van Wijland M, van den Bergh Weerman MA, Tytgat GN, Offerhaus JJ, Oude Elferink RP. The role of bile salt composition in liver pathology of *mdr2 (-/-)* mice: differences between males and females. *J Hepatol.* 1997; 26(1):138-145.

Witzleben CL, Boyce WH. Bilirubin as a cholestatic agent. III. Prevention of bilirubin-related cholestasis by sulfobromophthalein. *Arch Pathol.* 1975; 99(9):492-495.

Yamashita G, Tazuma S, Kajiyama G. Effect of anions on biliary lipid secretion in rats. Importance of association with biliary lipid structures. *Biochem. J.* 1992; 286 : 193-196.

Tableau 1 : Effet de la BSP et de sa combinaison avec le manganèse et la bilirubine sur le débit biliaire et l'excrétion des lipides, chez les souris mdr2 (-/-) et mdr2 (+/+).

	mdr2 (-/-)				mdr2 (+/+)			
	Tém	Mn-BR	BSP	Mn-BSP-BR	Tém	Mn-BR	BSP	Mn-BSP-BR
Débit μL/min/100g	12.5 ± 1.1	6.3 ± 0.5**	10.2 ± 0.7	9.9 ± 0.8	7.5 ± 0.7	3.7 ± 0.3**	6.2 ± 0.7	6.1 ± 0.5
Acides biliaires nmol/min/100g	341 ± 25	185 ± 22**	338 ± 18	332 ± 24	311 ± 23	155 ± 22**	308 ± 25	302 ± 21
Cholestérol nmol/min/100g	0.12 ± 0.04	0.09 ± 0.03	0.10 ± 0.05	0.09 ± 0.03	2.83 ± 0.15	0.18 ± 0.07**	0.32 ± 0.11**	0.25 ± 0.10**
Phospholipide nmol/min/100g	1.52 ± 0.71	1.49 ± 0.65	1.38 ± 0.70	1.31 ± 0.68	28.63 ± 2.12	5.62 ± 1.92**	6.87 ± 1.88**	7.12 ± 1.79**

- Les valeurs sont la moyenne de six échantillons ± l'écart type dans chaque groupe.
- Les étoiles indiquent les groupes qui diffèrent du groupe contrôle de façon significative ($p < 0.01$).

TABLEAU 2 : Effet de la BSP et de sa combinaison avec le manganèse et la bilirubine sur la composition lipidique des membranes canaliculaires, chez des souris *mdr2* (-/-) et *mdr2* (+/+).

	<i>mdr2</i> (-/-)			<i>mdr2</i> (+/+)		
	Cholestérol	Phospholipide	C/P	Cholestérol	Phospholipide	C/P
Témoin	0.13 ± 0.01	0.50 ± 0.17	0.26 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.55 ± 0.30	0.25 ± 0.07
Mn-BR	0.26 ± 0.02**	0.73 ± 0.20	0.35 ± 0.05**	0.26 ± 0.03**	0.72 ± 0.06	0.36 ± 0.05**
BSP	0.15 ± 0.01	0.65 ± 0.18	0.23 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.92 ± 0.04**	0.23 ± 0.05
Mn-BSP-BR	0.21 ± 0.01**	0.76 ± 0.22	0.28 ± 0.05	0.25 ± 0.02**	1.04 ± 0.06**	0.24 ± 0.05

- Les valeurs sont la moyenne de six échantillons ± l'écart type et sont exprimées en µmol/mg de protéines pour le cholestérol (C) et les phospholipides (P).
- Les étoiles indiquent les groupes qui diffèrent du groupe témoin de façon significative (p < 0.01)

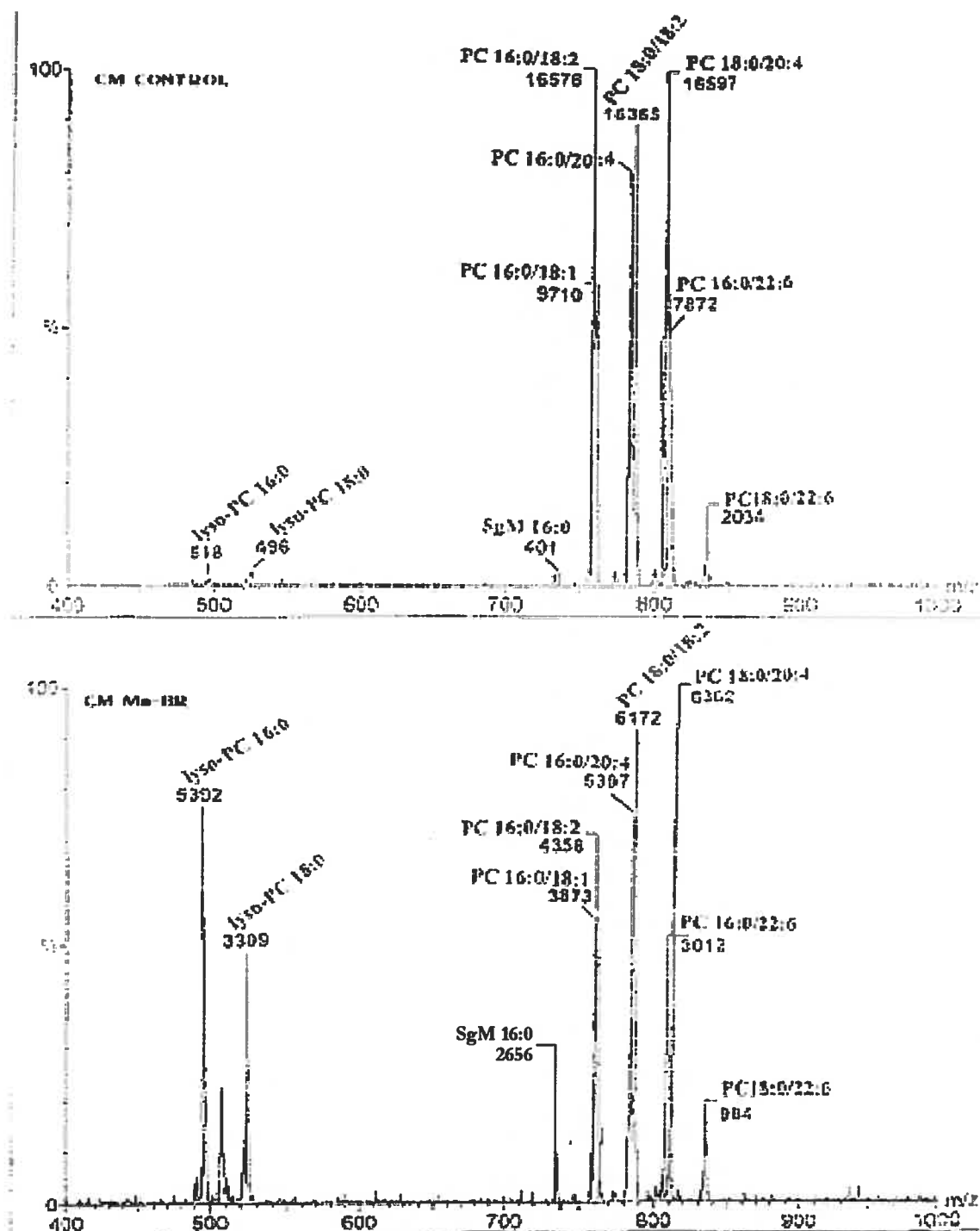


FIGURE 1A: Effet de la combinaison manganèse-bilirubine sur le profil des phospholipides dans les membranes canaliculaires (MC). Les intensités des espèces de lyso-phosphatidylcholine (lyso-PC 16:0; lyso-PC 18:0), de sphingomyéline (SgM 16:0) et de phosphatidylcholine (PC 16:0/18:2; PC 16:0/20:4; PC 16:0/18:1; PC 18:0/18:2; PC 16:0/22:6; PC 18:0/20:4; PC 18:0/22:6), sont référées par le nombre en dessous de chaque espèce identifiée sur chaque pic.

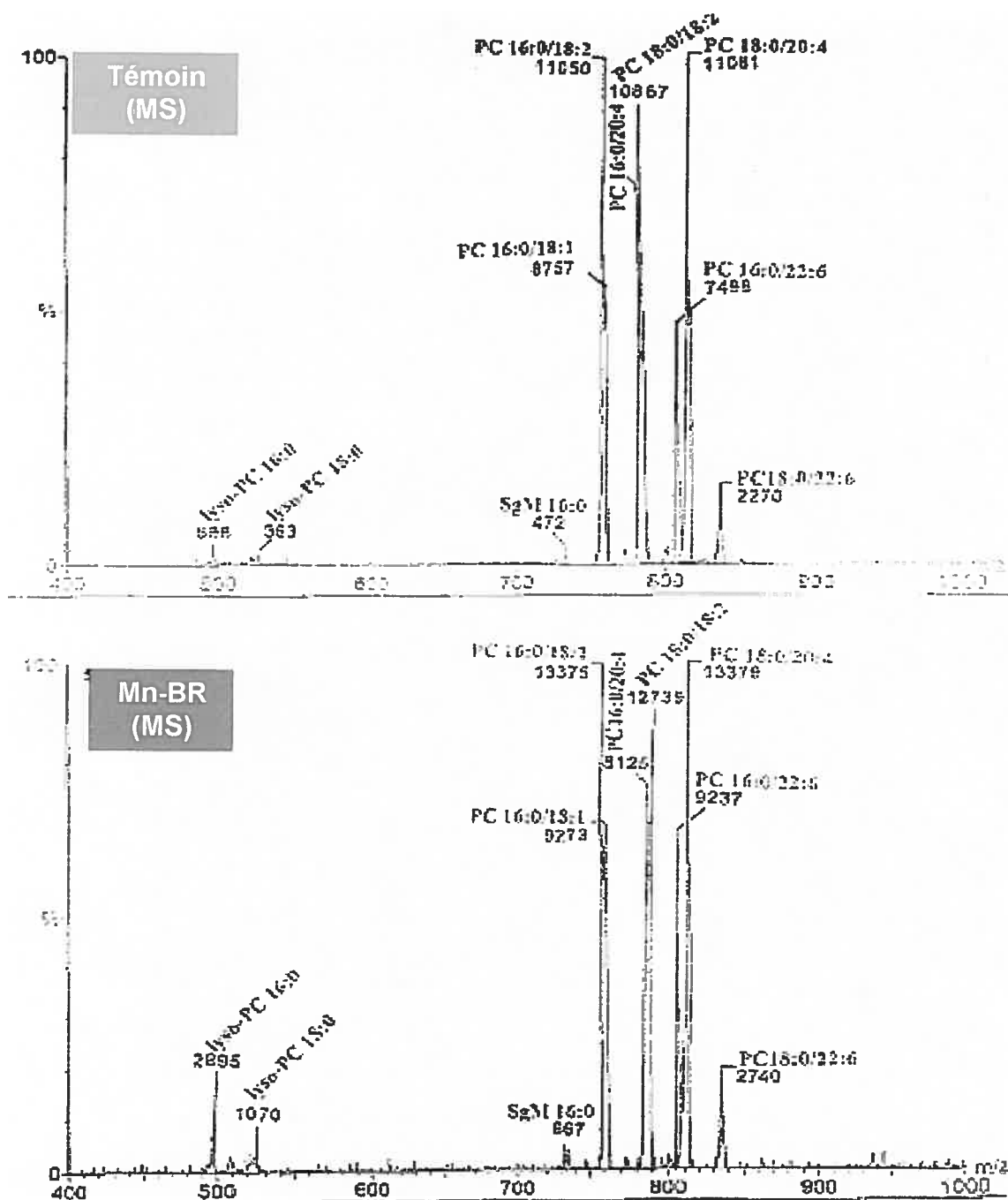


FIGURE 1B: Effet de la combinaison manganèse-bilirubine sur le profil des phospholipides dans les membranes sinusoïdales (MS). Pour la légende du spectre, voir la description de la figure précédente.

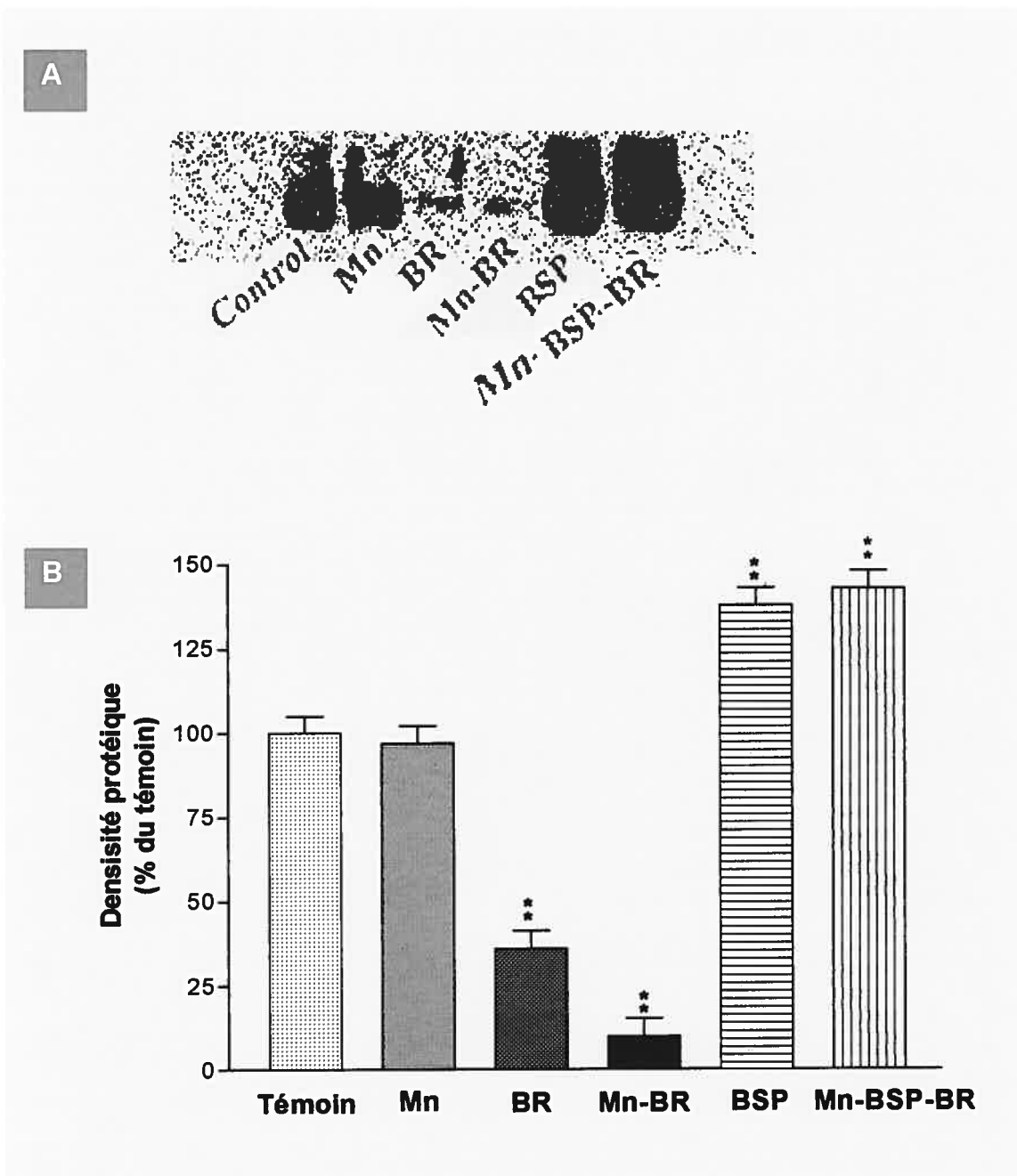


FIGURE 2: Effet des différents traitements sur l'expression des P-glycoprotéines dans les membranes canaliculaires. L'isolation des membranes était effectuée tel que décrit par Duguay et coll. (1998), et le Western blot était réalisé suivant le protocole fourni par Bio-Rad. L'immunoblot (A) était obtenu en utilisant l'anticorps primaire C219, qui détecte toutes les P-glycoprotéines. La teneur des protéines (B) était déterminée par analyse densitométrique de l'immunoblot. Les valeurs sont la moyenne de quatre échantillons dans chaque groupe et sont exprimées en pourcentage par rapport au groupe Témoin. Les étoiles indiquent les groupes qui diffèrent du groupe contrôle de façon significative ($p < 0.01$).

DISCUSSION GÉNÉRALE

Le caractère aberrant du cholestérol pour la santé est bien connu pour son rôle central dans la pathogenèse de l'athérosclérose, des calculs biliaires, de la maladie des amygdales oranges et de l'hypercholestérolémie familiale. Depuis quelques années, l'implication capitale de ce composé dans le développement de la cholestase est aussi rapportée. Notre intérêt à mieux comprendre les événements associés à ce phénomène pourrait contribuer à l'élaboration d'un traitement rapide et efficace ou d'une prévention thérapeutique de la cholestase chez des patients recevant des médicaments qui ont des potentiels cholestatiques.

Nous avons choisi de travailler avec le modèle cholestatique manganèse-bilirubine dans le but de mieux concevoir le processus mécanistique associé à la cholestase résultant d'une interaction entre deux produits non cholestatiques. Les résultats obtenus nous ont permis d'apporter des précisions importantes au sujet de l'interaction entre le manganèse et la bilirubine en rapport avec le cholestérol. La validité de nos conclusions repose avant tout sur les moyens déployés pour l'acquisition des résultats et sur l'interprétation de ces résultats quant à leur portée physiopathologique. Nous présentons ici une synthèse globale sur ces aspects tels que publiés à l'issue de nos travaux.

A- CONSIDÉRATIONS MÉTHODOLOGIQUES

L'impact de tout résultat expérimental doit être mis en contexte de la méthodologie analytique et/ou des modèles animaux utilisés. Étant donné que ces éléments constituent la base dans l'évaluation des activités métaboliques du foie, leur choix fut la première préoccupation du présent travail dont l'hypothèse s'articule autour du métabolisme du cholestérol dans le foie.

a- Méthodes analytiques

La détermination des concentrations totales d'acides biliaires, de cholestérol et de phospholipides, était réalisée avec des méthodes colorimétriques standard. Ces méthodes ont fait preuve de rapidité et fiabilité et sont couramment utilisées dans des laboratoires de recherche. Leur nombre restreint facilite le choix de la méthodologie analytique pour la quantification des lipides dans les fluides biologiques. Par contre, les méthodes pour explorer les activités métaboliques du foie sont aussi nombreuses que les processus biogéniques et catalytiques qui y trouvent leur siège. On trouve particulièrement des techniques de grande spécificité, mais de peu de sensibilité, ce qui limite fortement leur intérêt.

Un des freins majeurs à l'étude des effets des substances chimiques sur les voies métaboliques du cholestérol réside dans le fait que les méthodes analytiques employées nécessitent des protocoles comportant plusieurs étapes pour la préparation de l'échantillon. Ces méthodes sont souvent longues, coûteuses et peu automatisables.

Dans l'optique de disposer d'une méthode compatible avec les exigences de rapidité et sensibilité, nous avons entrepris de développer une méthode chromatographique qui simplifie l'évaluation simultanée de deux enzymes clés dans le métabolisme du cholestérol, notamment HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase, en quantifiant mévalonolactone et 7 α -hydroxycholestérol qui sont respectivement leurs produits de réaction. L'originalité de cette méthode (Article 1), réside dans la combinaison de plusieurs caractéristiques simples. Ces caractéristiques incluent une seule incubation pour les deux enzymes, la séparation et la purification des produits de réaction par extraction solide sur les cartouches cyanopropyl, la quantification par spectrométrie de masse en tandem et l'ionisation par électrospray.

La mise au point de cette méthode s'est faite à partir de la modification d'un protocole qui préconise une extraction solide avec divers types de cartouches et une dérivation des analytes pour les rendre volatiles pour leur analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Honda et coll., 1991). La complexité de la préparation des échantillons et un temps considérable pour l'analyse, constituent des inconvénients réels qui rendent l'approche par chromatographie gazeuse très laborieuse. L'approche présentée dans la présente étude élimine ces inconvénients.

Le principal avantage de notre approche est la réalisation de mesure par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide de haute

performance via une interface d'ionisation électrospray. L'utilisation d'un tel système ne requière pas une dérivation préalable des analytes et prend seulement 5 min pour l'analyse. Les analytes étaient identifiés par leur masse moléculaire. Notre détecteur de masse était muni d'un analyseur quadripolaire qui permet de filtrer les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Nous avons sélectionné les fragments d'ions de plus grande intensité pour identifier mévalonolactone et 7 α -hydroxycholestérol.

Le principe de quantification était basé sur la comparaison des aires des pics correspondant à ces produits avec celles de leurs produits de référence introduits à une concentration connue dans l'échantillon. Contrairement à 7 α -hydroxycholestérol, le produit de référence couramment utilisé pour mévalonolactone n'est pas commercialement disponible et est très difficile à synthétiser. Pour palier à cet inconvénient, nous avons convenu de trouver un produit de référence alternatif. Pour ce faire, nous avons acétylé mévalonolactone suivant un procédé simple et rapide. Le produit obtenu était naturellement inexistant dans la préparation microsomale et était parfaitement séparé de mévalonolactone par chromatographie, avec un temps de rétention bien distinct. De plus, les deux produits se comportaient de la même façon durant la préparation de l'échantillon. Ils étaient extraits avec les mêmes solvants. Ce qui indique que ce produit est un bon standard interne pour la quantification de mévalonolactone.

Pour séparer mévalonolactone et 7 α -hydroxycholestérol, nous avons simplifié la procédure d'extraction de ces produits en remplaçant les différents types de cartouches habituellement requis, par la cartouche cyanopropyl. Cette cartouche est dotée d'un support en silice modifié avec des groupes hydroxyls. Cette caractéristique lui confère la capacité d'extraire les solutés non polaires d'une matrice aqueuse et les solutés polaires d'une matrice non-aqueuse. Ainsi, mévalonolactone qui est très polaire, et 7 α -hydroxycholestérol qui est plutôt considéré apolaire à cause de ses noyaux stérols, étaient aisément séparés et purifiés sur cette cartouche. Avec les solutions matricielles et les solvants d'élution choisis, nous avons minimisé les pertes et avons obtenu d'excellents rendements pour les deux produits. L'utilisation de cette cartouche pour faire aussi bien l'extraction que la purification, a beaucoup simplifié la préparation pré-analytique des échantillons.

Notre approche analytique était validée en comparant les résultats obtenus avec ceux acquis par la technique conventionnelle de chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Nous avons constaté que les différences entre les deux méthodes n'étaient pas statistiquement significatives, mais le temps d'acquisition des données était considérablement réduit lorsque l'analyse était effectuée avec notre approche par électrospray couplé à la spectrométrie de masse en tandem.

b- Modèles animaux

Le rat a initialement été choisi comme modèle expérimental car c'est la seule espèce animale qui a toujours été utilisée pour étudier la pathogenèse de la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine. Il était primordial de recourir à cette espèce pour reproduire les données qui constituent la base de notre hypothèse de travail et amorcer la vérification de cette hypothèse (Article 2). La clarification de certains volets nécessitait l'utilisation de certains modèles transgéniques.

Cependant, à cause de la complexité génomique des rats, ces modèles ne sont pas générés avec cette espèce animale, mais sont disponibles uniquement avec les souris. Pour recourir à ces souris génétiquement modifiées, il a fallu d'abord vérifier si la combinaison manganèse-bilirubine peut induire la cholestase chez les souris normales. L'expérience menée à cet effet (Article 3) a révélé que la combinaison manganèse-bilirubine diminue temporairement le flux biliaire et les concentrations biliaires du cholestérol, des phospholipides et des acides biliaires chez les souris avec un retour vers des valeurs se rapprochant de la normale au bout de trois heures. La réduction maximale dans ces paramètres était observée 45 min après l'injection de la bilirubine précédée par celle du manganèse. L'analyse du sang durant cette période a révélé une réduction des concentrations plasmatiques pour les acides biliaires et une augmentation pour le cholestérol et les phospholipides. Ces changements étaient similaires à ceux induits par ce

traitement chez les rats, et indiquaient que la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine chez le rat est reproductible chez la souris.

Toutefois, la dose requise pour induire la cholestase chez les souris suggère que les souris sont plus sensibles à la combinaison manganèse-bilirubine que les rats. En effet, la dose cholestatique chez les souris était à peine de 2 mg de Mn/kg plus 15 mg de BR/kg, alors qu'elle atteignait 4.5 mg de Mn/kg plus 25 mg de BR/kg chez les rats. Mais malgré cela, la magnitude et la durée de la phase cholestatique aiguë, tout comme les changements physiologiques associés à cette phase, étaient comparables chez les deux espèces. Ces résultats nous ont amené à conclure que la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine chez le rat, est reproductible chez la souris. Par conséquent, la souris peut être utilisée, au même titre que le rat, pour élucider le processus mécanistique de la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine.

Il pourrait être intéressant d'évaluer ce modèle cholestatique chez d'autres espèces comme le hamster, le porc et le lapin qui sont aussi parfois utilisées pour étudier la pathogenèse de certaines formes de cholestase induite par des substances chimiques. Le hamster serait particulièrement intéressant dans la mesure où la pathogenèse de la cholestase manganèse-bilirubine implique le cholestérol et que, pour des investigations sur le métabolisme du cholestérol, cette espèce permet une meilleure extrapolation à l'humain.

B- CONSIDÉRATIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES

Le cholestérol est bien connu de créer des conditions pathologiques lorsque ses concentrations dans l'organisme excèdent les niveaux physiologiques. Les études antérieures traitant de l'étiologie de la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine ont rapporté que le traitement séquentiel de manganèse et bilirubine augmente les concentrations de cholestérol dans le foie, résultant en sa redistribution et à une élévation du rapport cholestérol sur phospholipides dans les membranes canaliculaires. Ce changement peut être associé à la baisse de fluidité et de perméabilité membranaire ainsi qu'à la dilatation du canalicule et à la perte des microvillosités induite par le même traitement. La conséquence immédiate de telles modifications est une diminution du débit biliaire, qui est le signe caractéristique de la cholestase. Il fut alors suggéré que le cholestérol peut être déterminant dans l'initiation de la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine.

Les études effectuées au cours du présent travail nous ont permis de consolider cette hypothèse et d'avoir une meilleure idée sur les interactions possibles entre le manganèse et la bilirubine relatives à l'implication du cholestérol dans la pathogenèse de la cholestase chez ce modèle expérimental. Les points principaux se dégageant de ces études seront d'abord présentés, pour finalement proposer un modèle représentatif des mécanismes impliqués dans le mode d'action de la combinaison manganèse-bilirubine.

a- La place du cholestérol dans le processus pathogénique de la cholestase manganèse-bilirubine

Bien que le processus pathogénique du syndrome cholestatique ne soit pas encore clairement établi, les altérations associées à ce phénomène engagent principalement les membranes canaliculaires. Des changements morphologiques de ces membranes ont été mis en évidence avec divers modèles de cholestase expérimentale (Kakis et Yousef, 1978; Simon et coll., 1980; Plaa et coll., 1982; Yousef et coll., 1988). La désorganisation moléculaire a antérieurement été proposée pour expliquer ces changements dans le modèle manganèse-bilirubine (de Lamirande et coll., 1981; Plaa et coll., 1982; Duguay et coll., 1998; Plaa et coll., 1998). Cette désorganisation peut résulter d'une destruction des composantes protéiques ou d'une modification des composantes lipidiques. Nous avons alors examiné l'effet de la combinaison manganèse-bilirubine sur ces composantes, afin de clarifier la contribution du cholestérol dans l'altération de l'organisation moléculaire associée à la cholestase dans ce modèle expérimental. Nos résultats montrent que la combinaison manganèse-bilirubine n'affecte pas la composition protéique de ces membranes, mais modifie leur composition lipidique.

Les lipides sont connus de constituer la structure de base des membranes biologiques et d'être responsables de leur fluidité. Cette dernière est un paramètre essentiel pour le fonctionnement adéquat d'une cellule. Il a été démontré que les changements dans la fluidité des membranes peuvent perturber la structure cellulaire ainsi que plusieurs activités métaboliques importantes (Keefe et coll.,

1979; Helmreich et Elson, 1984), et altérer l'intégrité fonctionnelle des membranes (Linden et coll., 1973; Mahler et coll., 1988). Duguay et collaborateurs (2000) ont rapporté que la combinaison manganèse-bilirubine diminue la fluidité des membranes canaliculaires. Les résultats obtenus dans la présente étude suggèrent que cet effet peut être imputable au cholestérol. En effet, il est connu que la fluidité peut être affectée par la perturbation du niveau de cholestérol et par les changements dans la longueur et le degré de saturation des chaînes latérales des phospholipides membranaires (Yamada et Lieber, 1984). Cependant, au cours de notre étude, aucun changement associé au traitement combiné manganèse-bilirubine n'a été noté dans les acides gras identifiés en positions 1 et 2 dans toutes les espèces de phospholipides repérées dans les membranes canaliculaires (Article 4, FIG. 1A). Par contre, ce traitement a doublé la concentration de cholestérol dans les membranes canaliculaires sans modifier significativement leurs teneurs en phospholipides, augmentant de ce fait leur ratio cholestérol/phospholipides. Il a été démontré que ce ratio est inversement proportionnel à la fluidité de diverses membranes biologiques (van Blitterswijk et coll., 1987; Chen et coll., 1999). Conséquemment, un excès de cholestérol dans une membrane réduit sa souplesse et sa mobilité.

En effet, le cholestérol est constitué de plusieurs anneaux qui lui confèrent une structure plane et rigide (Van der Meer, 1991). Ce lipide est bien connu d'avoir un effet condensateur lorsqu'il s'insère dans une bicouche de phospholipides. En se liant avec son groupement hydroxyle au niveau de la partie

polaire des phospholipides, laissant son corps hydrophobe au contact des chaînes d'acides gras (Demel, 1977; Yeagle, 1985), le cholestérol force les queues hydrophobes des phospholipides dans une configuration cis et crée une zone hydrophobique plus épaisse au sein de la membrane. Cette position lui permet de renforcer la solidité des membranes (Van der Meer, 1991). Mais en cas d'excès, le cholestérol peut altérer la stabilité mécanique et modifier la viscosité des membranes biologiques, affectant par là leur fonction (Singer et Nicolson, 1972).

Avec nos résultats, il devient clair qu'après le traitement combiné manganèse-bilirubine, l'accumulation du cholestérol dans les membranes canaliculaires est le principal facteur modulant leur fluidité, et par conséquent le facteur déterminant dans l'altération de l'intégrité fonctionnelle des membranes canaliculaires associée à ce traitement et menant à la cholestase.

Bien que le dysfonctionnement des membranes sinusoidales dû à l'augmentation de leur teneur en cholestérol a été identifié comme un facteur important dans le développement de la cholestase induite par les oestrogènes (Davis et coll., 1978; Rosario et coll., 1988; Smith et Gordon, 1988; Reichen et Simon, 1994), les données disponibles sur l'étiologie de la cholestase induite par le traitement combiné manganèse-bilirubine montrent que ce traitement n'affecte pas le niveau basal de cholestérol dans les membranes sinusoidales mais augmente ce paramètre uniquement dans les membranes canaliculaires. Les études entreprises au cours de nos travaux pour comprendre le rationnel d'une telle

spécificité ont révélé que le traitement manganèse-bilirubine change remarquablement les proportions des espèces de phospholipides dans les membranes canaliculaires mais pas dans les membranes sinusoidales. En effet, nous avons trouvé que le traitement manganèse-bilirubine a considérablement augmenté la teneur des membranes canaliculaires en sphingomyéline et lysophosphatidylcholine et a dramatiquement réduit leur teneur en phosphatidylcholine (Article 4, FIG 1A & 1B).

Comme pour toutes les membranes biologiques, la sphingomyéline et la phosphatidylcholine constituent les principaux phospholipides des membranes canaliculaires (Higgins et Evans, 1978; Schachter, 1988), au sein desquelles le cholestérol se trouve réparti dans deux régions bien distinctes, dont une région riche en sphingomyéline qui confère la rigidité à la membrane, et une région riche en phosphatidylcholine qui sert de voie d'élimination du cholestérol dans la bile (Nibbering et coll., 2001). Les acides biliaires qui assurent l'extraction des lipides membranaires pour leur élimination dans la bile, interagissent préférentiellement avec la région riche en phosphatidylcholine (Cohen et coll., 1990). Ainsi, en diminuant la teneur de phosphatidylcholine dans la membrane canaliculaire, la combinaison manganèse-bilirubine limite l'extraction du cholestérol membranaire. Par ailleurs, la sphingomyéline a une plus grande affinité pour le cholestérol comparé à la phosphatidylcholine (Demel et coll., 1977; Lund-Katz et coll., 1988; Slotte, 1995). Conséquemment, une augmentation de sphingomyéline dans la membrane canaliculaire associée à une diminution de phosphatidylcholine peut

provoquer une forte attraction du cholestérol vers la région riche en sphingomyéline et favoriser la rétention du cholestérol dans la membrane. D'autre part, Kitagawa et collaborateurs (1976) ont démontré que la présence de lysophosphatidylcholine dans les membranes biologiques augmente leur teneur en cholestérol. À cet égard, nos résultats suggèrent que le traitement manganèse-bilirubine procure aux membranes canaliculaires un profil de phospholipides qui favorise l'incorporation du cholestérol dans ces membranes.

Duguay et collaborateurs (2000) ont démontré que l'accumulation du cholestérol occasionnée par le traitement manganèse-bilirubine au sein des membranes canaliculaires, affecte plus particulièrement les régions hydrophiles. Selon le modèle structural de la mosaïque proposé par Singer et Nicolson (1972), ces régions sont exposées vers les cotés intra- et extra-cellulaires des membranes biologiques. Il est bien connu que le cholestérol présent dans le côté extracellulaire de la membrane canaliculaire est continuellement enlevé avec la phosphatidylcholine par les acides biliaires présents dans la lumière canaliculaire (Crawford et coll., 1997). Quelques évidences indiquent que la phosphatidylcholine ainsi extraite est constamment renouvelée par la protéine mdr2 (Frijters et coll., 1999; van Nieuwerk et coll., 1997). Nous avons trouvé que le traitement manganèse-bilirubine réduit l'expression de cette protéine (Article 4, FIG. 2) mais n'affecte pas l'excrétion des acides biliaires mono- et di-hydroxylés (Article 2, Tableau 2). Ces acides biliaires ont des propriétés détergentes très élevées et sont connus d'être plus toxiques pour les membranes canaliculaires comparés aux

acides biliaires tri-hydroxylés (Coleman et Rahman, 1992), dont l'excrétion s'est avérée abaissée après le traitement manganèse-bilirubine.

La combinaison de nos données avec les observations de Duguay peut amener à spéculer que le traitement manganèse-bilirubine favorise l'extraction de la phosphatidylcholine des membrabes canaliculaires et empêche le renouvellement des entités perdues dans les régions hydrophobiques vers le coté canaliculaire. Conséquemment, l'incorporation de la sphingomyéline se fait dans ces régions pour compenser la perte de phosphatidylcholine, attirant de ce fait le cholestérol dans les dites régions. Ceci peut expliquer la plus grande rigidité observée par Duguay dans ces régions. Mais à cause de la faible capacité des acides biliaires à dissocier la liaison entre le cholestérol et la sphingomyéline (Cohen et coll., 1990), l'excrétion du cholestérol se retrouve abaissée.

Il était particulièrement intéressant d'observer une similarité dans les variations temporelles du débit biliaire et de l'excrétion du cholestérol après le traitement manganèse-bilirubine (Article 3, FIG. 1C). La diminution du débit biliaire et celle de l'excrétion du cholestérol étaient significatives dans les mêmes périodes, et le retour vers le niveau basal s'effectuait dans les mêmes temps. Un parallélisme était observé entre le patron temporel de ces deux paramètres après le traitement manganèse-bilirubine. Ce traitement semble aussi perturber la relation usuelle entre les acides biliaires et l'excrétion des lipides biliaires. Nous avons trouvé une diminution partielle de l'excrétion des acides biliaires et une

réduction dramatique de celle du cholestérol et des phospholipides (Article 3, FIG. 2). Un tel phénomène semble indiquer que la diminution du débit biliaire associée à ce traitement n'est pas due à une baisse de l'attraction osmotique. Cette présomption suppose que la diminution de la quantité de fluide dans les canaux biliaires après un traitement manganèse-bilirubine résulterait d'une résistance accrue de la membrane canaliculaire au passage de l'eau et que cette diminution serait reliée à une inhibition du débit biliaire indépendant des acides biliaires (Ayotte et Plaa, 1986). L'ensemble de ces données constitue une base solide pour soutenir que l'accumulation du cholestérol dans les membranes canaliculaires est le facteur responsable de la diminution du débit biliaire.

b- Changements dans le métabolisme du cholestérol en relation avec la cholestase manganèse-bilirubine

Le métabolisme du cholestérol est une manœuvre physiologique se déroulant essentiellement dans le foie. Il consiste en la synthèse du cholestérol et en sa dégradation en acides biliaires. Ces deux événements sont intimement liés et constituent les principales épreuves qui préservent le cholestérol à des niveaux physiologiques dans le foie. Bien que le cholestérol soit indispensable à diverses fonctions cellulaires, le cholestérol synthétisé dans le foie est principalement utilisé pour la synthèse des acides biliaires. Une augmentation de la synthèse ou une inhibition de la dégradation peut augmenter la disponibilité hépatique du cholestérol pour sa redistribution et changer ses teneurs dans les différents compartiments cellulaires. Une relation directe a été démontrée entre

l'accumulation du cholestérol dans les membranes canaliculaires et une synthèse excessive de cholestérol dans certaines formes de cholestase expérimentale, dont celle induite par l'acide lithocholique (Yousef et coll., 1988). Les travaux de Yousef et ses associés (Kakis et Yousef, 1978; Kakis et Yousef, 1980; Yousef et Tuchweber, 1984; Yousef et coll., 1988; Yousef et coll., 1998) sur l'étiologie de cette cholestase ont d'ailleurs permis de mettre en relief une cascade d'événements pathogéniques dont l'augmentation de la synthèse de novo du cholestérol constitue l'étape initiale. Ces travaux et d'autres études effectuées avec le modèle alpha-naphtyle isothiocyanate (Chisholm et coll., 1999), suggèrent que l'initiation du syndrome cholestatique induit par les substances chimiques soit spécifiquement causée par une augmentation de la synthèse du cholestérol. La reconnaissance de cette spécificité comme une caractéristique générale du syndrome cholestatique est toutefois controversée dans le modèle manganèse-bilirubine. Cette controverse repose principalement sur le fait que le cholestérol accumulé dans les membranes canaliculaires est nouvellement synthétisé, alors que l'activité de l'enzyme qui catalyse l'étape limitante dans la synthèse du cholestérol n'est pas augmentée (Duguay et coll., 2000). Ceci complique la compréhension des mécanismes de la cholestase induite par le traitement combiné manganèse-bilirubine. Nous nous sommes intéressés à cette problématique et avons émis l'hypothèse que l'augmentation du cholestérol dans le foie pourrait résulter d'une inhibition de sa conversion en acide biliaire. Nos résultats supportent une telle hypothèse et confirment que le cholestérol qui

s'accumule dans les membranes canaliculaires est le cholestérol nouvellement synthétisé.

Il est bien établi que la conversion du cholestérol en acides biliaires constitue la principale voie métabolique qui réduit les concentrations de cholestérol dans l'organisme. Cette conversion se fait selon deux voies dont la voie classique initiée par la cholestérol 7 α -hydroxylase et la voie alternative initiée par la cholestérol 27-hydroxylase. Ces deux voies métaboliques conduisent respectivement à une synthèse préférentielle de cholate ou de chénodéoxycholate. Il a été démontré que cholate est formé principalement à partir du cholestérol nouvellement synthétisé dans le foie, et que chénodéoxycholate est issu de la transformation du cholestérol préformé, provenant principalement du milieu extrahépatique (Scheiber et coll., 1993). La quantification de ces deux acides biliaires peut donc renseigner sur la source du pool de cholestérol utilisé pour la synthèse des acides biliaires dans le foie.

En général, le pool hépatique des acides biliaires est approvisionné par la synthèse et la circulation entérohépatique des acides biliaires. Pour caractériser spécifiquement les changements métaboliques associés au traitement combiné manganèse-bilirubine chez le rat, nous avons interrompu la circulation entérohépatique en canulant le canal cholédoque deux heures avant le traitement. Cette durée a été prouvée suffisante pour épuiser le pool hépatique des acides

biliaires chez cette espèce (Smit et coll., 1990). À partir de cet instant, tous les acides biliaires excrétés dans la bile sont, par définition, nouvellement synthétisés.

Nous avons trouvé que la combinaison manganèse-bilirubine réduit uniquement les concentrations biliaires de cholate, mais ne cause aucun changement dans les concentrations biliaires de tous les autres acides biliaires, dont chénodéoxycholate et même les acides biliaires les plus hydrophiles comme les muricholates qui sont excrétés dans la bile par les mêmes transporteurs que cholate. Ces résultats suggèrent que ce traitement altère la synthèse des acides biliaires plutôt que leur excrétion, et indique que cette altération se produit dans la voie classique de la synthèse des acides biliaires. Un tel effet peut augmenter la disponibilité hépatique du cholestérol nouvellement synthétisé. Le fait que les concentrations biliaires de chénodéoxycholate ne soient pas augmentées suggère que ce cholestérol n'était pas utilisé dans la voie alternative. Sur la base de ces données, il nous paraît logique de spéculer qu'après le traitement combiné manganèse-bilirubine, le cholestérol nouvellement synthétisé n'est pas dégradé. Il s'accumule dans le foie et se redistribue à travers les différents compartiments cellulaires, ce qui peut augmenter sa contribution dans la teneur totale de cholestérol au sein des membranes canaliculaires.

En utilisant le cholestérol marqué, Duguay et collaborateurs (2000) ont été les premiers à postuler que le cholestérol retrouvé en quantité considérable dans les membranes canaliculaires suite au traitement combiné manganèse-bilirubine,

pourrait être principalement le cholestérol nouvellement synthétisé. Notre approche par analyse des acides biliaires supporte une telle éventualité. Cependant, il a été rapporté que ce traitement inhibe l'activité de HMG-CoA réductase (Duguay et coll., 2000), l'enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol; ceci suggère une inhibition de la synthèse de novo.

À première vue, ces événements occasionnés par la combinaison manganèse-bilirubine paraissent incohérents. Pour apporter plus de clarté et faciliter l'appréciation des interactions possibles, nous avons jugé la pertinence d'examiner les effets de chaque composante de la combinaison sur les activités de HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase, qui sont respectivement les enzymes clés dans la synthèse et la dégradation du cholestérol. Nous avons trouvé que le manganèse active les deux enzymes et cette activation diminue avec le temps; tandis que la bilirubine réduit l'activité de cholestérol 7 α -hydroxylase, mais n'a aucun effet sur HMG-CoA réductase. Cette spécificité d'action peut être attribuée aux propriétés chimiques de ces composés ou à la structure des enzymes. En effet, cholestérol 7 α -hydroxylase est une hémoprotéine de la famille des cytochromes p450 (Nelson et coll., 1993). Elle contient un noyau tétrapyrrolique qui complexe un atome de fer pouvant passer de l'état ferreux (Fe^{2+}) à l'état ferrique (Fe^{3+}) de manière réversible. Cette particularité lui confère la capacité de fixer la bilirubine qui est connue de former les complexes avec les ions divalents. Une telle liaison peut modifier l'activité de cholestérol 7 α -hydroxylase. Ce qui n'est pas le cas pour HMG-CoA réductase qui est une P-

glycoprotéine dont la structure est faite uniquement de chaînes polypeptidiques (Istvan et coll., 2000). Néanmoins, l'activation de ces deux enzymes requiert la présence de co-facteurs (Ozasa and Boyd, 1981; Istvan et coll., 2000). Ces co-facteurs sont pour la plupart des ions métalliques, sans lesquels beaucoup d'enzymes restent inactifs. Dans le processus réactionnel, les ions métalliques se lient à l'enzyme et participe à la fois à la reconnaissance et à la transformation catalytique du substrat. Leur fixation à la protéine enzymatique joue souvent un rôle structural en stabilisant une conformation efficace du centre actif (Weil, 1987). Les ions qui participent le plus souvent comme co-facteurs dans les réactions biologiques sont des ions divalents, incluant le Zn^{2+} , le Ca^{2+} et le Mg^{2+} (Weil, 1987). En comparaison, le manganèse se présente aussi sous forme divalente dans son état ionique. Il est possible qu'il serve de co-facteur à HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase. À cet égard, il est approprié qu'une injection d'une quantité importante de manganèse amplifie leurs activités.

À partir de ces données, il n'est pas surprenant que les activités de ces deux enzymes soient réduites par un traitement séquentiel de manganèse plus la bilirubine, comme nous l'avons observé au cours de cette étude. Il apparaît que, dans un tel traitement, l'injection du manganèse augmente la synthèse ainsi que la dégradation du cholestérol. L'injection de la bilirubine 15 min plus tard, réduit la conversion du cholestérol en acides biliaires par cholestérol 7 α -hydroxylase. Cette durée de 15 min entre l'injection du manganèse et l'administration de la bilirubine a été démontrée être l'intervalle de temps critique pour observer la cholestase (de

Lamirande et Plaa, 1978). Une injection de la bilirubine avant ou après cet intervalle, ne provoque pas la diminution du débit biliaire. Nous avons trouvé que cet intervalle correspond à la période où l'activation de la synthèse du cholestérol par le manganèse est très élevée. Étant donné que le cholestérol nouvellement synthétisé est préférentiellement utilisé pour la synthèse des acides biliaires (Bandsma et coll., 2000), et principalement via la voie initiée par cholestérol 7 α -hydroxylase (Scheibner et coll., 1993), l'inhibition de cette enzyme par l'injection de la bilirubine durant cette période d'intense production du cholestérol peut considérablement augmenter les niveaux de cholestérol dans le foie. Une telle circonstance peut déclencher les mécanismes de régulation de l'homéostasie du cholestérol qui peuvent aboutir à l'inhibition de HMG-CoA réductase. Cette enzyme est connue d'être modulée par des mécanismes de court et long termes (Norstrom et coll., 1977; Beg et coll., 1978; Beg et coll., 1980; Liscum et coll., 1983). Les changements à court terme dans l'activité de HMG-CoA réductase reposent sur les modulations de l'enzyme par phosphorylation et déphosphorylation (Nordstrom et coll., 1977; Beg et coll., 1978), tandis que les changements à long terme reposent sur les modifications dans les taux de synthèse et/ou de dégradation. Bien que nous n'ayons pas examiné les mécanismes déclenchés ici, la réduction très rapide de HMG-CoA réductase laisse présager une action via un processus à court terme. Il est possible que cette action relève ici du cholestérol car il a été démontré que le cholestérol réduit très rapidement la demi-vie de HMG-CoA réductase, mais par un mécanisme non encore élucidé (Correll et Edwards, 1994). Il est également possible que cette réduction soit causée par mévalonate qui résulte directement de

la réaction catalysée par HMG-CoA réductase. En effet, Marrero et coll. (1986) ont rapporté une inhibition de l'activité de HMG-CoA réductase dans les hépatocytes après une incubation de 7 minutes avec le mévalonate. Le même effet fut observé par Beg et collaborateurs (1984) in vivo chez les rats, 20 minutes après une injection de mévalonolactone qui est la forme cétonique de mévalonate.

c- Impact de l'altération de la protéine mdr2 dans la pathogenèse de la cholestase manganèse-bilirubine

La protéine mdr2 est une P-glycoprotéine qui assure la translocation des phospholipides du côté intracellulaire vers le côté externe de la membrane canaliculaire pour leur élimination dans la bile. L'importance de cette protéine dans l'élimination biliaire du cholestérol a été démontrée chez les souris déficientes du gène qui code pour cette protéine. Ces souris n'expriment pas la protéine mdr2 et montrent une absence quasi complète des phospholipides et du cholestérol dans leur bile (Smit et coll., 1993). Elles sont en fait incapables d'éliminer les phospholipides ainsi que le cholestérol, et finissent par développer une maladie hépatique dégénérative qui s'apparente à la cholestase (Smit et coll., 1993).

Dans notre investigation sur l'étiologie de la cholestase induite par le traitement combiné manganèse-bilirubine, nous avons trouvé que ce traitement réduit dramatiquement les taux d'excrétion des phospholipides et du cholestérol et avons suggéré que ce traitement affecte l'activité de mdr2 dans les membranes canaliculaires. Nos résultats par Western blot (Article 4, FIG. 2) semblent supporter

cette hypothèse. Ces résultats montrent que l'expression des P-glycoprotéines dans les membranes canaliculaires n'était pas modifiée par le manganèse, mais était réduite à 63% par la bilirubine. Cette réduction était plus importante et atteignait 92% suite au traitement combiné manganèse-bilirubine.

Bien que l'anticorps utilisé ne soit pas spécifique à la P-glycoprotéine mdr2, l'observation d'une réduction dramatique des concentrations biliaires de cholestérol et des phospholipides, puis uniquement de cholate pendant que l'excrétion des autres acides biliaires n'était pas affectée par la combinaison manganèse-bilirubine, suggère que c'est mdr2 qui est altéré par ce traitement, et non bsep, qui assure l'excrétion de la majorité des espèces d'acides. Cette suggestion peut être supportée par le fait que BSP qui prévient la cholestase manganèse-bilirubine lorsqu'elle est injectée après le manganèse et avant la bilirubine (de Lamirande et Plaa, 1979; Witzleben et Boyce, 1975), augmente l'expression des P-glycoprotéines (Article 4, FIG. 2) ainsi que la teneur du cholestérol et des phospholipides dans les membranes canaliculaires (Article 4, tableau 2), mais ne change pas l'excrétion des acides biliaires (Article 4, tableaux 1). Ceci suggère que l'altération de l'activité de la protéine mdr2 peut avoir un impact important dans l'initiation de cette cholestase. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons utilisé les souris déficientes du gène codant pour cette protéine. Nous avons trouvé que les concentrations de cholestérol et des phospholipides dans la bile de ces souris transgéniques étaient plus faibles comparées à celles déterminées dans la bile des souris sauvages traitées avec la

combinaison manganèse-bilirubine, tandis que les concentrations des acides biliaires étaient similaires entre les deux groupes. Par contre, le flux biliaire était plus faible chez les souris du groupe Mn-BR comparé au groupe des souris transgéniques. Cependant, en traitant les souris transgéniques avec la combinaison Mn-BR, nous avons constaté que la cholestase n'était pas aggravée par l'absence de la protéine mdr2. La réduction du débit biliaire induite par cette combinaison était de même intensité chez les souris sauvage et les souris transgéniques (Article 3, FIG. 2; Article 4, Tableau 1). Ces résultats indiquent que l'altération de mdr2 n'est probablement pas l'événement principal menant à la cholestase dans ce modèle cholestatique, et ne semblent donc pas supporter notre hypothèse.

Toutefois, plusieurs rapports indiquent que l'altération de mdr2 ou de son homologue humain MDR3 mène à la cholestase (Smit et coll., 1993; de Vree et coll., 1998; Kullak-Ublick et coll., 2000; Jacquemin et coll., 2001; Balistreri, 2002). Mais cette cholestase a été montrée d'être liée à l'âge aussi bien chez l'humain que chez la souris. Chez l'humain, elle apparaît plus tardivement par rapport aux autres formes génétiques de cholestase. Elle débute en général dans la première année de la vie puis évolue et atteint une image typique de cirrhose biliaire vers l'adolescence (Jacquemin et coll., 2001). Les anomalies morphologiques caractéristiques de cette maladie apparaissent chez la souris transgénique à l'âge de 11 mois (Smit et coll., 1993). Les souris que nous avons utilisées au cours de nos travaux étaient relativement jeunes. Elles étaient âgées de 2 mois et

présentaient un débit biliaire plus élevé que celui observé chez les souris sauvages (Article 3, FIG. 2A; Article 4, tableau 1). Les observations similaires avaient déjà été rapportées (Smit et coll., 1993). Il est possible qu'à cet âge, les souris transgénique *mdr2* n'expriment pas encore les changements qui mènent à la cholestase. Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi la cholestase induite par notre traitement n'était pas aggravée chez ces souris, et indiquer que l'altération de *mdr2* seule ne suffit pas pour observer la cholestase.

D'autre part, il a été démontré que l'activité de HMG-CoA réductase et l'excrétion du cholestérol augmentent avec l'âge (Marino et coll., 2002; Wang, 2202; Pallottini et coll., 2003). À cet égard, la P-glycoprotéine *mdr2* peut être plus sollicitée à l'âge adulte pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans le foie. Conséquemment, son altération à cet âge pourrait contribuer à l'augmentation de la disponibilité du cholestérol hépatique pour sa distribution sous-cellulaire et probablement son accumulation dans les membranes canaliculaires. À ce point de vue, le cholestérol pourrait également être un facteur important dans le développement de la cholestase chez les souris transgéniques *mdr2* âgées. De ce fait, le manque d'amplification de la cholestase observée chez nos jeunes souris transgéniques pourrait suggérer que le niveau de cholestérol induit par le traitement manganèse-bilirubine n'est pas suffisant pour déclencher la cholestase chez ces souris. Ce phénomène pourrait aussi laisser présager que d'autres facteurs sont requis pour observer la cholestase chez ces souris.

Cependant, il était fascinant de voir que l'injection de la bilirubine seule a induit la cholestase chez les souris transgéniques et pas chez les souris sauvages, tandis que le manganèse n'a pas causé pas de cholestase chez ces deux génotypes lorsqu'il est administré seul. Ces résultats sont des bons indices pour soutenir que l'altération de *mdr2* n'est pas une composante mécanistique importante dans l'initiation de la cholestase manganèse-bilirubine et que l'apparition de cette cholestase pourrait reposer sur les changements engendrés dans les voies métaboliques du cholestérol.

En effet, sur la base de nos résultats (Article 2, FIG. 3), le Mn augmente la production du cholestérol via l'activation de HMG-CoA réductase, mais prévient son accumulation dans le foie en augmentant sa dégradation via l'activation de cholestérol 7 α -hydroxylase; tandis que, la bilirubine peut promouvoir l'augmentation des niveaux de cholestérol dans le foie en inhibant cholestérol 7 α -hydroxylase. Cette augmentation peut être amplifiée si la synthèse du cholestérol est également augmentée. À cet égard la réponse de la bilirubine chez les souris sauvages peut être différente de celle des souris transgéniques, chez lesquelles l'activité de HMG-CoA réductase a été rapportée d'être élevée (Voshol et coll., 1998), suggérant une augmentation de la synthèse du cholestérol chez ce génotype. Le fait que l'injection de la bilirubine, mais pas celle du manganèse, provoque la cholestase chez les souris transgéniques suggère que l'inhibition de cholestérol 7 α -hydroxylase soit l'étape limitante dans la séquence d'événements menant à la cholestase suivant l'administration séquentielle du manganèse et de la

bilirubine. La prévention de cette cholestase par BSP chez les souris sauvages et transgéniques semble supporter cette hypothèse.

d- Rôle de mdr2 dans la prévention de la cholestase manganèse-bilirubine par la BSP

La cholestase Mn-BR peut être prévenue par la BSP si celle-ci est injectée après le manganèse et avant la bilirubine (Witzleben et Boyce, 1975). De Lamirande et Plaa (1979) ont démontré que l'efficacité de cette protection repose sur la quantité de BSP encore présente dans l'organisme au moment de l'injection de la bilirubine, et ont établi une relation linéaire entre la BSP et la bilirubine. Mais ces auteurs n'ont pas trouvé de relation entre la BSP et le manganèse tant temporellement que quantitativement. Par contre, le fait que l'effet protecteur de la BSP soit réversible par l'augmentation de la bilirubine (Witzleben et Boyce, 1975) supporte que le manganèse amorce un événement qui requière la contribution de la bilirubine pour déclencher la cholestase.

Les travaux présentés dans cette thèse montrent que cet événement est relié au métabolisme du cholestérol (Article 2). Le manganèse doit être injecté en premier pour activer la synthèse du cholestérol et l'injection de la bilirubine doit suivre celle du manganèse au moment où la synthèse est encore intense pour inhiber la dégradation et élever le cholestérol hépatique à un niveau pathologique.

Par ailleurs, *mdr2* qui favorise l'élimination des excès de cholestérol hépatique dans la bile, n'était pas influencé par le manganèse mais son expression était remarquablement réduite par la bilirubine (Article 4, FIG. 2). Cet effet pourrait aussi contribuer à l'altération de l'homéostasie du cholestérol hépatique associée à la pathogenèse de la cholestase Mn-BR.

Basé sur ces faits, on pourrait croire que la BSP prévienne la cholestase en baissant les niveaux de cholestérol hépatique avant l'injection de la bilirubine. Elle pourrait alors accomplir son effet protecteur en favorisant l'excrétion biliaire du cholestérol ou en activant sa conversion en acides biliaires. Mais avec les données recueillies au cours de nos travaux (Article 4, Tableau 1), on peut facilement rejeter ces deux possibilités car, premièrement, ces données montrent que la BSP a plutôt réduit considérablement les concentrations de cholestérol dans la bile. De plus le degré de réduction induit par la BSP lorsqu'elle est donnée en traitement préventif (Mn-BSP-BR), était comparable à celui induit par le traitement cholestatique (Mn-BR). Deuxièmement, le taux d'excrétion des acides biliaires n'était pas élevé par la BSP lorsqu'elle était administrée seule ou en traitement préventif. Cependant, ce paramètre était réduit par le traitement cholestatique.

Les résultats présentés dans l'article 2 laissent présager que la réduction du taux d'excrétion des acides biliaires suite au traitement cholestatique Mn-BR n'est pas due à un défaut dans le processus d'excrétion mais plutôt à une inhibition de leur synthèse par la composante BR.

L'ensemble de ces données indique que le manganèse et la bilirubine agissent séparément et non sous la forme d'un complexe Mn-BR, et suggère que BSP manifeste ses effets protecteurs contre la cholestase Mn-BR en interférant avec la bilirubine.

Dans leur investigation, Ayotte et Plaa (1986) ont montré que la forme de BR impliquée dans l'interaction conduisant à cette cholestase est la bilirubine libre. La BSP pourrait alors abolir les potentialités cholestatiques de la bilirubine en activant sa conjugaison ou en se liant directement à elle. Des études supplémentaires et appropriées seraient requises pour vérifier cette possibilité.

Par ailleurs, nous avons trouvé que le Mn seul augmente les phospholipides dans les membranes canaliculaires aussi bien chez les souris transgéniques dépourvues de *mdr2* que chez les souris sauvages. Mais cette augmentation devenait significative uniquement chez les souris sauvages lorsque l'injection de Mn était suivie par celle de BSP avant celle de la bilirubine pour prévenir la cholestase. Par contre, lorsque l'injection de manganèse était suivie directement par celle de la bilirubine pour induire la cholestase, la teneur membranaire en phospholipides restait comparable entre les groupes traités et les groupes témoins (Article 4, tableau 2). De plus, ces deux traitements pourraient avoir des effets opposés sur l'expression de *mdr2* dans les membranes canaliculaires.

En effet, l'expression des P-glycoprotéines dans les membranes canaliculaires était réduite par le traitement cholestatique mais augmentée par le traitement préventif. Nous avons trouvé que la composante Mn est restée sans effet sur l'expression des P-glycoprotéines dans les deux traitements et que la réduction observée après le traitement cholestatique était causée par la composante BR, tandis que l'augmentation associée au traitement préventif était accomplie par la composante BSP. Ces observations écartent la possibilité d'un scénario mécanistique au cours duquel BSP agirait directement sur la composante manganèse. Par contre, elles indiquent que mdr2 peut jouer un rôle important dans la prévention de la cholestase Mn-BR par BSP et suggère que les phospholipides pourraient être utiles dans cette prévention. Frijters et collaborateurs (1999) ont d'ailleurs rapporté une altération de la composition lipidique des membranes canaliculaires chez des souris transgéniques dépourvues de la P-glycoprotéine mdr2 et présentant les caractéristiques d'une altération de la formation de la bile associée à la cholestase.

Nous avons trouvé que le traitement cholestatique Mn-BR augmente les concentrations de cholestérol dans les membranes canaliculaires aussi bien chez les souris sauvages que chez les souris transgéniques (Article 4, Tableau 2). L'observation du même effet chez les souris ayant subi le traitement préventif manganèse-BSP-bilirubine indique que la réduction des teneurs de cholestérol dans les membranes canaliculaires ne peut pas être une manœuvre de protection contre cette cholestase. Ce qui pourrait susciter des doutes sur l'accumulation du

cholestérol dans les membranes canaliculaires comme facteur important dans la pathogenèse de cette cholestase. Cependant, contrairement au traitement cholestatique qui ne modifie pas les teneurs membranaires en phospholipides, le traitement préventif avec la BSP a induit une augmentation des teneurs de phospholipides dans les membranes canaliculaires chez les deux génotypes (Article 4, Tableau 2). Le fait que cette augmentation était significative uniquement chez les souris sauvages supporte que *mdr2* puisse jouer un rôle important dans le mécanisme de prévention de la cholestase Mn-BR par la BSP. Ce composé a aussi augmenté les teneurs en cholestérol, sans affecter le ratio C/P. Il apparaît qu'en augmentant simultanément le cholestérol et les phospholipides dans les membranes canaliculaires, BSP prévient le déséquilibre entre les teneurs de cholestérol et phospholipides et permet de maintenir la normalité du ratio C/P dans les membranes canaliculaires, évitant de ce fait toutes les modifications morphologiques ou physiques qui pourraient résulter de la désorganisation lipidique associée à l'altération du ratio C/P dans ces membranes lorsque l'injection de Mn est suivie directement par celle de BR.

e- Mode d'action suggéré pour la combinaison manganèse-bilirubine

En accord avec des évidences antérieures obtenues dans d'autres modèles de cholestase induite par des substances chimiques (Kakis et Yousef, 1978; de Lamirande et coll., 1981; Yousef et Tuchweber, 1984; Duguay et coll., 1998; Plaa et coll., 1998; Yousef et coll., 1998; Chisholm et coll., 1999), nos travaux effectués

avec le modèle cholestatique manganèse-bilirubine supportent que l'accumulation du cholestérol dans les membranes canaliculaires soit une composante mécanistique importante dans l'initiation du syndrome cholestatique.

Nous proposons le modèle mécanistique illustré dans la figure 1 pour expliquer le processus par lequel la combinaison manganèse-bilirubine provoquerait une augmentation de la disponibilité hépatique du cholestérol nouvellement synthétisé, qui est associé avec la pathogenèse de la cholestase induite par cette combinaison. La rapidité avec laquelle la combinaison manganèse-bilirubine provoque la cholestase suggère une réponse via une action directe du manganèse et de la bilirubine sur les éléments cibles. Sur ce point de vue et à partir de nos résultats, notre modèle mécanistique propose que le manganèse agirait comme cofacteur dans les réactions catalysées par HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -hydroxylase, déclenchant respectivement une augmentation de la synthèse du cholestérol et de sa dégradation en acides biliaries. La bilirubine qui est injectée après le manganèse, se fixerait à la cholestérol 7 α -hydroxylase et à la protéine mdr2, affectant ainsi leurs activités et provoquant de ce fait une réduction de la dégradation du cholestérol et de son excrétion dans la bile. Mais, pendant que ces principales voies d'élimination du cholestérol sont neutralisées par la bilirubine, le manganèse continue d'intensifier la production du cholestérol. Conséquemment, le cholestérol nouvellement synthétisé continue d'accroître dans le foie et de se répartir à travers les différents compartiments cellulaires, en s'incorporant principalement dans les membranes

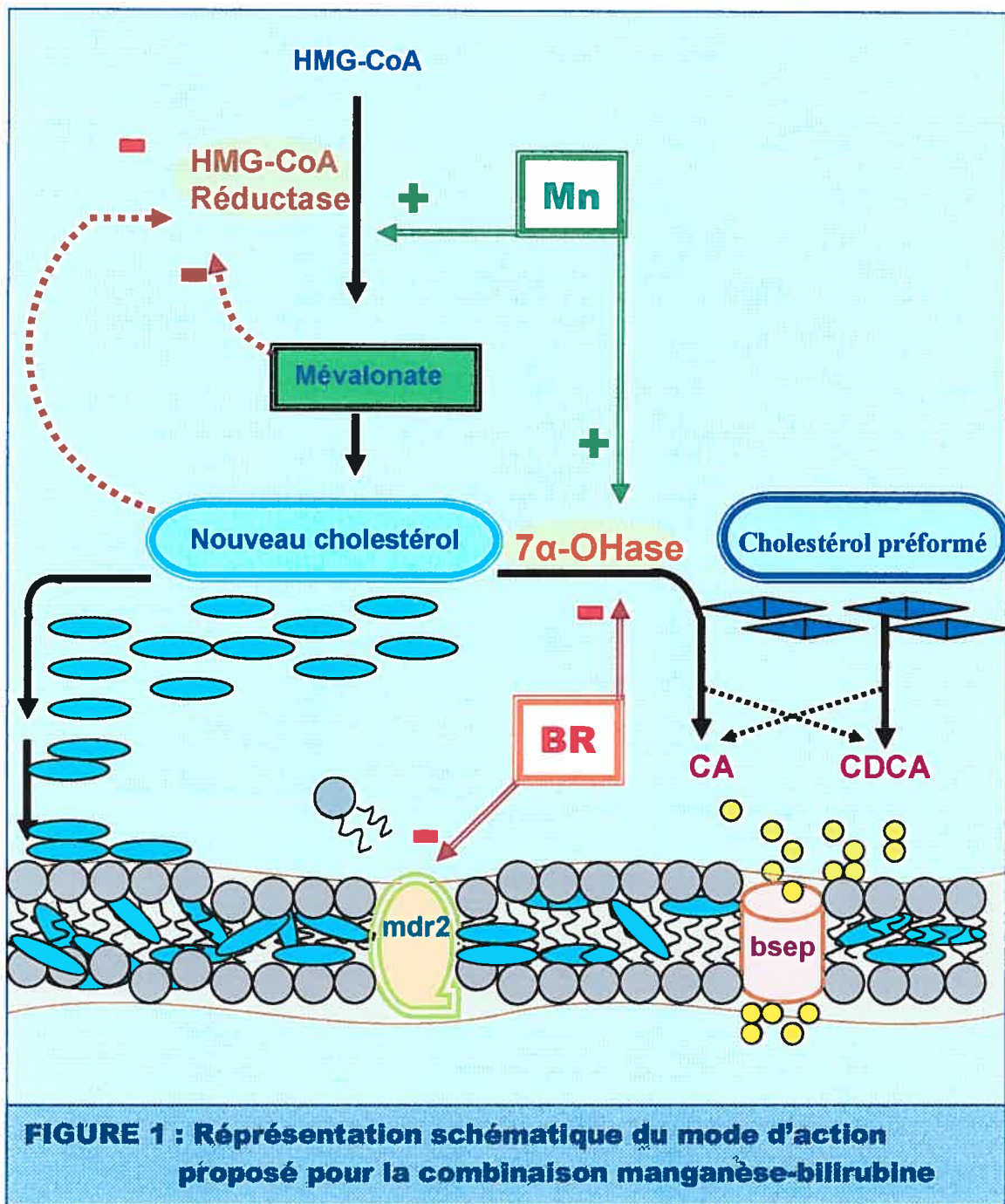
canaliculaires sous l'attraction du profil de phospholipides infligé par le traitement cholestatique.







En effet, en inhibant *mdr2*, le traitement managèse-bilirubine empêche la translocation de la phosphatidylcholine (PC) du côté intracellulaire vers le côté luminal de la membrane canaliculaire, mais ce traitement ne semble pas affecter le processus d'excrétion des acides biliaires. Par conséquent les acides biliaires, dont principalement chénodéoxycholate (CDCA), résultant de la dégradation du cholestérol préformé sont normalement libérés dans l'espace canaliculaire où ils détachent sans arrêt la phosphatidylcholine exposée vers le côté luminal de la membrane canaliculaire, diminuant ainsi les proportions des différentes espèces de phosphatidylcholine présentes dans la membrane canaliculaire. Pour compenser cette perte et maintenir le niveau physiologique de la teneur totale des phospholipides dans les dites membranes, la sphingomyéline (SgM) et la lyso phosphatidylcholine (lyso-PC) s'y incorporent et attirent le cholestérol à cause de leur grande affinité pour ce stérol. Les teneurs de cholestérol et le ratio cholestérol/phospholipides (C/P) finissent par dépasser les niveaux compatibles avec le fonctionnement adéquat des membranes canaliculaires, en baissant leur fluidité et en altérant leur perméabilité. Ces membranes deviennent en effet très rigides et résistantes au passage de l'eau. Il en résulte alors une altération de la formation ainsi que du débit de la bile.

Pendant ce temps, le mévalonate résultant de l'action catalytique de HMG-

CoA réductase, ou le cholestérol produit subséquent en excès, exercerait un contrôle négatif sur l'activité de HMG-CoA réductase pour réduire la production du cholestérol, afin de restituer l'homéostasie du cholestérol hépatique. Une restitution rapide de cette homéostasie pourrait expliquer la réversibilité de la cholestase manganèse-bilirubine pendant que le manganèse et la bilirubine sont encore présents dans le foie.

En effet, Ayotte et Plaa (1988) ont rapporté que les rats excrètent encore des quantités importantes de manganèse et bilirubine 3 heures après leur injection séquentielle. Nous avons trouvé que le débit biliaire remonte et avoisine les valeurs normales chez les rats et les souris au cours de cette période. Ces résultats corroborent ceux de de Lamirande (1980) qui a montré un rétablissement total du débit biliaire chez les rats au bout de 4 heures, suivant le traitement combiné manganèse-bilirubine.



- | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|---|------------------|--|---------------------|---|----------------------|
|  | Transporteur des Phospholipides |  | Phospholipides |  | Nouveau cholestérol |  | Cholestérol préformé |
| | | Mn | Manganèse | | | CA | Cholate |
|  | Transporteur des Acides biliaries |  | Acides biliaries | BR | Bilirubine | CDCA | Chénodéoxycholate |

CONCLUSION GÉNÉRALE

- **La contribution de notre travail dans le progrès des connaissances sur la cholestase manganèse-bilirubine**

Plusieurs évidences indiquent qu'une multitude d'événements se produit durant le processus pathogénique de la cholestase manganèse-bilirubine. À notre avis, les études rapportées dans le présent travail sont utiles pour la compréhension des événements impliqués dans la phase initiale de ce processus. Par nos expériences, nous avons réussi à démontrer que le cholestérol joue un rôle central dans l'initiation de la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine et que le cholestérol impliqué est essentiellement le cholestérol nouvellement synthétisé. Selon nos résultats l'apparition de la cholestase est conditionnelle aux modifications menant à une augmentation considérable du ratio cholestérol/phospholipides dans les membranes canaliculaires. Entre autre, nous avons observé que la combinaison manganèse-bilirubine augmente la disponibilité hépatique du cholestérol nouvellement synthétisé et procure aux membranes canaliculaires un profil de phospholipides qui favorise l'incorporation du cholestérol en leur sein.

Par ailleurs, nos travaux ont permis de caractériser les mécanismes par lesquels la combinaison manganèse-bilirubine perturbe les niveaux physiologiques du cholestérol dans le foie. En effet, grâce à la méthode que nous avons développée, il a été possible d'examiner le métabolisme du cholestérol dans diverses situations et d'acquérir des informations cruciales sur la contribution de chaque composante de la combinaison dans ce phénomène. À partir des données

obtenues, il nous est apparu incontestable que l'augmentation des teneurs souscellulaires du cholestérol nouvellement synthétisé est une conséquence de la synergie des effets du manganèse d'une part, et de la bilirubine d'autre part, agissant séparément sur les voies de synthèse et de dégradation du cholestérol. Concrètement, nos résultats ont révélé que le manganèse augmente la synthèse du cholestérol et la bilirubine inhibe sa dégradation. La diminution du taux d'excrétion du cholestérol notée durant la cholestase pourrait être la conséquence d'une altération de l'activité de mdr2. Nos données ont montré que cette altération est causée par la bilirubine, et pourrait contribuer à l'accroissement de la disponibilité du cholestérol dans le foie pour sa redistribution subcellulaire. Vraisemblablement, l'ensemble de ces résultats démontre la nécessité de précéder l'injection de la bilirubine par celle du manganèse pour parvenir à une condition pathologique relative au cholestérol.

Une des contributions importantes de ce travail a été de démontrer que la cholestase induite par la combinaison manganèse-bilirubine est reproductible chez les souris. Subséquemment, l'utilisation des souris transgéniques nous a permis de démontrer que l'apparition de cette cholestase repose essentiellement sur les modifications induites dans la voie de dégradation du cholestérol, et de déduire que l'altération de la protéine mdr2 n'est pas un événement mécanistique important dans l'initiation du processus pathogénique de la cholestase manganèse-bilirubine. Par contre, notre étude suggère que mdr2 peut avoir un rôle dans le mécanisme de prévention de cette cholestase par BSP. Cette protéine

pourrait alors être une cible intéressante pour des manœuvres thérapeutiques. La recherche des facteurs pharmacologiques capables d'augmenter son activité pourrait s'avérer d'une grande utilité pour la prévention ou le traitement de toutes les formes de cholestase associées à l'accumulation du cholestérol dans les membranes canaliculaires.

ANNEXE

**CONTRIBUTION DES AUTEURS DANS LES TRAVAUX
PUBLIÉS ET NON PUBLIÉS**

PREMIER ARTICLE

Akoume-Ndong M.Y., Mignault D., Perwaiz S., Plaa G.L., Yousef I.M.
Simultaneous Evaluation of HMG-CoA Reductase and Cholesterol 7 α -Hydroxylase Activities by Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Lipids, 2002; 37 (11) : 1101-1107.

OBJECTIF

Développer une méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour simplifier l'évaluation des activités de HMG-CoA Reductase et Cholesterol 7 α -Hydroxylase dans les microsomes de foie.

APPROCHES EXPÉRIMENTALES

1. Préparer un produit de référence pour mévalonolactone et isoler les microsomes de foie de rats. Puis tester les activités enzymatiques dans la préparation microsomale en présence de HMG-CoA synthétique et du cholestérol endogène comme substrats respectifs de HMG-CoA réductase et cholestérol 7 α -Hydroxylase. Extraire ensuite les produits à analyser puis les dériver avant de procéder à l'analyse par chromatographie gazeuse.

↳ La planification et la réalisation de cette partie pré-analytique ont été effectuées par moi, **Akoume Ndong M.Y.**

2. Examiner les échantillons par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem via une interface d'ionisation électrospray.

↳ La génération des données brutes a été effectuée par **Mignault D.**

↳ L'analyse des données a été effectuée par moi, **Akoume Ndong M.Y.**

3. Examiner les échantillons par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

↳ La génération des données brutes a été effectuée par **Perwaiz S.**

↳ L'analyse des données a été effectuée par moi, **Akoume Ndong M.Y.**

RÉDACTION

L'article a été rédigé par moi, **Akoume Ndong M.Y.**, sous la supervision de mon directeur **Dr Yousef I.M.** et de mon co-directeur **Dr Plaa G.L.**

DEUXIÈME ARTICLE

Akoume M.Y., Perwaiz S., Yousef I.M., Plaa G.L. *Synergistic Role of 3-Hydrox-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase and Cholesterol 7 α -Hydroxylase in the Pathogenesis of Manganese-Bilirubin-Induced Cholestasis in Rats.* Toxicol. Sci. 2003 ; 73 : 378-385.

OBJECTIF

Clarifier la base métabolique associée à l'accumulation du cholestérol nouvellement synthétisé dans les membranes canaliculaires chez le modèle cholestatique manganèse-bilirubine.

APPROCHES EXPÉRIMENTALES

1. Soumettre les rats aux traitements cholestatiques et non cholestatiques, et collecter la bile. Préparer ensuite les fractions souscellulaires hépatiques et déterminer leurs teneurs protéiques et lipidiques, puis mesurer les activités de HMG-CoA réductase et de cholestérol 7 α -hydroxylase dans les fractions microsomales.

↳ La planification et la réalisation des expériences ont été effectuées par moi,

Akoume M.Y.

2. Examiner le profil de la phosphatidylcholine dans la bile et dans les microsomes par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem via l'interface d'ionisation electrospray.

↳ La génération des données brutes a été effectuée par **Mignault D.**

↳ L'analyse des données a été effectuée par moi, **Akoume M.Y.**

3. Examiner le profil des acides biliaries dans la bile par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masses.

↳ La génération des données brutes a été effectuée par **Perwaiz S.**

↳ L'analyse des données a été effectuée par moi, **Akoume M.Y.**

RÉDACTION

L'article a été rédigé par moi, **Akoume M.Y.**, sous la supervision de mon directeur

Dr Yousef I.M. et de mon co-directeur **Dr Plaa G.L.**

TROISIÈME ARTICLE

Akoume M.Y., Tuchweber B., Plaa G.L., Yousef I.M. *The Role of Mdr2 in Manganese-Bilirubin-Induced Cholestasis in Mice.* Toxicol. Let. 2004 ; 148 : 41-51

OBJECTIF


Vérifier si la cholestase manganèse-bilirubine est reproductible chez la souris et clarifier le rôle de la protéine mdr2 dans la pathogenèse de cette cholestase.

APPROCHES EXPÉRIMENTALES

1. Soumettre les souris normales et transgéniques aux traitements cholestatiques et non cholestatiques. Puis échantillonner la bile et examiner certains paramètres de sa formation ainsi que le profil de la phosphatidylcholine. Mesurer également la teneur de certains composants biliaires dans le sang. Ensuite isoler les membranes canaliculaires et examiner leur composition lipidique. Les analyses étaient accomplies par des méthodes colorimétriques et chromatographiques.

↳ Les souris transgéniques utilisées ont été fournies par **Dr Tuchweber B.**

↳ La planification et la réalisation des expériences ont été effectuées par moi, **Akoume M.Y.**



↳ La génération des données brutes par chromatographie (ES-MS-MS) a été par **Mignault D.**

↳ L'analyse des données a été effectuée par moi, **Akoume M.Y.**

RÉDACTION

L'article a été rédigé par moi, **Akoume M.Y.**, sous la supervision de mon directeur **Dr Yousef I.M.** et de mon co-directeur **Dr Plaa G.L.**



QUATRIÈME ARTICLE

Akoume M.Y., Tuchweber B., Plaa G.L., Yousef I.M. Relation entre le cholestérol, les phospholipides et mdr2 dans la pathogenèse et la prévention de la cholestase manganèse-bilirubine.

OBJECTIF

Examiner une relation possible entre le cholestérol et les phospholipides dans la pathogenèse de la cholestase manganèse-bilirubine, et un éventuel rôle de mdr2 dans la prévention de cette cholestase.

APPROCHES EXPÉRIMENTALES

1. Soumettre les souris normales et transgéniques aux traitements cholestatiques et préventifs. Puis évaluer certains paramètres de la formation de la bile. Ensuite examiner la composition lipidique et l'expression des P-glycoprotéines dans les membranes canaliculaires.

↳ Les souris transgéniques utilisées ont été fournies par **Dr Tuchweber B.**

↳ La planification et la réalisation des expériences ont été effectuées par moi,

Akoume M.Y.

RÉDACTION

L'article a été rédigé par moi, **Akoume M.Y.**

BIBLIOGRAPHIE

Allen B, Bernhoft R, Blanckaert N, Svanvik J, Filly R, Gooding G, Way L.

Sludge is calcium bilirubinate associated with bile stasis. *Am J Surg.* 1981; 41: 51-56.

Alvaro D, Cantafora A, Attili AF, Ginanni Corradini S, De Luca C, Minervini G,

Di Biase A, Angelico M. Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species. *Comp Biochem Physiol B.* 1986; 83: 551-554.

Andersson K, Kok E, Javitt NB. Bile acid synthesis in man: Metabolism of 7 α -

hydroxycholesterol-14C and 26-hydroxycholesterol 3H. *J Clin Invest.* 1972; 51: 112-117.

Arebalo RE, Hardgrave JE, Noland BJ, Scallen TJ. In vivo regulation of rat

liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase: enzyme phosphorylation as an early regulatory response after intragastric administration of mevalonolactone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77: 6429-6433.

Arebalo RE, Hardgrave JE, Scallen TJ. The in vivo regulation of rat liver 3-

hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Phosphorylation of the enzyme as an early regulatory response following cholesterol feeding. *J Biol Chem.* 1981; 256: 571-574.

Ayotte P, Plaa GL. Hepatic subcellular distribution of manganese in manganese

and manganese-bilirubin induced cholestasis. *Biochem Pharmacol.* 1985; 34: 3857-3865.

Ayotte P, Plaa GL. Modification of biliary tree permeability in rats treated with a manganese-bilirubin combination. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1986; 84: 295-303.

Ayotte P, Plaa GL. Biliary excretion in Sprague-Dawley and Gunn rats during manganese-bilirubin-induced cholestasis. *Hepatology.* 1988; 8: 1069-1078.

Balistreri WF. Intrahepatic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;35 Suppl 1:17-23.

Bandsma RH, Kuipers F, Vonk RJ, Boverhof R, Sauer PJ, Nagel GT, Elzinga H, Neese RA, Hellerstein MK, Stellaard F. The contribution of newly synthesized cholesterol to bile salt synthesis in rats quantified by mass isotopomer distribution analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1483: 343-351.

Barbare JC, Imbert A, Benkirane A. Hepatotoxicity of medications. *Presse Med.* 2001; 30: 673-676.

Barry J. Atlas d'anatomie descriptive du corps humain. Edition Masson, Paris, 1963.

Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1973; 54: 1362-1369.

Beg ZH, Stonik JA, Brewer HB Jr. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A

reductase: regulation of enzymatic activity by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci.* 1978; 75: 3678-3682.

Beg ZH, Stonik JA, Brewer HB Jr. In vitro and in vivo phosphorylation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and its modulation by glucagon. *J Biol Chem.* 1980; 255: 8541-8545.

Beg ZH, Stonik JA, Brewer HB Jr. In vivo modulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, reductase kinase, and reductase kinase kinase by mevalonolactone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984; 81: 7293-7297.

Beg ZH, Stonik JA, Brewer HB Jr. Phosphorylation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and modulation of its enzymic activity by calcium-activated and phospholipid-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 1985; 260: 1682-1687.

Beg ZH, Stonik JA, Brewer HB. Modulation of the enzymatic activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase by multiple kinase systems involving reversible phosphorylation. *Metabolism.* 1987; 36: 900-917.

Bergstrom G, Ekman P, Humble E, Engstrom L. Proteolytic modification of pig and rat liver pyruvate kinase type L including phosphorylatable site. *Biochim Biophys Acta.* 1978;532:259-267.

Berr F, Stellaard F, Goetz A, Hammer C, Paumgartner G. Ethinylestradiol stimulates a biliary cholesterol-phospholipid cosecretion mechanism in the hamster. *Hepatology.* 1988;8:619-624.

Berr F, Jaeger HC, Bitterle T, Mossner J. Evidence for secretory coupling of

phosphatidylcholine molecular species to cholesterol in rat bile. *J Hepatol.* 1997;26:1069-1078.

Biour M, Poupon R, Grange JD, Chazouilleres O, Levy VG, Bodin F, Cheymol

G. Hepatotoxicity of drugs. 9th update of the bibliographic database of hepatic involvements and related drugs. *Gastroenterol Clin Biol.* 1996; 20:744-779.

Bjorkhem I, Eggertsen G, Andersson U. On the mechanism of stimulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase by dietary cholesterol. *Biochim Biophys Acta.* 1991 ;1085: 329-335.

Bjorkhem I, Andersson U, Sudjama-Sugiaman E, Eggertsen G, Hylemon P.

Studies on the link between HMG-CoA reductase and cholesterol 7 alpha-hydroxylase in lymph-fistula rats: evidence for both transcriptional and post-transcriptional mechanisms for down-regulation of the two enzymes by bile acids. *J Lipid Res.* 1993; 34: 1497-503.

Bjorkem I, Andersson O, Diczfalusy U. Artherosclerosis and sterol 27-

hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc Natl Acad Sci.* 1994; 91: 8592-8596.

Bohan A, Boyer JL. Mechanisms of hepatic transport of drugs: implications for cholestatic drug reactions. *Semin Liver Dis.* 2002; 22:123-136.

Bonvicini F, Gautier A, Gardiol D, Borel GA. Cholesterol in acute cholestasis

induced by tauroolithocholic acid. A cytochemical study in transmission and scanning electron microscopy. *Lab Invest.* 1978; 38: 487-495.

Boyer JL. Tight junctions in normal and cholestatic liver: does the paracellular pathway have functional significance? *Hepatology.* 1983; 3: 614-617.

Boyer JL. Mechanisms of bile secretion and hepatic transport. Dans: Adreoli TE, Hofmann AF, Fanestil DD, Schultz SG, eds. *Physiology of membrane disorders.* Plenum publishing corporation. 1986; 609-636.

Boyer JL. Bile duct epithelium: frontiers in transport physiology. *Am J Physiol.* 1996; 270: 1-5.

Brown MS, Goldstein JL, Dietschy JM. Active and inactive forms of 3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver of the rat. Comparison with the rate of cholesterol synthesis in different physiological states. *J Biol Chem.* 1979; 254: 5144-5149.

Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997; 89: 331-340.

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

Cali JJ, Hsieh CL, Francke U, Russell DW. Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biol Chem.* 1991; 266: 7779-7783.

- Caperna TJ, Failla ML.** Cadmium metabolism by rat liver endothelial and Kupffer cells. *Biochem J.* 1984; 221: 631-636.
- Cereijido M, Ponce A, Gonzalez-Mariscal L.** Tight junctions and apical/basolateral polarity. *J Membrane Biol.* 1989; 110: 1-9.
- Chari RS, Schutz SM, Haebig JE, Shimokura GH, Cotton PB, Fitz JG, Meyers WC.** Adenosine nucleotides in bile. *Am J Physiol.* 1996; 270: 246-252.
- Chen Q, Amaral J, Biancani P, Behar J.** Excess membrane cholesterol alters human gallbladder muscle contractility and membrane fluidity. *Gastroenterology.* 1999; 116: 678-685.
- Cheung WY.** Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science.* 1980 ; 207: 19-27.
- Chiang JY, Stroup D.** Identification and characterization of a putative bile acid-responsive element in cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene promoter. *J Biol Chem.* 1994; 269: 17502-17507.
- Childs S, Yeh RL, Georges E, Ling V.** Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer Res.* 1995; 55: 2029-2034.
- Chisholm JW, Nation P, Dolphin PJ, Agellon LB.** High plasma cholesterol in drug-induced cholestasis is associated with enhanced hepatic cholesterol synthesis. *Am J Physiol.* 1999; 276: 1165-1173.
- Chitturi S, Farrell GC.** Drug-induced Cholestasis. *Semin Gastrintest Dis.* 2001; 12: 113-124.
- Chow JC, Higgins MJ, Rudney H.** The inhibitory effect of ATP on HMGCoA reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975; 63: 1077-1084.

- Cohen DE, Angelico M, Carey MC.** Structural alterations in lecithin-cholesterol vesicles following interactions with monomeric and micellar bile salts: physical-chemical basis for subselection of biliary lecithin species and aggregative states of biliary lipids during bile formation. *J Lipid Res.* 1990; 31: 55-70.
- Coleman R.** Biochemistry of bile secretion. *Biochem J.* 1987; 244: 249-261.
- Coleman R, Rahman K.** Lipid flow in bile formation. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1125:113-133.
- Correll CC, Ng L, Edwards PA.** Identification of farnesol as the non-sterol derivative of mevalonic acid required for the accelerated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem.* 1994; 269: 17390-17393.
- Corton JM, Gillespie JG, Hardie DG.** Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol.* 1994; 4: 315-324.
- Crawford, JM, Gollan, JL.** Bilirubin metabolism and the pathophysiology of jaundice. Dans: Schiff, ER, Lippincott JB, eds. *Disease of the liver.* Philadelphia. 1993; 42-84.
- Crawford JM.** Role of vesicle-mediated transport pathways in hepatocellular bile secretion. *Semin Liver Dis.* 1996; 16: 169-189.
- Crawford AR, Smith AJ, Hatch VC, Oude Elferink RP, Borst P, Crawford JM.** Hepatic secretion of phospholipid vesicles in the mouse critically depends on mdr2 or MDR3 P-glycoprotein expression. Visualization by electron microscopy. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2562-2567.

- Crisby M, Nilsson J, Kostulas V, Bjorkhem I, Diczfalusy U.** Localization of sterol 27-hydroxylase immuno-reactivity in human atherosclerotic plaques. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1344: 278-285.
- Dahlqvist-Edberg U, Ekman P.** Purification of a Ca²⁺-activated protease from rat erythrocytes and its possible effect on pyruvate kinase in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1981;660:96-101
- Dahlstrom-King L, du Souich P, Couture J, Plaa GL.** The influence of severity of bile flow reduction, cycloheximide, and methyl isobutyl ketone pretreatment on the kinetics of taurolithocholic acid disposition in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1990; 104: 312-321.
- Dahlstrom-King L, Couture J, Plaa GL.** Functional changes of the biliary tree associated with experimentally induced cholestasis: sulfobromophthalein on manganese-bilirubin combinations. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991; 108:559-567.
- Davis RA, Kern F Jr, Showalter R, Sutherland E, Sinensky M, Simon FR.** Alterations of hepatic Na⁺,K⁺-atpase and bile flow by estrogen: effects on liver surface membrane lipid structure and function. *Proc Natl Acad Sci.* 1978; 75: 4130-4134.
- Davis RA, Sinensky M, Junker LH.** Regulation of cholesterol synthesis and the potential for its pharmacologic manipulation. *Pharmacol Ther.* 1989; 43: 221-236.
- De Lamirande E, Plaa GL.** Role of manganese, bilirubin and sulfobromophthalein in Mn-BR cholestasis in rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1978; 158: 283-287.

De Lamirande E, Plaa GL. Dose and time relationships in manganese-bilirubin cholestasis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1979; 49: 257-263.

De Lamirande E, Tuchweber B, Plaa GL. Hepatocellular membrane alteration as a possible cause of manganese-bilirubin-induced cholestasis. *Biochem Pharmacol.* 1981; 30: 2305-2312.

De Lamirande E. La cholestase manganese-bilirubine: relations quantitatives et temporelles; sites possibles d'action. Thèse de Doctorat, Université de Montréal. 1980.

Demel RA, Jansen JW, van Dijck PW, van Deenen LL. The preferential interaction of cholesterol with different classes of phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* 1977; 465:1-10.

de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink RP, Hadchouel M. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ; 95: 282-287.

Dibona DR, Mills JW. Distribution of Na⁺ pump sites in transporting epithelia. *Fed Proc.* 1979; 38: 134-143.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of the liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species including human. *J Lipid Res.* 1993; 34: 1637-1659.

Dionne S, Russo P, Tuchweber B, Plaa GL, Yousef IM. Cholic acid and chenodeoxycholic acid transport in the hepatic acinus in rats. Effect of necrosis of zone 3 induced by bromobenzene. *Liver.* 1990;10: 336-342.

- Dionne S, Russo P, Tuchweber B, Plaa GL, Yousef IM.** The role of acinar zone 3 hepatocytes in bile formation: influence of bromobenzene treatment on bile formation in the rat. *Liver*. 1990; 10: 85-93.
- Dionne S, Tuchweber B, Plaa GL, Yousef IM.** Phase I and phase 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*. 1994; 48: 1187-1197.
- Duguay A, Plaa GL.** Altered cholesterol synthesis as a mechanism involved in methyl isobutyl ketone-potentiated experimental cholestasis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997; 147:281-288.
- Duguay A, Yousef IM, Tuchweber B, Plaa GL.** Alteration of lipid composition of hepatic membranes associated with manganese-bilirubin induced cholestasis. *Fundam Clin Pharmacol*. 1998; 12: 213-219.
- Duguay AB, Yousef IM, Plaa GL.** Manganese-bilirubin effect on cholesterol accumulation in rat bile canalicular membranes. *Toxicol Sci*. 2000; 53: 150-155.
- Edwards PA, Popjak G, Fogelman AM.** Control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by endogeneously synthesized sterols in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1977; 252: 1057-1063.
- Edwards PA, Ericsson J.** Sterols and isoprenoids: signalling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 157-185.
- Ekman P, Eriksson I.** The in vitro modification of phosphorylated pyruvate

kinase by a Ca²⁺-activated protease from rat liver. *Acta Chem Scand B*. 1980; 34: 419-422.

Elamiri A, Perwaiz S, Tuchweber B, Yousef IM. Effect of mdr2 mutation with combined tandem disruption of canalicular glycoprotein transporters by cyclosporine A on bile formation in mice. *Pharmacol Res*. 2003, 48: 467-472.

Elferink RO. Cholestasis. *Gut*. 2003; 52: 42-48.

EI-Seaidy AZ, Mills CO, Elias E, Crawford JM. Lack of evidence for vesicle trafficking of fluorescent bile salts in rat hepatocyte couplets. *Am J Physiol*. 1997; 272: G298-G309.

Eppens EF, van Mil SW, de Vree JM, Mok KS, Juijn JA, Oude Elferink RP, Berger R, Houwen RH, Klomp LW. FIC1, the protein affected in two forms of hereditary cholestasis, is localized in the cholangiocyte and the canalicular membrane of the hepatocyte. *J Hepatol*. 2001; 35: 436-443.

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

Erlinger S. Bile flow. Dans: Arias IM, Jacoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver: Biology and Pathobiology*. 2nd edition. New York: Raven Press. 1988; 643-658.

Fisher MM, Bloxam DL, Oda M, Phillips MJ, Yousef IM. Characterization of rat liver cell plasma membranes. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1975; 150: 177-184.

Fisher A. Quatre familles de molécules responsables de l'adhérence intercellulaire. *Médecine Sciences*. 1991; 7: 540-542.

- Frechette JL.** Guide pratique des principaux parasites et maladies de la faune terrestre et ailée du Québec. Distributions Pisciconsult Inc. St. Hyacinthe, Québec, 1986.
- Frijters CM, Tuijn CJ, Ottenhoff R, Zegers BN, Groen AK, Elferink RP.** The role of different P-glycoproteins in hepatobiliary secretion of fluorescently labeled short-chain phospholipids. *J Lipid Res.* 1999; 40:1950-1958.
- Gagnon WF.** Physiologie médicale. Traduit par Seroussi S et Duizabo P. Edition Masson, Paris, 1977.
- Garrison JC, Johnsen DE, Campanile CP.** Evidence for the role of phosphorylase kinase, protein kinase C, and other Ca²⁺-sensitive protein kinases in the response of hepatocytes to angiotensin II and vasopressin. *J Biol Chem.* 1984; 259: 3283-3292.
- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B.** The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem.* 1998; 273: 10046-10050.
- Gillespie JG, Hardie DG.** Phosphorylation and inactivation of HMG-CoA reductase at the AMP-activated protein kinase site in response to fructose treatment of isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 1992; 306:59-62.
- Goldstein JL, Brown MS.** Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425-430.
- Goodwin CD, Cooper BW, Margolis S.** Rat liver cholesterol 7 alpha-hydroxylase. Modulation of enzyme activity by changes in phosphorylation state. *J Biol Chem.* 1982 ;257: 4469-4472.

- Gosland M, Tsuboi C, Hoffman T, Goodin S, Vore M.** 17 beta-estradiol glucuronide: an inducer of cholestasis and a physiological substrate for the multidrug resistance transporter. *Cancer Res.* 1993; 53: 5382-5385.
- Graf J.** Canalicular bile salt-independent bile formation: concepts and clues from electrolyte transport in rat liver. *Am J Physiol.* 1983; 244: G233-G246.
- Greengard P.** Phosphorylated proteins as physiological effectors. *Science.* 1978;199: 146-152.
- Grieco D, Beg ZH, Romano A, Bifulco M, Aloj SM.** Cell cycle progression and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase are regulated by thyrotropin in FRTL-5 rat thyroid cells. *J Biol Chem.* 1990; 265: 19343-19350.
- Gumbiner B.** Structure, biochemistry and assembly of epithelial tight junctions. *Am J Physiol.* 1987; 253: 749-758.
- Gumucio JJ, Balabaud C, Miller DL, DeMason LJ, Appelman HD, Stoecker TJ, Franzblau DR.** Bile secretion and liver cell heterogeneity in the rat. *J Lab Clin Med.* 1978; 91: 350-362.
- Helmreich EJ, Elson EL.** Mobility of proteins and lipids in membranes. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 1984; 18: 1-62.
- Heuman DM, Hylemon PB, Vlahcevic ZR.** Regulation of bile acid synthesis. III. Correlation between biliary bile salt hydrophobicity index and the activities of enzymes regulating cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *J Lipid Res.* 1989; 30: 1161-1171.
- Higgins JA, Evans WH.** Transverse organization of phospholipids across the

bilayer of plasma-membrane subfractions of rat hepatocytes. *Biochem J.* 1978; 174:563-567.

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

Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in man. *Clin Gastroenterol.* 1977; 6: 3-24.

Holzer H, Duntze W. Metabolic regulation by chemical modification of enzymes. *Annu Rev Biochem.* 1971;40:345-374.

Honda A, Shoda J, Tanaka N, Matsuzaki Y, Osuga T, Shigematsu N, Tohma M, Miyazaki H. Simultaneous assay of the activities of two key enzymes in cholesterol metabolism by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1991; 565: 53-66.

Hylemon PB, Gurley EC, Stravitz RT, Litz JS, Pandak WM, Chiang JY, Vlahcevic ZR. Hormonal regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase mRNA levels and transcriptional activity in primary rat hepatocyte cultures. *J Biol Chem.* 1992 ;267:16866-6871.

Hylemon PB, Pandak WM, Vlahcevic ZR. Regulation of cholesterol homeostasis. Dans: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Chisari, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The Liver. Biology and Pathobiology*, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, NY. 2001; 231-247.

Hyogo H, Tazuma S, Nishioka T, Ochi H, Yamaguchi A, Numata Y, Kanno K, Sakomoto M, Asamoto Y, Tsuboi K, Nakai K, Yasumiba S, Sunami

Y, Kajiyama G. Phospholipid alterations in hepatocyte membranes and transporter protein changes in cholestatic rat model. *Dig Dis Sci.* 2001; 46: 2089-2097.

Imamura T, Fujimoto JM. Transit patterns of marker compounds given by segmented retrograde intrabiliary injection (SRII) in the isolated in situ perfused rat liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980;215:110-115.

Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *EMBO J.* 2000; 19: 819-830.

Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T, Sugiyama Y. Functional analysis of a canalicular multispecific organic anion transporter cloned from rat liver. *J Biol Chem.* 1998; 273: 1684-1688.

Iqbal S, Mills CO, Elias E. Biliary permeability during ethinyl estradiol-induced cholestasis studied by segmented retrograde intrabiliary injections in rats. *J Hepatol.* 1985; 1: 211-219.

Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meir PJ. Expression cloning of a rat liver Na (+)-independent organic anion transporter. *Proc Nat Acad Sci.* 1994; 91: 133-137.

Jacquemin E, De Vree JM, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, Scheffer GL, Paul M, Burdelski M, Bosma PJ, Bernard O, Hadchouel M, Elferink RP. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology.* 2001; 120:1448-1458.

- Jaeschke H, Trummer E, Krell H.** Increase in biliary permeability subsequent to intrahepatic cholestasis by estradiol valerate in rats. *Gastroenterology*. 1987; 93: 533-538.
- Jaeschke H.** The pathophysiological significance of increased tight-junctional permeability during oestrogen cholestasis. *Biochem J*. 1990; 266: 620-622.
- Jansen PL, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Hooiveld GJ, Koning JH, De Jager-Krikken A, Kuipers F, Stellaard F, Bijleveld CM, Gouw A, Van Goor H, Thompson RJ, Muller M.** Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology*. 1999; 117: 1370-1379.
- Javitt NB.** 26-hydroxycholesterol: synthesis, metabolism and biologic activities. *J Lipid Res*. 1990; 31: 1527-1533.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Barnouin K, Kurz G, Keppler D.** Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res*. 1996; 56: 988-994.
- Jones AL, Schmucker DL, Mooney JS, Ockner RK, Adler RD.** Alterations in hepatic pericanalicular cytoplasm during enhanced bile secretory activity. *Lab Invest*. 1979; 40: 512-517.
- Jungermann K.** Regulation of hepatic metabolism and hemodynamics by hormones and autonomic nerves. Dans: Reuter W, Popper H, Arias IM, Heinrich PC, Kepler D, Landmann L, eds. *Modulation of liver cell expression*, MTP Press, Lancaster, 1987; 15-39.
- Jungermann K, Katz N.** Functional specialization of different hepatocyte

populations. *Physiol Rev.* 1989; 69: 708-764.

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

Kakis G, Yousef IM. Mechanism of cholic acid protection in lithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats. *Gastroenterology.* 1980 ; 78: 1402-1411.

Kam JH. Pancreatic hormones and antidiabetic drugs. Dans: *Basic and clinical pharmacology.* Bertram G. Katzung, ed., seventh edition, Appleton and Lange, Stanford. 1998.

Kaplowitz N. Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation. *Drug Saf.* 2001; 24: 483-90.

Kast C, Stieger B, Winterhalter KH, Meir PJ. Hepatocellular transport of bile acids. Evidence for distinct subcellular localizations of electrogenic and ATP-dependent taurocholate transport in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1994; 269: 5179-5186.

Katz NR. Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J Nutr.* 1992; 122: 843-849.

Keefe EB, Scharschmidt BF, Blankenship NM, Ockner RK. Studies of relationships among bile flow, liver plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase and membrane viscosity in rat. *J Clin Invest.* 1979; 64; 1590-1598.

Kitagawa T, Inoue K, Nojima S. Properties of liposomal membranes containing lysolecithin. *J Biochem.* 1976; 79: 1123-1133.

Krell H, Hoke H, Pfaff E. Development of intrahepatic cholestasis by alpha-naphthylisothiocyanate in rats. *Gastroenterology.* 1982; 82: 507-514.

- Klaassen CD, Watkins JB.** Mechanisms of bile formation, hepatic uptake, and biliary excretion. *Pharmacol Rev.* 1984; 36: 1-67.
- Kremmer T, Wisner MH, Evans WH.** The lipid composition of plasma membrane subfractions originating from three major functional domains of rat hepatocyte cell surface. *Biochim Biophys Acta.* 1976; 455: 655-664.
- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Scheingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, Meier PJ.** Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology.* 1995; 109: 1274-1282.
- Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ.** Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis.* 2000; 20: 273-292.
- Kwok CT, Burnett W, Hardie IR.** Regulation of rat liver microsomal cholesterol 7 alpha-hydroxylase: reversible inactivation by ATP + Mg²⁺ and a cytosolic activator. *J Lipid Res.* 1981; 22: 580-589.
- Lamri Y, Roda A, Dumont M, Feldmann G, Erlinger S.** Immunoperoxidase localization of bile salts in rat liver cells. Evidence for a role of the Golgi apparatus in bile salt transport. *J Clin Invest.* 1988; 85: 1173-1182.
- Larkin JM.** Vesicle-mediated transcytosis: insights from the cholestatic rat liver. *Gastroenterology.* 1993; 105: 594-597.
- Lee EY, Brandt H, Capulong ZL, Killilea SD.** Properties and regulation of liver phosphorylase phosphatase. *Adv Enzyme Regul.* 1976; 14:467-490.
- Lee WM.** Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 2003; 349: 474-85.
- Levy C, Lindor KD.** Drug-induced cholestasis. *Clin Liver Dis.* 2003; 7: 311-330.

- Lewis JH, Zimmerman HJ.** Drug- and chemical-induced cholestasis. *Clin Liver Dis.* 1999; 3: 433-464
- Lewis JH.** Drug-induced liver disease. *Med Clin North Am.* 2000; 84: 1275-311.
- Li YC, Wang DP, Chiang JYL.** Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase in the liver. Cloning, sequencing and regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA. *J Biol Chem.* 1990; 265: 12012-12019.
- Linden CD, Wright KL, McConnell HM.** Lateral phase separation in membrane lipids and the mechanism of sugar transport in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sc.* 1973; 70: 2271-2275.
- Liscum L, Luskey KL, Chin DJ.** Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and its mRNA in rat liver as studied with a monoclonal antibody and a cDNA probe. *J Biol Chem.* 1989; 258: 8450-8455.
- Liu Y, Huang L, Hoffman T, Gosland M, Vore M.** MDR1 substrates/modulators protect against beta-estradiol-17beta-D-glucuronide cholestasis in rat liver. *Cancer Res.* 1996; 56: 4992-4997.
- Loud AV.** A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol.* 1968 ; 37: 27-46.
- Lowe PJ, Coleman R.** Fluorescence anisotropy from diphenylhexatriene in rat liver plasma membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1982; 689: 403-409.
- Lund E, Andersson O, Zhang J, Babiker A, Ahlborg G, Diczfalusy U,**

- Einarsson K, Sjoval J, Bjorkhem I.** Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of intracellular cholesterol in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16: 208-12.
- Lund-Katz S, Laboda HM, McLean LR, Phillips MC.** Influence of molecular packing and phospholipid type on rates of cholesterol exchange. *Biochemistry.* 1988; 27: 3416-3423.
- Luskey KL, Faust JR, Chin DJ.** Amplification of the gene for the 53-kDa protein, in Ut-1 cells. *J Biol Chem.* 1983; 258: 8462-8469.
- Madon J, Eckhardt U, Gerloff T, Stieger B, Meier PJ.** Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett.* 1997; 406: 75-78.
- Mahler SM, Wilce PA, Shanley BC.** Studies on regenerating liver and hepatoma plasma membranes--II. Membrane fluidity and enzyme activity. *Int J Biochem.* 1988; 20: 613-619.
- Marino M, Pallottini V, D'Eramo C, Cavallini G, Bergamini E, Trentalance A.** Age-related changes of cholesterol and dolichol biosynthesis in rat liver. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123:1183-1189.
- Marrero PF, Haro D, Hegardt FG.** Phosphorylation of HMG-CoA reductase induced by mevalonate accelerates its rate of degradation in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 1986;197:183-186.
- Martin KO, Budai K, Javitt NB.** Cholesterol and 27-hydroxycholesterol, 7 alpha-hydroxylation: evidence for two different enzymes. *J Lipid Res.* 1993; 34: 581-588.

Means AR, Dedman JR. Calmodulin--an intracellular calcium receptor. *Nature*. 1980;285: 73-77.

Meier PJ, Sztul ES, Reuben A, Boyer JL. Structural and functional polarity of canalicular and basolateral plasma membrane vesicles isolated in high yield from rat liver. *J Cell Biol*. 1984; 98: 991-1000.

Meier-Abt PJ. Cellular mechanisms of intrahepatic cholestasis. *Drugs*. 1990; 40: 84-97.

Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol*. 2002; 64: 635-661.

Molitoris BA, Nicolson WJ. Alterations in the establishment and maintenance of epithelial cell polarity as a basis for disease processes. *J Clin Invest*. 1990; 85: 3-9.

Mottino A, Tuchweber B, Plaa GL, Yousef IM. Role of perivenous hepatocytes in tauroolithocholate-induced cholestasis in vivo. *Toxicol Lett*. 2000; 116: 69-77.

Muller D, Holzer H. Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1981; 103: 926-933.

Muller M, Jansen PL. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol*. 1997; 272: 1285-1303.

Nakama T, Furusawa T, Itoh H, Hisadome T. Correlation of cholesterol and bilirubin solubilization in bile salt solution. *Gastroenterol Jpn*. 1979; 14: 565-572.

Nakamoto Y, Kaneko S. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury.

Curr Mol Med. 2003; 3: 537-544.

Nakanishi M, Goldstein JL, Brown MS. Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem.* 1988; 263: 8929-8937.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* 1993; 12:1-51.


Nibbering CP, Groen AK, Ottenhoff R, Brouwers JF, vanBerge-Henegouwen GP, van Erpecum KJ. Regulation of biliary cholesterol secretion is independent of hepatocyte canalicular membrane lipid composition: a study in the diosgenin-fed rat model. *J Hepatol.* 2001; 35: 164-169.

Ninomiya R, Matsuoka K, Moroi Y. Micelle formation of sodium chenodeoxycholate and solubilization into the micelles: comparison with other unconjugated bile salts. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1634: 116-125.

Noe J, Hagenbuch B, Meier PJ, St-Pierre MV. Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *Hepatology.* 2001; 33: 1223-1231.

Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL. Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 12848-12853.

Nohturfft A, DeBose-Boyd RA, Scheek S. Sterols regulate cycling of SREBP



cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96: 11235-11240.

Nordstrom JL, Rodwell VW, Mitschelen JJ. Interconversion of active and inactive forms of rat liver hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem.* 1977; 252: 8924-8934.

Novikoff AB, Esser E. The liver cell. Some new approaches to its study. *Am J Med.* 1960; 29:102-131.

Olender EH, Simoni RD. The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem.* 1992; 267: 4223-4235.

Ortiz DF, Li S, Iyer R, Zhang X, Novikoff P, Arias IM. MRP3, a new ATP-binding cassette protein localized to the canalicular domain of the hepatocyte. *Am J Physiol.* 1999; 276: G1493-G1500.

Ortiz DF, St Pierre MV, Abdulmessih A, Arias IM. A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J Biol Chem.* 1997; 272 :15358-15365.

Osborne TF. Single nucleotide resolution of sterol regulatory region in promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem.* 1991 266: 13947-13951.

Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. 5' End of HMG-CoA reductase gene contains sequences responsible for cholesterol-mediated inhibition of transcription. *Cell.* 1985; 42: 203-212.

Oude Elferink RP, Ottenhoff R, Radomska A, Hofmann AF, Kuipers F,



Jansen PL. Inhibition of glutathione-conjugate secretion from isolated hepatocytes by dipolar bile acids and other organic anions. *Biochem J.* 1991; 274: 281-286.

Oude Elferink RP, Bakker CT, Roelofsen H, Middelkoop E, Ottenhoff R Heijn M, Jansen PL. Accumulation of organic anion in intracellular vesicles of cultured rat hepatocytes is mediated by the canalicular multispecific organic anion transporter. *Hepatology.* 1993; 17: 434-444.

Oude Elferink RP, Ottenhoff R, van Wijland M, Frijters CM, van Nieuwkerk C, Groen AK. Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol secretion in mice with reduced expression of mdr2 P-glycoprotein. *J Lipid Res.* 1996 37: 1065-1075.

Oude Elferink RP, Groen AK. Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1586: 129-145.

Ozasa S, Boyd GS. Cholesterol 7 alpha-hydroxylase of rat liver. Studies on the solubilisation, resolution and reconstitution of the enzyme complex. *Eur J Biochem.* 1981; 119:263-272.

Pallottini V, Marino M, Cavallini G, Bergamini E, Trentalance A. Age-related changes of isoprenoid biosynthesis in rat liver and brain. *Biogerontology.* 2003; 4: 371-378.

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

- Plaa GL, Priestly BG.** Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals. *Pharmacol Rev.* 1976; 28: 207-273.
- Plaa GL, De Lamirande E, Lewittes M, Yousef IM.** Liver cell plasma membrane lipids in manganese-bilirubin-induced intrahepatic cholestasis. *Biochem Pharmacol.* 1982; 31: 3698-3701.
- Plaa GL, Hewitt WR.** Biotransformation products and cholestasis. *Prog Liver Dis.* 1982;7:179-194
- Plaa GL, Duguay AB, King LM, Hewitt WR.** Cholestasis produced by combination of manganese and bilirubin. Dans: Plaa GL, Hewitt WR, eds. *Toxicology of the Liver.* Washington: Taylor and Francis. 1998; 383-400.
- Podevin P, Poupon R.** Les acides biliaires modulent l'expression génique. *Médecine Sciences.* 1999; 15: 1472-1475.
- Quistorff B.** Metabolic heterogeneity of liver parenchymal cells. *Essays in Biochem.* 1990; 25: 83-136.
- Rappaport AM.** Acinar units and pathophysiology of the liver. Dans: Rouiller C, ed., *The Liver.* Academic press, New York. 1963; 265-328.
- Rappaport AM.** The microcirculatory hepatic unit. *Microvascular Res.* 1973; 6: 212-218.
- Rawson RB, Zelenski NG, Njhawan D.** Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell.* 1997; 1: 47-57.
- Reichen J, Simon FR.** Cholestasis. Dans: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby

WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. The liver: biology and pathobiology. Raven Press Ltd. New York. 1994; 1291-1326.

Reinhart MP, Billheimer JT, Faust JR, Gaylor JL. Subcellular localization of the enzymes of cholesterol biosynthesis and metabolism in rat liver. *J Biol Chem.* 1987 Jul 15; 262(20):9649-9655.

Repa JJM, Makishima TT, Lu D, Mangelsdorf J. Orphan nuclear receptors and the regulation of cholesterol and bile acid metabolism. Dans: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Chisari, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, NY. 2001; 1029-1040.

Rilling HC, Chayet CT. Biosynthesis of cholesterol. Dans: Danielsson H, Sjövall J, eds. *Sterols and bile acids*. Amsterdam: Elsevier. 1985; 1-39.

Roberts SK, Kuntz SM, Gores GJ, Larusso NF. Regulation of bicarbonate-dependent ductular bile secretion assessed by luminal micropuncture of isolated rodent intrahepatic bile ducts. *Proc Nat Acad Sci.* 1993; 90: 9080-9084.

Rodwell VW, Nordstrom JL, Mitschelen JJ. Regulation of HMG-CoA reductase. *Adv Lipid Res.* 1976; 14: 1-74.

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

Roy CC, Tuchweber B, Weber AM, Yousef IM. Update on bile formation and on mechanism of bile acid-induced cholestasis. Dans: Shaffer E, Thompson A, eds. *Advances in Gastroenterology*, vol II, Plenum Press, 1989; 41-67.

Sakai J, Duncan EA, Rawson RB. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell*. 1996; 85:1037-1046.

Samuels AM, Carey MC. Effects of chlorpromazine hydrochloride and its metabolites on Mg²⁺- and Na⁺,K⁺-ATPase activities of canalicular-enriched rat liver plasma membranes. *Gastroenterology*. 1978; 74: 1183-90.

Scallen TJ, Sanghvi A. Regulation of three key enzymes in cholesterol metabolism by phosphorylation/dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80: 2477-2480.

Schachter D. The hepatocyte plasma membrane: organization and differentiation. Dans: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter, Shafrz, eds. *The liver: Biology and Pathology*, 2nd edition. Raven press, Ltd, New York. 1988; 131-140.

Scheibner J, Fuchs M, Schiemann M, Tauber G, Hormann E, Stange EF. Bile acid synthesis from newly synthesized vs. preformed cholesterol precursor pools in the rat. *Hepatology*. 1993; 17: 1095-1102.

Segal HL. Enzymatic interconversion of active and inactive forms of enzymes. *Science*. 1973; 180: 25-32.

Sellinger M, Boyer JL. Physiology of bile secretion and cholestasis. *Prog Liver Dis*. 1990; 9: 237-259.

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

- Shaffer EA.** Cholestasis: the ABCs of cellular mechanisms for impaired b secretion-transporters and genes. *Can J Gastroenterol.* 2002; 16: 380-389.
- Shamburek RD, Schwartz CC.** Selective composition of biliary phosphatidylcholines is affected by secretion rate but not by bile acid hydrophobicity. *J Lipid Res.* 1993;34:1833-1842.
- Sharma RC, Inoue S, Roitelman J, Schimke RT, Simoni RD.** Peptide transport by the multidrug resistance pump. *J Biol Chem.* 1992; 267: 5731-5744.
- Shapiro DJ, Nordstrom JL, Mitschelen JJ, Rodwell VW, Schimke RT.** Micro assay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in rat liver and in L-cell fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 1974; 370: 369-377.
- Silverman JA, Schrenk D.** Hepatic canalicular membrane 4: expression of the multidrug resistance genes in the liver. *FASEB J.* 1997; 11: 308-313.
- Silverman JA, Thorgeirsson SS.** Regulation and function of the multidrug resistance genes in liver. *Prog Liver Dis.* 1995; 13: 101-123.
- Simion FA, Fleischer B, Fleischer S.** Subcellular distribution of bile acids, bile salts, and taurocholate binding sites in rat liver. *Biochemistry.* 1984; 23: 6459-6466.
- Simon FR, Gonzalez M, Sutherland E, Accatino L, Davis RA.** Reversal of ethinyl estradiol-induced bile secretory failure with Triton WR-1339. *J Clin Invest.* 1980 ; 65: 851-860.
- Sinensky M, Torger M, Edwards PA.** Radioimmune precipitation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in Chinese hamster fibroblasts. Effect of 25-hydroxycholesterol. *J Biol Chem.* 1981; 256: 11774-11779.

- Singer SJ, Nicolson GL.** The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 1972; 175: 720-731.
- Sippel CJ, Dawson PA, Shen T, Perlmutter DH.** Reconstitution of bile acid transport in a heterologous cell by cotransfection of transporters for bile acid uptake and efflux. *J Biol Chem*. 1997; 272: 18290-18297.
- Sippel CJ, Suchy FJ, Ananthanarayanan M, Perlmutter DH.** The rat liver ecto-ATPase is also a canalicular bile acid transport protein. *J Biol Chem*. 1993; 268: 2083-2091.
- Slotte JP.** Lateral domain formation in mixed monolayers containing cholesterol and dipalmitoylphosphatidylcholine or N-palmitoylsphingomyelin. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1235: 419-427.
- Smit MJ, Temmerman AM, Havinga R, Kuipers F, Vonk RJ.** Short- and long-term effects of biliary drainage on hepatic cholesterol metabolism in the rat. *Biochem J*. 1990; 269: 781-788.
- Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar E, Van Deemter L.** Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipids from bile and to liver disease. *Cell*. 1993; 75: 451-462.
- Smith DJ, Gordon ER.** Role of liver plasma membrane fluidity in the pathogenesis of estrogen-induced cholestasis. *Lab Clin Med*. 1988; 112: 679-685.
- Sokal EM, Trivedi P, Portmann B, Mowatt PA.** Development changes in intra-

acinar distribution of succinate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, glucose-6-phosphatase and NADPH dehydrogenase in rat liver. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1989; 8: 522-527.

Soroka CJ, Lee JM, Azzaroli F, Boyer JL. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology.* 2001; 33: 783-791.

Stevenson BR, Anderson JM, Sullivan S. The epithelial tight junction: structure, function and preliminary biochemical characterization. *Cell Mol Biol.* 1989; 83: 129-145.

Stolz A, Takikawa H, Sugiyama Y, Kuhlenkamp J, 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.* 1987; 79: 427-434.

Storch J, Schachter D, Inoue M, Wolkoff AW. Lipid fluidity of hepatocyte plasma membrane subfractions and their differential regulation by calcium. *Biochim Biophys Acta.* 1983; 727: 209-212.

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

Straka MS, Junker LH, Zacarro L, Zogg DL, Dueland S, Everson GT, Davis RA. Substrate stimulation of 7 alpha-hydroxylase, an enzyme located in the cholesterol-poor endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1990 May 5; 265(13):7145-7149.

Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Nemeth A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nature Genet.* 1998; 20: 233-238.

Stroup D, Crestani M, Chiang JY. Identification of a bile acid response element in the cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene CYP7A. *Am J Physiol.* 1997; 273: G508-G517.

Suchy FJ, Balistreri WF, Hung J, Miller P, Garfield SA. Intracellular bile acid transport in rat liver as visualized by electron microscope autoradiography using a bile acid analogue. *Am J Physiol.* 1983; 245: 681-689.

Takikawa H, Ookhtens M, Stolz A, Kaplowitz N. Cyclical oxidation-reduction of the C3 position on bile acids catalyzed by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. II. Studies in the prograde and retrograde single-pass, perfused rat liver and inhibition by indomethacin. *J Clin Invest.* 1987 80: 861-866.

Tanikawa K. Ultrastructural aspects of the liver and its disorders. Edition Igaku Show Ltd., Tokyo, 1968.

Toda G, Oka H, Toshitsugu O, Ikeda Y. Subfractionation of rat liver plasma membrane. Uneven distribution of plasma membrane-bound enzymes on the liver cell surface. *Biochim Biophys Acta.* 1975; 413: 52-64.

Toyo-Oka T. Phosphorylation with cyclic adenosine 3':5' monophosphate-

dependent protein kinase renders bovine cardiac troponin sensitive to the degradation by calcium-activated neutral protease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982 Jul 16;107:44-50.

Twisk J, De Wit E, Princen HMG. Structural aspects of bile acids involved in the regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and 27-hydroxylase. *Eur J Biochem.* 1995; 228: 596-604.

van Blitterswijk WJ, van der Meer BW, Hilkmann H. Quantitative contributions of cholesterol and the individual classes of phospholipids and their degree of fatty acyl (un)saturation to membrane fluidity measured by fluorescence polarization. *Biochemistry.* 1987; 26: 1746-1756.

van der Meer BW. Membrane fluidity, more than one single parameter. *Acta Pharm Jugosl.* 1991; 41: 311-326.

van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, van Meer G. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell.* 1996; 87: 507-517.

van Nieuwerk CM, Groen AK, Ottenhoff R, van Wijland M, van den Bergh Weerman MA, Tytgat GN, Offerhaus JJ, Oude Elferink RP. The role of bile salt composition in liver pathology of *mdr2* (-/-) mice: differences between males and females. *J Hepatol.* 1997; 26:138-145.

Vežina M, Plaa GL. Methyl isobutyl ketone metabolites and potentiation of the cholestasis induced in rats by a manganese-bilirubin combination or manganese alone. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988;92:419-427.

- Vlahcevic ZR, Pandak WM, Hylemon PB.** Role of newly synthesized cholesterol or its metabolites on the regulation of bile acid biosynthesis following acute biliary diversion in the rat. *Hepatology*. 1993; 18: 660-668.
- Vlahcevic ZR, Pandak WM, Stravitz RT.** Regulation of bile acid biosynthesis. Dans: Cooper A, ed. *Gastroenterology clinics of North America*. 1999; 28: 1-25.
- Vore M, Brouwer KLR.** Cholestatic properties of steroid glucuronides. Dans: Plaa GL, Hewitt WR, eds. *Toxicology of the Liver*. Washington: Taylor and Francis. 1998; 323-364.
- Voshol PJ, Havinga R, Wolters H, Ottenhoff R, Princen HM, Oude Elferink RP, Groen AK, Kuipers F.** Reduced plasma cholesterol and increased fecal sterol loss in multidrug resistance gene 2 P-glycoprotein-deficient mice. *Gastroenterology*. 1998; 114: 1024-1034.
- Vu DD, Tuchweber B, Plaa GL, Yousef IM.** Pathogenesis of lithocholate-induced intrahepatic cholestasis: role of glucuronidation and hydroxylation of lithocholate. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1126: 53-59.
- Wang R, Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, Helgason CD, Ackerley C, Phillips MJ, Ling V.** Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98: 2011-2016.
- Wang DQ.** Aging per se is an independent risk factor for cholesterol gallstone formation in gallstone susceptible mice. *J Lipid Res*. 2002; 43: 1950-1959.
- Weill JH.** *Biochimie générale*. 5e edition, Masson paris. 1987

- Weisiger RA.** When is a carrier not a membrane carrier? The cytoplasmic transport of amphipathic molecules. *Hepatology*. 1996; 24: 1288-1295.
- Wheater PR, Burkitt G, Daniels VG.** Histologie fonctionnelle. Illustrée par Philippe JD. Traduit par Bellot J et Élange F. 2^{ème} édition, Wheater PR, Auckland, mdDS/McGraw-Hill. Montréal, 1988.
- Whisher MH, Evans H.** Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. *Biochem J*. 1975; 146: 375-380.
- Whitehead MW, Hawkes ND, Hainsworth I, Kingham JG.** A prospective study of the causes of notably raised aspartate aminotransferase of liver origin. *Gut* 1999; 45:129-133.
- Wirtz KW.** Phospholipid transfer proteins. *Annu Rev Biochem*. 1991;60:73-99..
- Witzleben CL, Pitlick P, Bergmeyer J, Benoit R.** Acute manganese overload. A new experimental model of intrahepatic cholestasis. *Am J Pathol*. 1968; 53: 409-422.
- Witzleben CL.** Manganese-induced cholestasis: concurrent observations on bile flow rate and hepatic ultrastructure. *Am J Pathol*. 1969; 57: 617-625.
- Witzleben CL.** Bilirubin as a cholestatic agent. Physiologic and morphologic observations. *Am J Pathol*. 1971; 62: 181-194.
- Witzleben CL, Boyce WH.** Bilirubin as a cholestatic agent. III. Prevention of bilirubin-related cholestasis by sulfobromophthalein. *Arch Pathol*. 1975; 99: 492-495.
- Wolkoff AW.** Hepatocellular sinusoidal membrane organic anion transport and transporters. *Sem Liv Dis*. 1996; 16: 121-127.

- Yamada S, Lieber CS.** Decrease in microviscosity and cholesterol content of rat liver plasma membranes after chronic ethanol feeding. *J Clin Invest.* 1984; 74: 2285-2289.
- Yamashita G, Tazuma S, Kajiyama G.** Effects of organic anions on biliary lipid secretion in rats. Importance of association with biliary lipid structures. *Biochem J.* 1992; 286: 193-196.
- Yeagle PL.** Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1985; 822: 267-287.
- Yousef IM, Fisher MM, Piekarski J, Holub BJ.** Activity of phospholipid-synthesizing enzymes in rat liver plasma membranes and the source of biliary lecithin. *Lipids.* 1977; 12: 140-144.
- Yousef IM, Murray RK.** Studies on the preparation of rat liver plasma membrane fractions and on their polypeptide patterns. *Can J Biochem.* 1978; 56: 713-721.
- Yousef IM.** Location of ATPase in liver membranes. *Gastroenterology.* 1979; 77: 606-608.
- Yousef IM, Lewittes M, Tuchweber B, Roy CC, Weber A.** Lithocholic acid-cholesterol interactions in rat liver plasma membrane fractions. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 796: 345-353.
- Yousef IM, Tuchweber B.** Effect of lithocholic acid on cholesterol synthesis and transport in the rat liver. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 796: 336-344.
- Yousef IM, Tuchweber B, Weber A, Roy CC.** Where is Na⁺, K⁺ ATPase

located in the liver cell plasma membrane? *Gastroenterology*. 1984; 86: 1632-1633.

Yousef IM, Barnwell SG, Tuchweber B, Weber A, Roy CC. Effect of complete sulfation of bile acids on bile formation in rats. *Hepatology*. 1987; 7: 535-542.

Yousef IM, Tuchweber B, Morazain R, Kugelmass R, Gauvin M, Roy CC, Weber AM. Cholesterol synthesis in the pathogenesis of lithocholic acid-induced cholestasis. *Lipids*. 1988;23:230-233.

Yousef IM, Bouchard G, Tuchweber B, Plaa GL. Mechanisms involved in bile acid-induced cholestasis. Dans: Plaa GL, Hewitt WR, eds. *Toxicology of the Liver*. Washington: Taylor and Francis. 1998; 347-381.

Zimmerman HJ, Lewis JH. Drug-induced cholestasis. *Med Toxicol*. 1987; 2: 112-160.

Zimmerman HJ. Drug-induced hepatic disease. Dans: Plaa GL, Hewitt WR, eds. *Toxicology of the Liver*. Washington: Taylor and Francis. 1998; 3-60.

Zimmerman HJ. Hepatotoxicity . The adverse effects of drug and other chemicals in the liver, ed2., Philadelphia, Lippincott William, Wilkins, 1999.

Zucker SD, Goessling W, Gollan JL. Intracellular transport of small hydrophobic compounds by the hepatocyte. *Semin Liver Dis*. 1996;16: 159-167.