

# Transporteurs biliaires : de la génétique à la clinique

## MODULE 3

Olivier ROSMORDUC, Raoul POUPON

Service d'Hépatologie et INSERM U402, Hôpital Saint-Antoine, AP-Hôpitaux de Paris et Université Paris 6, 184, rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 Paris Cedex 12.

## TABLE DES MATIÈRES

### LES TRANSPORTEURS HÉPATOBIILAIRES

### LES RÉCEPTEURS NUCLÉAIRES

### EXPRESSION CLINIQUE D'ANOMALIES DES TRANSPORTEURS HÉPATOBIILAIRES

- Biotransformation des médicaments
- Cholestase intrahépatique familiale
- Cholestase intrahépatique de type 1 (maladie de Byler)
- Cholestase récurrente bénigne
- Cholestase intrahépatique de type 2
- Cholestase intrahépatique de type 3
- Lithiase biliaire de cholestérol
- Mucoviscidose
- Sitosterolémie
- Métabolisme du cholestérol
- Syndrome de Dubin-Johnson
- Cholestase intrahépatique de la grossesse

### EXPRESSION DES TRANSPORTEURS HÉPATOBIILAIRES AU COURS DE LA CHOLESTASE

### PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES

### CONCLUSION

## CONTENTS

### Hepatobiliary transporters: from genomics to diseases

Olivier ROSMORDUC, Raoul POUPON

(Gastroenterol Clin Biol 2004;28:D112-D120)

### HEPATOBIILARY TRANSPORTERS

### NUCLEAR RECEPTORS

### CLINICAL FEATURES ASSOCIATED WITH BILIARY TRANSPORTER DEFECTS

- Drug metabolism
- Progressive familial intrahepatic cholestasis
- Progressive familial intrahepatic cholestasis type 1
- Benign recurrent intrahepatic cholestasis
- Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2
- Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3
- Biliary cholesterol lithiasis
- Cystic fibrosis
- Sitosterolemia
- Cholesterol metabolism
- Dubin-Johnson syndrome
- Cholestasis of pregnancy

### HEPATOBIILARY TRANSPORTERS EXPRESSION ASSOCIATED WITH CHOLESTASIS

### APPLICATIONS FOR BILIARY DISEASE THERAPY

### CONCLUSION

La fonction biliaire est une fonction hépatospécifique dont le rôle est d'assurer l'élimination des xénobiotiques et de certains endobiotiques potentiellement toxiques comme la bilirubine, le cholestérol et leurs produits de dégradation les acides biliaires primaires ou secondaires. Cette fonction est assurée par le transport vectoriel de substrats à travers trois compartiments disposés en série : l'espace vasculaire, l'espace hépatocytaire et l'espace biliaire. L'espace vasculaire est constitué par les sinusoides dont le volume total est équivalent au volume hépatocytaire. Les hépatocytes sont des cellules polarisées comprenant une membrane basolatérale au contact du sang sinusoidal et un pôle luminal délimitant un espace clos de 2 à 3 µm, le canalicule biliaire. Les canalicules biliaires ont une longueur totale d'environ 2 km et rejoignent les canaux biliaires interlobulaires, puis segmentaires, bordés par les cellules biliaires ou cholangiocytes. La bile élaborée initialement par les hépatocytes dans le canalicule biliaire est ensuite modifiée par des mécanismes de sécrétion et de réabsorption tout au long de sa progression dans les canaux biliaires. Le principal déterminant de la formation de la bile est un processus de filtration osmotique. Les solutés actifs sur le plan osmotique sont transpor-

tés au pôle canaliculaire des hépatocytes par des mécanismes de transport requérant de l'énergie. On distingue classiquement deux fractions dans la sécrétion biliaire, la fraction dépendante des acides biliaires et la fraction indépendante. Cette dernière est assurée par le transport du glutathion au niveau de la membrane canaliculaire, du chlore, du bicarbonate et de l'eau au niveau des canaux biliaires bordés de cholangiocytes.

Dans l'état actuel des connaissances, certaines maladies sont associées à des défauts de la sécrétion canaliculaire hépatocytaire ou à des anomalies des fonctions des cellules bordant les canaux biliaires, les cholangiocytes. Les maladies cholestatiques d'origine hépatocytaire résultent de mutations génétiques ou d'altérations secondaires à des médicaments, à des toxiques ou à des agressions virales. Les cholangiopathies sont représentées chez l'enfant principalement par la mucoviscidose, le syndrome d'Alagille, et les cholestases familiales progressives alors que les cholangiopathies de l'adulte sont principalement représentées par la cirrhose biliaire primitive et les cholangites sclérosantes, un ensemble de maladies inflammatoires associées très fréquemment à des entérocrites inflammatoires. Quelle que soit leur origine, génétique ou acquise, ces maladies s'accompagnent de

modifications de l'expression et de la fonction des protéines régulant la fonction biliaire et l'homéostasie des acides biliaires et des lipides.

## Les transporteurs hépatobiliaires

La figure 1 et le tableau I listent les principaux transporteurs membranaires qui déterminent la fonction biliaire. Ils ont été clonés à partir du foie humain et du foie de rongeur. Plusieurs revues récentes font le point sur la fonction et la régulation de ces protéines membranaires de transport [1-3]

Ces transporteurs sont des membres de la famille des « Solute Carriers » (SLCs) dont le rôle est d'assurer le transport vectoriel les acides biliaires et des substances organiques du sang portal vers l'hépatocyte puis le canalicule biliaire. Les substrats de ces *solute carriers* sont non seulement des endo- ou des xénobiotiques mais également des médiateurs de l'inflammation (cytokines, leucotriènes...). Ces transporteurs comprennent les membres de la famille des OATP ou *organic anion transporter* (SLC21) ainsi que Ntcp (SLC10A1), ce dernier assure la captation des acides biliaires, de la bilirubine et de la majorité des xénobiotiques. La sortie de l'hépatocyte vers la bile est assurée par plusieurs transporteurs canaliculaires appartenant à la super famille ABC (*ATP Binding Cassette*). Ces transporteurs requièrent de l'énergie fournie par l'ATP. Les principaux ABC transporteurs sont MDR1 (ABCB1) et BSEP (ABCB11), principal transporteur des acides biliaires, MRP2 (ABCC2), responsable du transport de la bilirubine conjuguée et du glutathion (principal déterminant de la fraction indépendante des acides biliaires), et MDR3 (ABCB4) responsable du transport des phospholipides. Certains transporteurs pour les acides biliaires et les solutés organiques sont également présents dans les cholangiocytes en particulier, ASBT (Apical Bile Salt Transporter) (SLC10A2). Situé sur la membrane

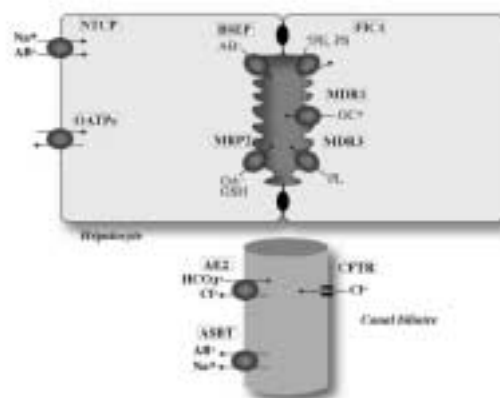


Fig. 1 – Localisation des principaux transporteurs hépatobiliaires.  
*Localization of the main hepatobiliary transporters.*

luminaire, sa fonction est de réabsorber les acides biliaires de la bile en amont d'un obstacle fonctionnel ou organique sur les petites voies biliaires. Ce transporteur est également présent sur la membrane luminaire des cellules épithéliales de l'intestin grêle terminal où se fait la réabsorption active des acides biliaires. MDR1 (ABCB1) est également présent sur la membrane luminaire des cholangiocytes et des cellules épithéliales de l'intestin grêle. Deux transporteurs, CFTR (ABCC7) et AE2 (SLC4A2), situés sur la membrane luminaire des cholangiocytes, ont pour fonction

Tableau I. – Localisation et fonctions des principaux transporteurs hépatocytaires impliqués dans l'homéostasie biliaire.

*Localisation and function of the main hepatobiliary transporters involved in bile homeostasis.*

Transporteurs membranaires basolatéraux		
Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide	Ntcp (SLC10A1)	Principal transporteur des acides biliaires sodium dépendant
Organic-anion-transporting polypeptides	OATPs (SLC21A)	Transporteur sodium indépendant de nombreux anions organiques et de solutés organiques amphipathes
Transporteurs canaliculaires		
Multidrug-resistance-1	MDR1 (ABCB1)	Excrétion ATP-dépendante de cations organiques, xénobiotiques et cytotoxines
Multidrug-resistance-3 P-glycoprotein	MDR3 (ABCB4)	Translocation ATP-dépendante de la phosphatidylcholine
Multidrug-resistance-associated protein 2	MRP2 (ABCC2)	Transport ATP-dépendant de nombreux anions organiques principal déterminant du transport du glutathion
Canalicular bile salt export pump	BSEP (ABCB11)	Transport ATP-dépendant des acides biliaires
Chloride-bicarbonate anion exchanger isoform 2	AE2 (SLC4A2)	Sécrétion de bicarbonate
Transporteurs cholangiocytaires		
Apical sodium dependent bile salt transporter	ASBT (SLC10A2)	Facilite l'extraction des acides biliaires de la bile en cas de cholestase. Localisé également dans l'intestin. Principale protéine de transport des acides biliaires
Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator	CFTR (ABCC7)	Canal chlore facilitant l'échange chlore-bicarbonate
Chloride-bicarbonate anion exchanger isoform 2	AE2 (SLC4A2)	Sécrétion de bicarbonate

**Tableau II.** – Facteurs de transcription impliqués dans l’homeostasie biliaire.  
*Transcription factors involved in bile homeostasis.*

Récepteurs nucléaires		
Farnesoid X activated receptor	FXR (NR1H4)	Gènes cibles BSEP, ASBT, MRP2
Pregnane X receptor/Steroid X receptor	PXR/SXR (NR1I2)	Gènes cibles CYP3A, MRP2
Liver X receptor alpha	LXRalpha (NR1H3)	ABCA1, CYP7A1, ABCG8, ABCG5, NFkB, COX2, IL6

d’assurer l’échange chlore-bicarbonate et ainsi de générer une sécrétion biliaire appropriée. Toutes ces protéines exprimées de façon constitutive dans l’hépatocyte ou les cholangiocytes subissent une régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle. La régulation transcriptionnelle est sous contrôle de récepteurs nucléaires dont les ligands sont les acides biliaires, les oxystérols, la vitamine A et ses dérivés, les xénobiotiques.

## Les récepteurs nucléaires

La superfamille des récepteurs nucléaires est constituée d’un grand nombre de protéines activées par des ligands impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques [4-8]. Le *Pregnane X Receptor* (PXR), appelé également *Steroid and Xenobiotic Receptor* (SXR), le *Liver X Receptor* (LXR) et le *Farnesoid X Receptor* (FXR) (tableau II) sont impliqués dans la régulation de l’expression des gènes chargés de l’homéostasie des acides biliaires et l’élimination biliaire des endo- et des xénobiotiques. Ces récepteurs forment des hétérodimères avec un partenaire commun, RXR.

Les principaux ligands de FXR sont les acides biliaires hydrophobes (en particulier l’acide chénodéoxycholique). À titre d’exemple, la figure 2 schématise le rôle de FXR dans l’homéostasie des acides biliaires [9]. La fonction de FXR a été récemment précisée par un modèle de souris invalidées pour ce facteur de transcription [10-11].

SXR/PXR a pour principaux ligands des xénobiotiques (en particulier la rifampicine) et les acides biliaires hydrophobes. Les souris invalidées pour PXR sont incapables de métaboliser un grand nombre de médicaments et développent une atteinte hépatique sévère. PXR, comme FXR, a un rôle physiologique protecteur contre l’excès d’acides biliaires dans les cellules hépatiques et biliaires [12, 18].

LXR constitue une classe de récepteurs nucléaires activés par les oxystérols. Les gènes hépatiques cibles de LXR sont CYP7A1, ABCG5, ABCG8 (gènes impliqués dans le métabolisme, l’absorption et la sécrétion digestive du cholestérol) [19-20].

## Expression clinique d’anomalies des transporteurs hépatobiliaires

### Biotransformation des médicaments

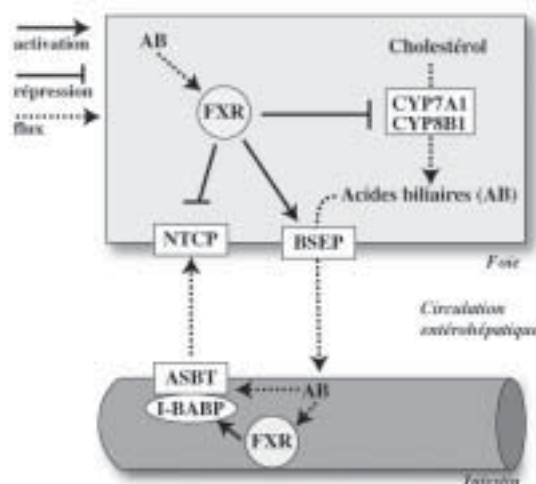
Il existe trois transporteurs des xénobiotiques amphiphiles au niveau de la membrane canaliculaire : MDR1 (ABCB1), MRP2 (ABCC2) et BCRP (ABCG2). *In vitro*, ces transporteurs sont capables d’induire une résistance vis-à-vis d’agents cytotoxiques.

MDR1 a un large spectre de cibles et provoque une extrusion de ces composés en dehors de la cellule. Son expression est localisée essentiellement au niveau de la membrane canalicu-

laire, de la barrière hématoencéphalique, et de l’épithélium intestinal. Les souris invalidées pour le gène *mdr1a* développent des colites inflammatoires. Il n’y a pas de maladie décrite chez l’homme associée avec un déficit en MDR1 en dehors de la susceptibilité à la colite ulcéreuse liée à un polymorphisme (C3435T) [21] et peut-être à certaines tumeurs du rein [22]. Parmi les polymorphismes décrits chez l’homme, certains d’entre eux (C3435T) sont associés à une plus grande biodisponibilité de certains médicaments (digoxine) [23] en raison d’une diminution de l’expression duodénale de la protéine, ou à une résistance à l’effet thérapeutique d’autres médicaments (antiépileptiques ou antirétroviraux) [24-26].

MRP2 est exprimé essentiellement au niveau des hépatocytes et moins au niveau des entérocytes, du tubule rénal ou de la barrière hémato-encéphalique [27, 28]. Il transporte les anions organiques incluant les dérivés conjugués avec l’acide glucuronique, le glutathion ou les sulfates. Dans certaines circonstances (couplage avec le glutathion), il peut aussi transporter certains médicaments et pourrait jouer un rôle de détoxification similaire à MDR1 au niveau de l’intestin. Des polymorphismes de MRP2 (ABCC2) pourraient influencer la biodisponibilité de certains médicaments oraux [29].

BCRP (ABCG2) confère aussi une résistance aux médicaments cytotoxiques (doxorubicine, topotecan). Il est présent au



**Fig. 2** – Régulation de l’homéostasie biliaire par le récepteur nucléaire FXR.

La liaison de FXR à son ligand, l’acide biliaire, entraîne une diminution de l’expression de NTCP ainsi que de CYP7A1 et de CYP8B1, responsables de la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol dans l’hépatocyte. La liaison de l’acide biliaire à FXR et sa fixation sur les gènes cibles entraînent également une augmentation de la transcription et de l’expression de BSEP. Ainsi, FXR est le régulateur négatif de la concentration intrahépatocyttaire des acides biliaires.

*Bile homeostasis regulation by the FXR transcription factor.*

**Tableau III.** – Caractéristiques cliniques, biologiques et génétiques des cholestases familiales intrahépatiques progressives.  
*Clinical, biological and genetic features of progressive familial intrahepatic cholestasis.*

	CFIP de type 1	CFIP de type 2	CFIP de type 3
Transmission	Autosomique récessif	Autosomique récessif	Autosomique récessif
Prurit	+++	+++	+
γGT	normale	normale	élevée
Prolifération ductulaire	non	non	oui
Locus	18q21-22	2q24	7q21
Protéine	FIC1 (ATP8B1)	BSEP (ABCB11)	MDR3 (ABCB4)
Localisation	Membrane canaliculaire et cholangiulaire (apicale), pancréas et intestin (apicale)	Membrane canaliculaire	Membrane canaliculaire
Fonction	Flippase Transport des acides biliaires ( ?)	Transport des acides biliaires	Translocation de la phosphatidylcholine
Bile	Absence des acides biliaires primaires	Absence des acides biliaires primaires	Absence de la phosphatidylcholine

niveau de la membrane apicale des entérocytes et des hépatocytes. Comme MRP2 et MDR1, il semble jouer un rôle important dans la biodisponibilité de certains médicaments administrés par voie orale.

## Cholestase intrahépatique familiale

Les mutations de plusieurs transporteurs ABC sont considérées comme responsables des cholestases familiales progressives (CFIP) chez l'enfant [31, 32]. Ces maladies hétérogènes se présentent sous deux formes : à GGT normales (Byler de type 1 et 2) ou à GGT élevées (type 3) (voir tableau III).

### Cholestase intrahépatique familiale de type 1 (maladie de Byler)

Ce syndrome très rare a été décrit initialement dans une famille de la communauté Amish. Ces enfants se présentent avec une stéatorrhée, une diarrhée, un ictère et une hépatosplénomégalie. L'évolution se fait vers une insuffisance hépatocellulaire et la mort (en l'absence de transplantation) avant 10 ans. La concentration d'acides biliaires est élevée dans le sang et faible dans la bile. L'ictère n'est que la conséquence de la diminution de la formation de la fraction de la bile liée aux acides biliaires. La stéatorrhée est aussi liée à l'absence d'acides biliaires dans l'intestin. De façon remarquable, une diversion biliaire permet de diminuer le prurit et la concentration sérique en acide biliaires.

Cette forme de la maladie de Byler est liée à des mutations d'un gène situé sur le chromosome 18q21-q22, codant pour la protéine FIC1, localisée au niveau de la membrane canaliculaire et dans les cholangiocytes mais aussi dans le pancréas et l'intestin [33].

Cette protéine appartient à la famille des ATPases de type P. Sa fonction est mal connue. En raison de son homologie avec une ATPase de la levure, il a été suggéré que cette protéine pouvait être une flippase assurant le transfert de phosphatidyl sérine et phosphatidyl éthanolamine du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane cellulaire. Ce résultat est incertain, d'autres études ont suggéré que la protéine pourrait être un transporteur de cations. Le mécanisme par lequel une anomalie de FIC1 (ATP8B1) détermine une absence d'acides biliaires (essentiellement l'acide chénodéoxycholique) est inconnu. Une hypothèse est que FIC1 serait impliquée dans le cycle entérohépatique des acides biliaires. L'altération de la fonction de flippase pourrait provoquer des perturbations de la fonction d'autres transporteurs. FIC1 pourrait par ailleurs être également un

transporteur d'acides biliaires favorisant la sortie des acides les plus hydrophobes et donc potentiellement cholestastiques [34]. Plus récemment, il a été montré une diminution de la translocation nucléaire de FXR chez les malades aboutissant à une augmentation de l'absorption iléale et une diminution de sécrétion biliaire des acides biliaires [35].

### Cholestase récurrente bénigne

La cholestase récurrente bénigne représente probablement une forme atténuée de la cholestase intrahépatique de type 1. Il s'agit en effet d'une maladie bénigne caractérisée par des épisodes transitoires de cholestase, parfois intense, et qui régresse sans séquelle en quelques semaines à quelques mois. Ce phénotype atténué pourrait être expliqué par la nature faux-sens des mutations identifiées permettant probablement une activité résiduelle de FIC1 à la différence des mutations non sens, délétions et changements de cadre de lecture observés dans la cholestase familiale de type 1 [34].

### Cholestase intrahépatique de type 2

La cholestase familiale de type 2 est également une maladie cholestastique très rare et sévère, conduisant à l'insuffisance hépatique à moins de réaliser une transplantation. Bien que le phénotype de la maladie soit très proche de celui de la cholestase familiale de type 1, l'activité sérique des GGT est cependant normale et les malades ne présentent pas de diarrhée. Des mutations de la protéine BSEP sont responsables du phénotype clinique de ces malades. Bien qu'environ 30 mutations (non sens, faux sens et délétions) différentes aient été décrites, deux mutations semblent plus fréquentes en Europe : E297G et D482G [36-37]. Le gène correspondant est situé sur le chromosome 2q24. Le mécanisme à l'origine de l'anomalie de BSEP dépend du type de mutation : G238V ou E297G entraînent une anomalie du routage de la protéine, D482G ou G892R entraînent une diminution de l'activité du transporteur et la protéine portant la mutation G238V est rapidement dégradée [38]. Il n'y a pas d'acides biliaires sécrétés dans la bile. Un modèle de souris transgéniques invalidées pour le gène *bsep* a été décrit [39]. Cependant, le phénotype diffère un peu de celui des malades puisque la cholestase est modérée.

### Cholestase intrahépatique de type 3

La cholestase familiale de type 3 est secondaire à des mutations du gène *mdr3*, le translocateur des phospholipides au

niveau de la membrane canaliculaire. Elle est caractérisée par une hypertension portale, une hépatosplénomégalie, un ictère, un prurit et sur le plan biologique des  $\gamma$ GT élevés mais pas d'hypercholestérolémie. La protéine est absente ou faiblement exprimée dans le foie de ces malades. Les lésions histologiques sont sévères (inflammation portale, prolifération ductulaire voire cirrhose). La bile de ces malades est caractérisée par une concentration très basse en phospholipides avec pour conséquence une moindre protection vis-à-vis de l'action cytotoxique des acides biliaires. Dans une série récente de 31 malades avec cette forme de cholestase, le groupe de Jacquemin a identifié 17 malades ayant une mutation de ce gène [40]. Le phénotype observé va de la cholestase néonatale à la cirrhose de l'adulte jeune. L'administration précoce d'acide ursodésoxycholique permet d'améliorer les symptômes chez la moitié des malades. Il est probable que l'effet n'est observé que lorsqu'il persiste une activité résiduelle de la protéine qui dépend elle-même de la mutation en cause.

Il existe un modèle d'animaux invalidés pour le gène *mdr2*, l'homologue murin du gène *mdr3*. Ces animaux développent aussi une fibrose hépatique puis une cirrhose. Dans certaines circonstances expérimentales (ligature de la voie biliaire principale), ces animaux peuvent développer des lésions biliaires macroscopiques et histologiques très proches de celles observées au cours de la cholangite sclérosante chez l'homme [41].

## Lithiase biliaire de cholestérol

Une forme symptomatique (parfois compliquée de pancréatite aiguë ou d'angiocholite) et récidivante de lithiase biliaire de cholestérol a été identifiée chez l'adulte jeune [42]. La majorité de ces malades ont eu la première manifestation de leur maladie avant l'âge de 40 ans, souvent en fin de grossesse ou au décours de celle-ci et la présence de matériel échogène dans les voies biliaires intrahépatiques sous la forme de foyers hyperéchogènes en « queue de comète » avec ou sans microlithiase ou sludge associés. La majorité de ces patients ont présenté des douleurs récidivantes après une cholécystectomie. La composition de la bile de ces malades est caractérisée par une concentration basse en phospholipides et un rapport cholestérol/phospholipides élevé, renforçant l'hypothèse d'une anomalie du transporteur biliaire des phospholipides ABCB4. L'analyse génétique a effectivement montré la présence de mutations de ce gène chez tous les malades. Il s'agissait d'une mutation non-sens hétérozygote et de mutations faux-sens (hétérozygotes ou homozygotes) chez les autres malades. Chaque mutation intéressait une région conservée ou fonctionnellement importante de la protéine *mdr3* [42]. Le rôle de *mdr3* (ABCB4) comme gène de susceptibilité à la lithiase biliaire de cholestérol a été conforté par une étude japonaise montrant que la présence de calculs intra-hépatiques était associée à une concentration biliaire basse en phospholipides, un rapport cholestérol/phospholipides élevé et une expression diminuée des ARN codant la protéine MDR3 [43]. Il a été aussi montré que les patients ayant présenté des épisodes de pancréatites aiguës récidivantes associées à la présence de microlithiases biliaires avaient une sursaturation de la bile en cholestérol et une diminution des phospholipides dans la bile [44].

Dans un travail récent, une mutation du gène *mdr3* a été mise en évidence chez 18/32 (56 %) malades présentant le syndrome décrit ci-dessus (Low Phospholipid Associated Cholelithiasis ou LPAC) alors qu'aucune mutation n'a été observée chez les malades ayant une lithiase vésiculaire classique ou dans une population témoin [45]. Dans la série pédiatrique française de cholestase familiale intrahépatique de type 3, il a été aussi observé des calculs de cholestérol intrahépatiques ou vésiculaires chez certains enfants et leurs parents ainsi qu'un rapport

cholestérol/phospholipides élevé dans la bile [40, 46]. D'autre part, il a été montré que la lithiase biliaire est plus fréquente au cours de la cholestase gravidique, et des mutations du gène *mdr3* (ABCB4) ont été décrites chez des malades présentant un tableau de cholestase gravidique associé à une lithiase biliaire [47, 48]. Enfin, des cristaux et des microcalculs de cholestérol ont aussi été observés dans la bile des animaux invalidés pour le gène *mdr2* [49, 50]. Ces résultats confirment le rôle d'anomalies du gène *mdr3* dans certaines formes de lithiase biliaire.

## Mucoviscidose

Les mutations de *cftr* sont responsables d'un défaut de sécrétion de chlore par les cholangiocytes et déterminent une cholestase et une inflammation des voies biliaires chez 10 à 20 % des malades ayant une mucoviscidose (voir revues spécifiques sur le sujet). Le rôle aggravant des mutations de *cftr* dans certaines formes de maladies inflammatoires des voies biliaires de l'adulte a été suggéré [51].

## Sitostérolémie

Il s'agit d'une maladie très rare de transmission récessive. La présentation clinique comporte des xanthomes de tendons, une athérosclérose précoce, une hémolyse et une atteinte articulaire. Sur le plan biologique, il existe une accumulation plasmatique de stérols végétaux et en particulier de sitostérol (24-éthyl cholestérol). L'anomalie consiste en une augmentation de l'absorption intestinale de stérols alimentaires (30 à 60 % au lieu de 5 %) en quantité équivalente au cholestérol. Cette hyperabsorption se traduit par une accumulation de ces composés dans le sang mais aussi dans différents tissus (foie, cœur, hématies) puisque ces stérols ne peuvent pas être éliminés dans la bile. Des mutations des gènes *abcg5* et *abcg8* sont associés à cette pathologie. Ces gènes codent pour deux semi-transporteurs et sont situés sur le même chromosome (2p21). Les protéines correspondantes sont présentes dans le foie et dans l'intestin et s'associent en un hétérodimère pour former une pompe permettant d'excréter les stérols végétaux dans la lumière intestinale et dans la bile [52] (figure 3).

## Métabolisme du cholestérol

Des travaux récents ont montré que les transporteurs ABCG5 et ABCG8 étaient aussi exprimés au niveau de la membrane apicale des hépatocytes et régulés par les facteurs de transcription LXR et RXR [53, 54]. En effet, l'expression de ces protéines dans des modèles de souris transgéniques s'est accompagnée d'une augmentation de l'excrétion biliaire de cholestérol, de l'excrétion fécale des stérols neutres et d'une diminution des stérols d'origine végétale dans le sérum [55]. Il apparaît donc qu'une concentration suffisante de cholestérol pour entraîner une sursaturation de la bile pourrait être engendrée par une surexpression même modérée de ces gènes comme celle possiblement induite par un simple polymorphisme. De façon similaire, il a été montré qu'un polymorphisme de *abcg5* (C1950G) pouvait être associé à une augmentation de la concentration sérique de cholestérol chez l'homme [56].

Les modifications de l'expression de ces gènes au cours des maladies du foie ne sont pas connues, bien que des éléments de réponse aient été récemment apportés par des modèles expérimentaux. Par exemple, il a été récemment montré que la Cholestase induite par ligature du cholédoque chez le rat entraîne une diminution de l'expression d'ABCG5 et ABCG8, suggérant un mécanisme d'adaptation à l'impossibilité d'excréter le cholestérol dans la bile dans cette situation pathologique

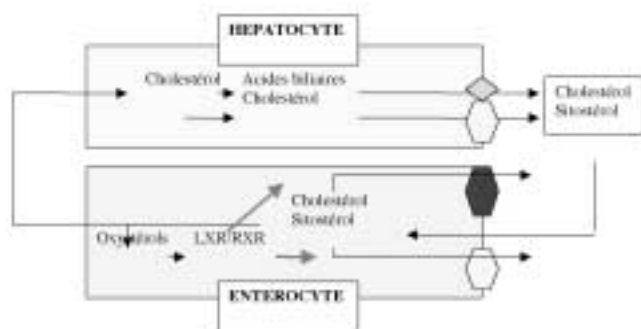


Fig. 3 – Transport biliaire et entérocytaire du cholestérol.

Les acides biliaires facilitent la solubilisation et l'absorption du cholestérol et des stérols d'origine végétale (sitostérol) par l'entérocyte. Les différents stérols absorbés induisent l'expression de ABCA1 et ABCG5 et ABCG8 via l'activation des facteurs de transcription LXR/FXR. Cette régulation permet d'éliminer la majorité des stérols végétaux et un peu de cholestérol dans la lumière intestinale. Les transporteurs ABCG5 et ABCG8 ont aussi été identifiés au niveau de la membrane canaliculaire de l'hépatocyte et pourraient constituer, avec la transformation en acides biliaires, une voie importante d'élimination du cholestérol par sécrétion biliaire directe.

*Cholesterol transport in hepatocytes and enterocytes.*

[57]. D'autre part, les souris invalidées pour le facteur de transcription LXR qui régule ces gènes, accumulent du cholestérol dans le foie et peuvent développer une cirrhose [58]. L'ensemble de ces données suggère que les gènes *abcg5* et *abcg8* pourraient participer à la sécrétion biliaire canaliculaire de cholestérol et d'autres stérols vers des accepteurs (par exemple, les phospholipides et les acides biliaires) pour former les micelles mixtes ou les vésicules riches en cholestérol [53-55], et que des anomalies de ces gènes pourraient jouer un rôle dans la régulation de la cholestérolémie, l'athérosclérose voire la lithiase biliaire en association avec d'autres anomalies génétiques (cf. supra) ou certains facteurs environnementaux.

## Syndrome de Dubin-Johnson

Le syndrome de Dubin-Johnson est rare (1/0,5 10<sup>5</sup> sujets) et caractérisé par une hyperbilirubinémie à prédominance conjuguée d'évolution chronique sans hémolyse. L'histologie hépatique est normale à l'exception d'une accumulation lysosomiale d'un pigment noir mélanine-like possiblement lié à des métabolites d'acides aminés aromatiques polymérisés. Plusieurs mutations du gène codant pour *mvp2* (faux sens, non sens, stop, délétions) ont été décrites. Il existe aussi 2 modèles animaux du syndrome de Dubin-Johnson qui ont chacun une mutation du gène *mvp2* conduisant à un codon stop (délétion et substitution) [60-62].

## Cholestase intrahépatique de la grossesse

Il s'agit d'une forme réversible de cholestase qui apparaît au troisième trimestre de la grossesse et régresse rapidement après l'accouchement [47]. L'incidence est de 10 à 100 cas pour 10<sup>5</sup> grossesses et atteint 16 et 28 % au Chili et dans certaines ethnies (Indiens Araucanien). Les principaux symptômes sont le prurit et dans une moindre mesure l'ictère. Il existe aussi une augmentation de l'incidence de la prématurité, de la mort *in utero* ou des détresses fœtales associées à la cholestase. Les arguments en faveur d'une origine génétique de ce syndrome sont le facteur de risque ethnique et la mise en évidence de mutations hétérozygo-

tes du gène *mdr3* chez des femmes ayant présenté ce syndrome dans une famille consanguine où il existe aussi des enfants atteints de *pfic3* [63], ou des cas sporadiques [64-66]. Cependant, il existe une hétérogénéité génétique de cette maladie avec au moins une forme dominante non liée à *mdr3* [67]. D'autres gènes pourraient être impliqués, en particulier le gène *fic1* puisque un cas de cholestase intrahépatique de la grossesse a été décrit chez une mère d'enfant atteint de maladie de Byler.

Le mécanisme à l'origine de ce syndrome est inconnu mais pourrait faire intervenir le niveau élevé d'hormones au troisième trimestre de la grossesse. Il est bien établi que les œstrogènes peuvent être cholestatiques dans des modèles expérimentaux mais la progestérone (ou certains de ses métabolites) pourrait aussi intervenir en particulier au niveau de MDR3 [47]. L'incidence de la cholestase liée aux œstrogènes est en effet plus élevée chez les femmes avec antécédents de cholestase gravidique. Ces observations sont compatibles avec une réduction de la formation de la bile pendant la grossesse qui devient cliniquement évidente (sous la forme d'une cholestase) en raison d'une anomalie génétique sous-jacente préexistante.

## Expression des transporteurs hépatobiliaires au cours de la cholestase

Les principales modifications observées concernent les transporteurs basolatéraux de l'hépatocyte, les transporteurs canaliculaires, les transporteurs cholangiocytaires, les transporteurs intestinaux et également les transporteurs rénaux [68-71]. Dans toutes les formes de cholestase, il est observé une diminution de l'expression de NTCP aboutissant à une diminution de la captation des acides biliaires. Il a été aussi montré que MDR1, le transporteur des cations organiques (colchicine, ciclosporine, doxorubicine, tamoxifène, tacrolimus etc..) est induit au cours des maladies cholestatiques. L'expression hépatique de MDR3 (ABCB4) dans les modèles expérimentaux est peu modifiée. L'expression de BSEP (ABCB11) et de MRP2 (ABCC2) est maintenue au pôle canaliculaire. Ainsi, l'adaptation des transporteurs a pour but essentiellement de préserver l'hépatocyte de l'accumulation intracellulaire de toxiques endogènes (acides biliaires) ou exogènes.

Le mécanisme de la régulation adaptative des transporteurs biliaires est mal connu mais constitue une thématique émergente dont l'intérêt est évident puisque la connaissance de ces mécanismes ouvre la voie à des thérapeutiques médicales adaptées à chaque situation.

## Perspectives thérapeutiques

Le principal traitement des maladies cholestatiques est l'acide ursodésoxycholique le 7-bêta épimère de l'acide chénodésoxycholique, un acide biliaire présent en très petite quantité chez l'homme et aux propriétés déconcertantes [72-75]. La base rationnelle de l'utilisation de ce traitement reposait initialement sur l'hypothèse que la cholestase et l'accumulation des acides biliaires hydrophobes dans le foie consécutives à l'inflammation et à la destruction des cholangiocytes, étaient en grande partie responsables de l'évolution des maladies cholestatiques vers la cirrhose et l'insuffisance hépatocellulaire terminale. Cette hypothèse a été testée dans des essais thérapeutiques contrôlés qui ont effectivement montré que cet acide biliaire stoppait ou ralentissait l'évolution de nombreuses maladies cholestatiques, en particulier la cirrhose biliaire primitive. L'acide ursodésoxycholique est de ce fait considéré comme le traitement de référence de la cirrhose biliaire primitive et ses indications sont étendues à des maladies

cholestatiques telles que les cholangites sclérosantes primitives, certaines cholestases familiales progressives, la mucoviscidose, la cholestase gravidique, la cholestase de la nutrition parentérale et certaines cholestases médicamenteuses.

Le mécanisme d'action de l'acide ursodésoxycholique est complexe [76, 77]. Cet acide biliaire entraîne une déplétion des acides biliaires endogènes hydrophobes dans le foie et les cholangiocytes, les protégeant ainsi de l'action toxique de ces stéroïdes. Il diminue la réabsorption iléale des acides biliaires et possède des propriétés anti-apoptotiques [78, 79]. Il augmente l'activité canaliculaire des protéines chargées du transport des acides biliaires, de l'hépatocyte vers la bile [80, 81] et active le récepteur nucléaire PXR et son homologue humain SXR [11, 15]. D'autres mécanismes pourraient expliquer les effets bénéfiques de l'acide ursodésoxycholique, diminution de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité sur les hépatocytes et les cholangiocytes, augmentation de l'expression et de l'activité de l'échangeur AE2 dans le foie, diminution de l'activité des gènes de l'inflammation (NO synthase, Cyclo-oxygénase de type 2...). Enfin, la rifampicine, qui, comme l'acide ursodésoxycholique est un ligand de SXR, a aussi un effet bénéfique dans les maladies cholestatiques, suggérant que le facteur de transcription SXR pourrait jouer un rôle clé dans l'expression clinique de ces maladies.

## Conclusion

La connaissance de plus en plus précise des transporteurs hépatobiliaires, des récepteurs nucléaires et des mécanismes physiopathologiques des maladies cholestatiques ouvre la voie à la chimiogénomique qui devrait permettre le développement d'agonistes ou d'antagonistes thérapeutiques spécifiques des altérations observées au cours de ces maladies hépatiques. Ces nouvelles voies thérapeutiques devraient diminuer la morbidité, la mortalité de ces maladies invalidantes ainsi que le nombre de transplantations hépatiques réalisées dans ces indications.

## RÉFÉRENCES

- Jansen PL. Foreword : from classic bile physiology to cloned transporters. *Semin Liver Dis* 2000;20:245-50.
- Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 2002;64:635-61.
- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med* 1998;339:1217-27.
- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology : opening the X-files. *Science* 2001;294:1866-70.
- Olefsky JM. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 1999;97:161-3.
- Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 2001;276:36863-4.
- Karpen SJ. Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol* 2000;36:832-50.
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999;284:1362-5.
- Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PL, et al. Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* 2002;35:589-96.
- Kast HR, Nguyen CM, Sinal CJ, Jones SA, Laffitte BA, Reue K. Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription : a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol Endocrinol* 2001;15:1720-8.
- Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000;102:731-44.
- Xie W, Radomska-Pandya A, Shi Y, Simon CM, Nelson MC, Ong ES. An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3375-80.
- Staudinger J, Liu Y, Madan A, Habeebu S, Klaassen CD. Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor. *Drug Metab Dispos* 2002;29:1467-72.
- Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, Mackenzie KI, Latour A. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3369-74.
- Kliwer SA, Willson TM. Regulation of xenobiotic and bile acid metabolism by the nuclear pregnane X receptor. *J Lipid Res* 2002;43:359-64.
- Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med* 2001;7:584-90.
- Schuetz EG, Strom S, Yasuda K, Lecureur V, Assem M, Brimer C. Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. *J Biol Chem* 2001;276:39411-8.
- Xie W, Yeuh MF, Radomska-Pandya A, Saini SP, Negishi Y, Bottroff BS. Control of steroid, heme and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4150-5.
- Yu L, York J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003;278:15-565-70.
- Plosch T, Kok T, Bloks VW, Smit MJ, Havinga R, Chemini G, Groen AK, Kuipers F. Increased hepatobiliary and fecal cholesterol excretion upon activation of the liver X receptor is independent of ABCA1. *J Biol Chem* 2002;277:33870-7.
- Schwab M, Schaffeler E, Marx C, Fromm MF, Kaskas B, Metzler J, et al. Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003;124:26-33.
- Siegmund M, Brinkmann U, Schaffeler E, Weirich G, Schwab M, Eichelbaum M, et al. Association of the P-glycoprotein transporter MDR1 (C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1847-54.
- Webster JL, Carlstedt-Duke J. Involvement of multidrug resistance proteins (MDR) in the modulation of glucocorticoid response. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;82:277-88.
- Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein D, et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med* 2003;348:1480-2.
- Brumme ZL, Dong WW, Chan KJ, Hogg RS, Montaner JS, O'shaughnessy, et al. Influence of polymorphisms within the CX3CR1 and MDR-1 genes on initial antiretroviral therapy response. *AIDS* 2003;17:201-8.
- Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, et al. Tacrolimus pharmacogenetics : polymorphisms associated with expression of cytochrome P4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation* 2002;74:1486-9.
- Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters : molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003;83:633-71.
- Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:124-31.
- Suzuki H, Sugiyama Y. Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2) : its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1311-31.

30. Bodo A, Bakos E, Szeri F, Varadi A, Sarkadi B. Differential modulation of the human liver conjugate transporters MRP2 and MRP3 (ABCC3) by bile acids and organic anions. *J Biol Chem* 2003;278:23529-37.
31. Jacquemin E, Hadchouel M. Genetic basis of progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Hepatol* 1999;31:377-81.
32. Jansen PL, Muller M. The molecular genetics of familial intrahepatic cholestasis. *Gut* 2000;47:1-5.
33. Eppens EF, Van Mil SWC, De Vree JML, Mok KS Juijn JA, Oude Elferink RPJ, et al. FIC1, the protein affected in two forms of hereditary cholestasis, is localized in the cholangiocyte and the canalicular membrane of the hepatocyte. *Journal of Hepatology* 2001;35:436-43.
34. Van Mil SWC, Klomp LWJ, Bull LN, Houwen RHJ. FIC1 disease : a spectrum of intrahepatic cholestatic disorders. *Semin Liver Dis* 2001; 21:535-44.
35. Chen F, Ananthanarayanan M, Emre S, Neimark E, Bull L, Knisely AS, et al. Progressive familial intrahepatic cholestasis, type 1, is associated with decreased farnesoid X receptor activity. *Gastroenterology* 2004, sous presse.
36. Jansen PIM, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Hooiveld GJEJ. Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1999;117:1370-9.
37. Thompson R, Strautnieks S. BSEP : function and role in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Semin Liver Dis* 2001;21:545-60.
38. Wang L, Soroka CJ, Boyer JL. The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest* 2002;110:965-72.
39. Wang R, Salem M, Yousef Im, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, et al. Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2011-6.
40. Jacquemin E. Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease : one gene for three diseases. *Semin Liver Dis* 2001;21:551-62.
41. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Weiglein AH, Lammert F, et al. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and *mdr2* knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology* 2002;123:1238-51.
42. Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 2001;120:1459-67.
43. Shoda J, Oda K, Suzuki H, Sugiyama Y, Ito K, Cohen D, et al. Etiologic significance of defects in cholesterol, phospholimid, and bile acid metabolism in the liver of patients with intrahepatic calculi. *Hepatology* 2001;33:1194-205.
44. Fracchia M, Pellegrino S, Secreto P, Gallo L, Masoero G, Pera A, et al. Biliary lipid composition in cholesterol microlithiasis. *Gut* 2001;489: 702-6.
45. Rosmorduc O, Hermelin B, Boelle PY, Parc R, Taboury J, Poupon R. ABCB4 gene mutation-associated cholelithiasis in adults. *Gastroenterology* 2003;125:452-9.
46. Jacquemin E, De Vree M, Cresteil D, Sokal E, Sturm E, Dumont M, et al. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency : from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* 2001; 120:1448-58.
47. Lammert F, Marschall HU, Glantz A, Matern S. Intrahepatic cholestasis of pregnancy : molecular pathogenesis diagnosis and management. *Journal of Hepatology* 2000;33:1012-21.
48. Strautnieks S, Lopes A, Underhill J, Gerred S, Nibbering K, Knisely A, et al. Critical residues in the multidrug resistance 3 protein gene associated with adult onset of cholangiopathy and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Hepatology* 2002;36:415A.
49. Oude Elferink R, Ottenhof R, Van Wijlnd M, Frijters C, Van Nieuwkrk C, Groen A. Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol secretion in mice with reduced expression of *mdr1* P-glycoprotein. *J Lipid Res* 1996;37:1065-75.
50. Lammert F, Wang DQH, Hillebrandt S, Geier A, Fickert P, Trauner M, et al. Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in *mdr2* knockout mice : a model for human low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology* 2003, sous presse.
51. Girodon E, Sternberg D, Chazouilleres O, Cazeneuve C, Huot D, Calmus Y. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene defects in patients with sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2002;37:192-7.
52. Igel M, Giesa U, Lutjohann D, Von Bergmann K. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J Lipid Res* 2003;44:533-8.
53. Wittenburg H, Carey MC. Biliary cholesterol secretion by the twinned sterol half-transporters ABCG5 and ABCG8. *J Clin Invest* 2002;110: 605-9.
54. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, et al. Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16237-42.
55. Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002;110:671-80.
56. Weggemans RM, Zock PL, Tai ES, Ordovas JM, Molhuizen HO, Katan MB. ATP binding cassette G5 C1950G polymorphism may affect blood cholesterol concentrations in humans. *Clin Genet* 2002;62:226-9.
57. Kamisaki T, Ogawa H. Effect of obstructive jaundice on the regulation of hepatic cholesterol metabolism in the rat. Disappearance of *abcg5* and *abcg8* mRNA after bile duct ligation. *Hepatology* 2003;25:99-104.
58. Peet DJ, Turley S, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998;93:693-704.
59. Groen AK, Bloks VW, Bandsma RH, Ottenhoff R, Chimini G, Kuipers F. Hepatobiliary cholesterol transport is not impaired in *abca1*-null mice lacking HDL. *J Clin Invest* 2001;108:843-50.
60. Hashimoto K, Uchiumi T, Konno T, Ebihara T, Nakamura T, Wada M, et al. Trafficking and functional defects by mutations of the ATP-Binding domains in MRP2 in patients with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 2002;36:1236-45.
61. Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, Borg FT, Scheper RJ, et al. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 1997;25:1539-42.
62. Tsujii H, Konig J, Rost D, Stockel B, Leuschner U, Keppler D. Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* 1999;117:653-60.
63. Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, Boute O, Hadchouel M. Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet* 1999;353:210-1.
64. Gendrot C, Bacq Y, Brechot MC, Lansac J, Andres C. A second heterozygous MDR3 nonsense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Med Genet*, 2003;40:1-3.
65. Dixon P, Weerasekera N, Linton K, Donaldson O, Chambers J, Egginton E, et al. Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet* 2000;9:1209-17.
66. Lucena JF, Herrero JI, Quiroga J, Sangro B, Garcia-Foncillas J, Zabelegui N, et al. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2003;24:1037-42.
67. Savander M, Ropponen A, Avela K, Weerasekera N, Cormand B, Hirvioja ML, et al. Genetic evidence of heterogeneity in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gut* 2003;52:1025-29.
68. Bohan A, Boyer JL. Mechanisms of hepatic transport of drugs : implications for cholestatic drug reactions. *Semin Liver Dis* 2002;22: 123-36.

69. Lee J, Boyer JL. Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders. *Semin Liver Dis* 2000;20:373-84.
70. Lee J, Azzaroli F, Wang L, Soroka CJ, Gigliozzi A, Setchell KD. Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 2001;121:1473-84.
71. Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsichler A, Stumptner C, Kenner L. Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* 2001;33:633-46.
72. Poupon R, Chretien Y, Poupon RE, Ballet F, Calmus Y, Darnis F. Is ursodeoxycholic acid an effective treatment for primary biliary cirrhosis? *Lancet* 1987;853:834-6.
73. Poupon RE, Balkau B, Eschwege E, Poupon R. A multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC study Group. *N Engl J Med* 1991;324:1548-54.
74. Poupon RE, Poupon R, Balkau B. Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis. The UDCA-PBC Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:1342-7.
75. Poupon RE, Lindor KD, Cauch-Dudek K, Dickson ER, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:884-90.
76. Poupon R, Poupon RE. Ursodeoxycholic acid therapy of chronic cholestatic conditions in adults and children. *Pharmacol Ther* 1995;66:1-15.
77. Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease : mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 2002;36:525-31.
78. Rodrigues CM, Fan G, Wong PY, Kren BT, Steer CJ. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* 1999;4:165-78.
79. Rodrigues CM, Fan G, Ma X, Kren BT, Steer CJ. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest* 1998;101:2790-9.
80. Kurz AK, Graf D, Schmitt, Vom Dahl S, Haussinger D. Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38 (MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology* 2001;121:407-19.
81. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* 2001;33:1206-16.