

## Effet de la cholestase maternelle et du traitement par l'acide ursodeoxycholique sur l'expression de gènes impliqués dans la sécrétion biliaire du foie de rat nouveau-né

M.A. Serrano, R.I.R. Macias, S. Jimenez, O. Briz, M.J. Monte, J.J.G. Marin

Départements de Biochimie et Biologie Moléculaire et Physiologie et Pharmacologie. Laboratoire de Hépatologie Experimental (HEVEFARM), Université de Salamanca, Salamanca, Espagne.

La cholestase intrahépatique gestationnelle (CIG) est une maladie qui survient durant le second ou le troisième trimestre de la grossesse et qui se caractérise par une altération profonde de la balance materno-fœtale des acides biliaires. Suivie par une hypercholinémie marquée, accompagnée de prurit telle que l'élévation de multiples paramètres biochimiques, fondamentalement ceux associés à la fonction hépatique. La cholestase maternelle, s'accompagne généralement de divers troubles materno-fœtaux.

L'usage de l'acide ursodeoxycholique (UDCA) pour le traitement de diverses altérations hépatiques qui résultent de la cholestase est un fait prouvé. Les résultats cliniques obtenus jusqu'à présent montrent que l'administration de cet acide biliaire, lorsqu'il est administré à des patientes atteintes de CIG, atténue le prurit et améliore la fonction hépatique chez la mère, toutefois, il n'existe pas d'études approfondies de l'effet que peut avoir cet acide biliaire sur les nouveaux-nés. Une hypothèse peut être posée suggérant que l'hypercholinémie qui apparaît dans les situations de cholestase gestationnelle aboutissant à l'accumulation des acides biliaires dans le compartiment fœtal peut détériorer le développement hépatique normal étant donnée la grande fragilité des tissus fœtaux en croissance et la faible capacité de leurs systèmes de détoxification et d'excrétion. D'autre part, l'UDCA pourrait avoir un effet bénéfique sur le placenta et d'une forme directe ou indirecte sur le développement du foie fœtal.

Pour mener à bien l'étude chez des rates sur l'effet de l'hypercholinémie maternelle sur le développement de la fonctionnalité hépatique durant la phase néonatale et infantile des rats, nous avons utilisé un modèle expérimental de cholestase obstructive complète par ligature du conduit biliaire commun des rates enceintes au début de la troisième et dernière semaine de gestation, caractérisé antérieurement par notre groupe (Monte *et al.* Reversible impairment of neonatal hepatobiliary function by maternal cholestasis. *Hepatology* 23:1208-1217, 1996). Ce modèle expérimental a été choisi du fait que cette troisième semaine de gestation pourrait être

comparable au dernier trimestre de la gestation chez la femme, période pendant laquelle la prévalence de la CIG est plus élevée.

L'administration de l'UDCA aux mères cholestatiques (60 µg/100 g p.c./j) commençait au jour suivant l'opération chirurgicale jusqu'au jour de l'accouchement et durant la lactation. Les groupes objet de cette étude étaient:

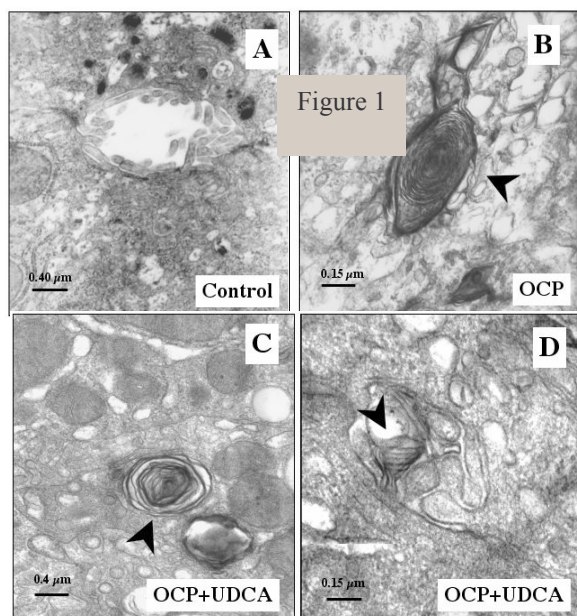
Groupe contrôle (C)

Groupe cholestase maternelle (OCP)

Groupe cholestase maternelle en traitement avec l'UDCA (OCP+UDCA)

Des études préalables réalisées par notre groupe (Monte *et al.* Reversible impairment of neonatal hepatobiliary function by maternal cholestasis. *Hepatology* 23:1208-1217, 1996) ont mis en évidence que les altérations causées par la cholestase chez les rates gestantes s'observaient aussi chez la descendance; concrètement dans l'immaturité hépatique qui est démontrée par une plus faible capacité de sécrétion des acides biliaires et des lipides biliaires concomitante à une hypercholinémie marquée. Ces altérations fonctionnelles ont été associées avec un ralentissement de la maturation des mécanismes impliqués dans la transcytose de l'hépatocyte en plus de la présence des corps multilamellaires dans le canalicule biliaire de l'hépatocyte qui agiraient comme "bouchons" altérant le flux biliaire normal. Pour évaluer si l'administration de l'UDCA à des mères pourrait avoir un effet bénéfique sur le développement de l'appareil sécréteur de la bile chez les fils, nous avons étudié la morphologie hépatobiliaire des rates jeunes filles de mères cholestatiques par les techniques de microscopie électroniques (Figure 1). Chez les animaux âgés de 4 semaines fils de mères cholestatiques, la microscopie a confirmé la présence de corps multilamellaires dans les hépatocytes (Figure 1B et 1C). Ces structures se rencontrent aussi bien au niveau intracellulaire (Figure 1C) qu'au niveau des canalicules (Figure 1B). La figure 1D représente la morphologie du canicule biliaire d'une hépatocyte des rates jeunes âgées de 28 jours qui sont nés de mères traitées avec l'UDCA. La présence et

l'abondance de ces corps multilamellaires s'est réduite par le traitement avec l'UDCA chez les mères du groupe OCP+UDCA, et se rencontrent approximativement à raison de un pour chaque trois hépatocytes et quand ils se trouvaient à l'intérieur de la canicule, ils occupaient moins de la moitié de la lumière canaliculaire (Figure 1D).



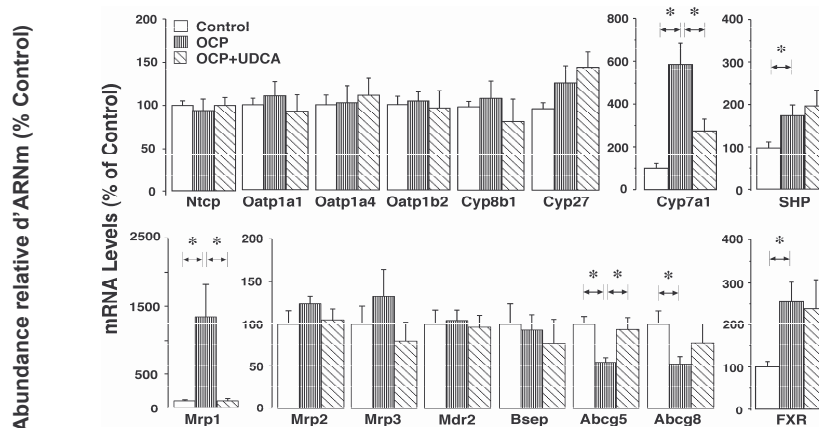
Pour vérifier si la réduction des corps lipidiques multilamellaires dans le groupe OCP+UDCA est associée avec une amélioration de la fonctionnalité hépatique des jeunes rates, il a été décidé d'évaluer la fonctionnalité hépatique des jeunes rates en analysant la sécrétion biliaire en situation basal et après être stimulée par l'administration de l'acide taurocholique (TCA). L'objet d'administrer une charge exogène de TCA est d'étudier la capacité hépatique de faire face à une grande quantité d'acide biliaire en simulant ce qui arrive durant les périodes postprandiales. La sécrétion des acides biliaires stimulée était significativement inférieure chez les jeunes rates du

groupe OCP et étant complètement récupérée dans le groupe OCP+UDCA. De même, nous avons observé une hypersécrétion biliaire des phospholipides qui n'était pas été prévue avec le traitement des mères du groupe UDCA. La fluidité de la membrane canaliculaire des hépatocytes de jeunes rates du groupe OCP était significativement inférieure à celle du groupe contrôle.

Les altérations observées dans la cholinémie et les changements dans la capacité sécrétrice de l'hépatocyte pourraient être dus à des changements dans l'expression des transporteurs des acides biliaires et des lipides biliaires hépatocytaires. Pour répondre à cette question, une étude par la PCR quantitative à temps réel a été réalisée pour mesurer l'abondance des ARNm des transporteurs des anions organiques et des lipides biliaires de l'hépatocyte.

Des résultats obtenus, il convient de souligner que la cholestase maternelle n'a pas affecté l'expression des gènes *Ntcp*, *Oatp1*, *Oatp2* et *Oatp4* qui codent pour les transporteurs des acides biliaires dans la membrane sinusoidale de l'hépatocyte et le traitement des mères avec l'UDCA ne modifie pas non plus de manière significative les niveaux d'expression de ces gènes dans leur descendance. Toutefois en étudiant les pompes exportatrices situées dans la membrane basolatérale appartenant à la famille des Mrps (Multidrug Resistance Associated Proteins), nous avons observé des changements qui méritent d'être soulignés. Une augmentation marquée et statistiquement significative apparaît dans l'expression du gène qui code pour la *Mrp1*, car le niveau d'expression de ce transporteur dans le groupe des rates OCP était 10 fois supérieur à ceux déterminés dans le groupe contrôle et dans le groupe OCP+UDCA. Cette augmentation tellement notable dans l'expression de *Mrp1* chez les rates filles des mères cholestatiques peut être interprété comme un mécanisme de défense pour éliminer l'excès des acides biliaires vers le sang portal depuis l'intérieur de l'hépatocyte (Figure 2).

Figure 2



Cette étude continue par la détermination de l'abondance des ARNm des gènes des protéines impliquées dans le transport des lipides, en observant des changements dans l'abondance relative des gènes de transport de cholestérol *Abcg5* et *Abcg8* qui ont diminués significativement dans le cas des rates jeunes du groupe OCP (Figure 2). Cette diminution est complètement révertie pour *Abcg5* et partiellement pour *Abcg8* par l'administration de UDCA aux mères du groupe des jeunes rates OCP+UDCA (Figure 2). Ainsi, il est important de souligner que l'expression de *Mdr2* reste inaltérée chez tous les individus étudiés (Figure 2).

Bien qu'il soit probable qu'il existe une relation entre tous les changements mentionnés et la formation des corps multilamellaires, comme dans le cas de la réduction de ceux-ci qui s'est produite dans le groupe des jeunes animaux OCP+UDCA, il n'est pas possible d'établir, à partir de ces résultats, si ceci peut être causé ou être la conséquence des altérations observées.

En continuant dans le but de déterminer l'origine des altérations de la fonctionnalité hépatique des rates jeunes, en plus des changements obtenus jusqu'à présent dans l'expression des gènes de certaines protéines impliquées dans le transport des acides biliaires et des lipides, l'étude se complète en déterminant les niveaux d'expression des gènes des principales enzymes responsables de la synthèse des acides biliaires et des principaux récepteurs nucléaires impliqués dans la régulation de ces enzymes, dans l'objectif de déterminer si les changements observés dans les transporteurs de acides biliaires pourraient s'accompagner des modifications dans l'expression de ces gènes, c'est-à-dire, dans les processus de synthèse de acides biliaires et leur régulation.

Les résultats obtenus présentés dans la figure 2, des changements ont été détectés dans le niveau d'expression du gène *Cyp7a1* (qui code pour l'enzyme  $7\alpha$ -hydroxylase), passage limitant de la voie neutre de la synthèse des acides biliaires, qui était importante dans le cas des jeunes rates appartenant au groupe OCP, car la valeur déterminée a été cinq fois supérieure à celle décrite dans le cas des jeunes rates témoins et deux fois supérieure à celle des jeunes du groupe OCP+UDCA (Figure 2).

De même, ont été déterminés les niveaux des ARNm des principaux récepteurs nucléaires sensibles au

contrôle des acides biliaires tels que le *FXR* et *SHP* (Figure 2). Dans le cas du récepteur nucléaire *FXR*, une plus grande expression apparaît chez les rates du groupe OCP par rapport à celles du groupe contrôle (Figure 2). Cette augmentation était du même ordre d'ampleur pour le cas du groupe des jeunes nés des mères traitées avec l'UDCA (OCP+UDCA) (Figure 2). Un modèle similaire a été observé dans le cas du gène du récepteur nucléaire *SHP* dans lequel a été observé une augmentation statistiquement significatif de l'abondance de son ARNm dans le groupe des rates OCP par rapport au contrôle, en étant du même ordre, bien que légèrement supérieure à la valeur déterminée dans le cas des rats du groupe OCP+UDCA (Figure 2).

Le récepteur *FXR* est un facteur de transcription qui est exprimé dans le foie et qui est activé par l'union des acides biliaires, de manière que ces molécules régulent leur propre synthèse par un processus d'inhibition de type "feed-back" négatif. Le récepteur *FXR* activé promeut l'expression du *SHP* qui se charge d'inhiber l'expression de l'enzyme *Cyp7a1*. Toutefois les résultats précédemment mentionnés de notre étude indiquent que l'expression de l'enzyme *Cyp7a1* (Figure 2) n'apparaît pas moins exprimée chez les jeunes rates du groupe OCP mais au contraire, les niveaux d'expression de la *Cyp7a1* s'étaient accrus dans ce groupe. La majorité des effets du *FXR* sont médiés par le contrôle de l'expression du *SHP*. Comme on pouvait espérer, lorsque les niveaux des acides biliaires et du *FXR* étaient élevés les niveaux du *SHP* augmentaient (Figure 2). Ces résultats impliquent que dans le foie des jeunes animaux appartenant aux groupes expérimentaux de la présente étude, les différences avec le mécanisme de régulation dans lequel *FXR* est impliqué dans le foie de rate adulte saine sont probablement dues aux variations dans la sensibilités des éléments de réponse du *SHP*.

L'ensemble de ces résultats nous permettent de conclure que la cholestase maternelle affecte l'expression des gènes impliqués dans la fonction hépato-biliaire de la rate durant la période néonatale. Le traitement avec l'UDCA à celles prévient la grande partie des altérations observées durant cette étape en dépit de ne pas être capable de le faire dans la même mesure durant les périodes antérieures au développement néonatal.