



HAL
open science

Altération de la dynamique des canalicules biliaires in vitro : une nouvelle approche de la prédiction de la cholestase intrahépatique d'origine médicamenteuse

Matthew Burbank

► To cite this version:

Matthew Burbank. Altération de la dynamique des canalicules biliaires in vitro : une nouvelle approche de la prédiction de la cholestase intrahépatique d'origine médicamenteuse. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2016. Français. NNT : 2016REN1B024 . tel-01530541

HAL Id: tel-01530541

<https://theses.hal.science/tel-01530541>

Submitted on 31 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie et Sciences de la Santé

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

Matthew BURBANK

Préparée à l'unité de recherche INSERM UMR 991
« Foie, Métabolismes et Cancer »
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

**Altération de la
dynamique des
canalicules biliaires
in vitro: une nouvelle
approche de la
prédiction de la
cholestase
intra hépatique
d'origine
médicamenteuse.**

**Thèse soutenue à Rennes
le 6 décembre 2016**

devant le jury composé de :

Pr Marc Pallardy

Professeur des universités INSERM UMR 996
Université Paris Sud / *rapporteur*

Dr Thierry Tordjmann

Directeur de recherche INSERM UMR S 1174
Université Paris Sud / *rapporteur*

Dr Christiane Guguen-Guillouzo

Directeur de recherche Emérite INSERM U991
Université Rennes 1 / *examineur*

Dr Gilles Labbe

Directeur Toxicologie investigative en sécurité préclinique
Sanofi / *examineur*

Pr Lydie Sparfel

Professeur des universités IRSET – UMR Inserm 1085
Université Rennes1 / *examineur*

Dr Richard Weaver

Directeur Scientifique – Recherche et Biopharmacie
Servier / *co-directeur de thèse*

Pr André Guillouzo

Professeur des universités Emérite INSERM U991
Université Rennes1 / *co-directeur de thèse*

Remerciements

Une thèse, c'est comme un film au cinéma, on hésite à aller le voir, et après en avoir discuté avec les amis, on est de plus en plus sûr d'y aller. Lorsque l'on y est, on rit, on pleure, on s'amuse, on réfléchit, bref, c'est un véritable ascenseur émotionnel...

Je voudrais tout d'abord remercier bien évidemment mes deux réalisateurs : Pr André Guillouzo et Dr Richard Weaver.

André, vous avez mené à la perfection votre rôle de réalisateur. Depuis le début à mon écoute, vous m'avez inculqué votre savoir-faire, tout en me laissant une liberté et une confiance absolues. Travailler à vos côtés, c'est apprendre chaque jour un petit peu plus, et c'est surtout se passionner davantage pour ce métier.

Richard, it was really great to work with you. I appreciate your confidence in my ambitious goals, and your efforts to provide me with all the required facilities. Thank you for all your positives remarks about the work. It is always really encouraging. Thanks to you, my work was adapted to the pharmaceutical industry. What would fundamental research be without the involvement of the pharmaceutical industry? Having a foothold in both public and private industries gives my career strength.

Je voudrais également remercier le Dr Christiane Guguen-Guillouzo, notre scénariste. Grâce à vous, ce film a pris des tournures différentes, avec des intrigues différentes et souvent de nouveaux dénouements. Il a toujours été agréable d'écouter vos conseils de scénariste aussi bien au niveau de mon jeu d'acteur qu'au niveau des modifications du script. Un grand merci pour tous vos conseils et promis, je n'oublierai jamais de « borner » mes valeurs.

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à l'ensemble des membres du jury : Pr Marc Pallardy, Dr Thierry Tordjmann, Dr Christiane Guguen-Guillouzo, Dr Gilles Labbe, Pr Lydie Sparfel. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de juger ce film et j'espère que vous apprécierez son histoire en lui décernant, peut être une palme ce soir ?

Je voudrais exprimer toute ma gratitude envers mes producteurs : L'INSERM U991 et Biologie Servier. Merci de m'avoir permis de jouer dans ce film et dans les meilleures conditions possibles

Au sein de L'INSERM U991, merci à mes deux directeurs de production, Bernard et Marianne, merci d'avoir guidé ce film et de m'avoir soutenu tout au long de cette aventure.

Merci à mes deux collègues Doudou et Simon, des acteurs géniaux qui m'ont permis de m'émanciper dans nos studios comme dans la région bretonne (hostile). Sans vous la thèse n'aurait pas été aussi « stylée ». Merci à ma Camcam, tu es une actrice grandiose et ta carrière ne fait que commencer, merci de m'avoir appris beaucoup de choses à mon arrivée

dans le studio, et merci de m'accompagner depuis le début de ma vie bretonne. Merci à mon coach Ahmad d'avoir été d'une aide si précieuse dans ce projet.

Enfin merci à tous mes collègues et acteurs, Nico, Tatiana, Anaïs, Thomasx2, Sacha, Florence, Aude, Sophie, Karima, Pegah, Houssein, Audrey, Eva sans oublier Patoche sans qui le projet cinématographique n'aurait pas eu de secrétaire. C'est grâce à vous également que l'histoire s'est écrite.

Merci à mes collègues de Biologie Servier, Hélène et Hervé de m'avoir accueilli dans vos studios et d'avoir aidé à la réalisation de ce film. Merci à Nancy Claude, chargée de production d'avoir appuyé ma candidature en tant que premier rôle dans ce film.

Merci à Rémy Le Guevel, notre cadreur, de nous avoir fait profiter de la plateforme Impacell afin de réaliser tous nos effets spéciaux.

Merci à mes amis d'enfance d'avoir toujours été à mes côtés (mais vous pouvez également me remercier de vous avoir invités à toutes les soirées post production en Bretagne que vous connaissez maintenant si bien)

Je voudrais enfin exprimer ma profonde gratitude à ma famille : les frangins, Max et Jer, d'avoir suivi de près comme de loin toute ma carrière d'acteur depuis le début. J'espère que vous aimerez ce film et surtout le comprendrez !

Enfin un énorme merci à Moon et Dad d'avoir toujours été mes premiers fans ! De mes premiers pas dans le cinéma, il y a bien longtemps, jusqu'à aujourd'hui qui marque le début de ma carrière internationale, c'est aussi grâce à votre amour et votre soutien que je ressors plus fort de chaque expérience.

Ax, ma femme, que serait ce film si tu ne m'avais pas aidé à l'écrire depuis notre rencontre à la fac. Tu es en même temps ma productrice, ma réalisatrice et mon actrice préférée. Notre autre Big production, avec un script béton, une histoire magique, ne fait que commencer et comme on aime les challenges, le dépassement de soi et les rebondissements...on a toutes nos chances pour le prochain Oscar !

Abstract

Intrahepatic cholestasis represents a frequent manifestation of drug-induced liver injuries; however, the mechanisms involved in such injuries are poorly understood. We aimed to investigate mechanisms underlying drug-induced cholestasis and improve its early detection using human HepaRG cells. First, we proved that bile canaliculi (BC) underwent spontaneous contractions, which are essential for bile acid efflux and required alternations in myosin light chain (MLC2) phosphorylation/dephosphorylation. A short exposure to cholestatic compounds revealed that BC dynamics was altered and associated with impairment of the ROCK/MLCK pathway. Then, in order to confirm our study, 12 cholestatic drugs and six noncholestatic drugs were analyzed and we demonstrated that all cholestatic drugs classified on the basis of reported clinical findings caused disturbances of both BC dynamics (dilatation or constriction), and alteration of the ROCK/MLCK signaling pathway, whereas noncholestatic compounds had no effect. We also proved that these changes were more specific than efflux inhibition measurements alone as predictive nonclinical markers of drug-induced cholestasis. To confirm and extend these conclusions, we analyzed the mechanisms involved in cytotoxic and cholestatic effects induced by the 4 main drugs from the endothelin receptor antagonists family: two related to clinical cases of hepatotoxicity (sitaxentan) and/or cholestasis (bosentan), and two that have not been reported to cause elevation of liver transaminases or bilirubin (ambrisentan and macitentan). The results showed that like bosentan, the structurally similar recently marketed drug, macitentan, could cause *in vitro* major BC alterations. By contrast, ambrisentan appeared as a safe drug and sitaxentan that has been withdrawn from the market for hepatotoxic cases, did not impair BC dynamics.

Résumé

La cholestase intrahépatique est une manifestation fréquente des lésions hépatiques induites par les médicaments; Cependant, les mécanismes impliqués sont peu connus. Nous avons cherché à étudier les mécanismes de la cholestase induite par les médicaments afin d'améliorer sa détection précoce en utilisant les cellules HepaRG humaines. Tout d'abord, nous avons prouvé que les canalicules biliaires (BC) subissaient des contractions spontanées, essentielles pour l'efflux d'acides biliaires et nécessitaient des séries d'alternance dans la phosphorylation/déphosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC2). La courte exposition à des composés cholestatiques a révélé que la modulation des BC était associée à des perturbations de la voie de signalisation ROCK/MLCK. Afin de confirmer notre étude, 12 médicaments cholestatiques et six non cholestatiques ont été analysés et nous avons démontré que tous les médicaments cholestatiques classés sur la base de résultats cliniques provoquaient des perturbations dans la dynamique des BC (dilatation ou constriction), et altéraient la voie de signalisation ROCK/MLCK, tandis que les composés non cholestatiques n'avaient pas d'effet. Nous avons également prouvé que ces changements étaient plus spécifiques que la mesure de l'inhibition de l'efflux comme marqueurs prédictifs non cliniques de la cholestase induite par les médicaments. Afin de confirmer et d'étendre ces conclusions, nous avons analysé les mécanismes impliqués dans les effets cytotoxiques et cholestatiques induits par 4 médicaments de la famille des antagonistes des récepteurs de l'endothéline: deux ayant un lien avec des cas cliniques d'hépatotoxicité (sitaxentan) et/ou cholestase (bosentan), et deux n'ayant pas été impliqués dans l'élévation de transaminases hépatiques ou de bilirubine (ambrisentan et macitentan). Les résultats montrent que le macitentan récemment commercialisé et ayant une structure chimique similaire à celle du bosentan, était capable de causer, comme ce dernier, des altérations *in vitro* des BC. En revanche, l'ambrisentan n'était pas hépatotoxique et le sitaxentan qui a été retiré du marché pour des cas d'hépatotoxicité, n'affectait pas la dynamique canaliculaire.

Table des matières

Index des figures	1
Index des tableaux	2
Liste des abréviations	3
INTRODUCTION GENERALE	5
I. Stratégie de développement des médicaments	7
a. Données générales	7
b. L'importance de la toxicologie dans le développement préclinique	8
II. Xénobiotiques, hépatotoxicité et DILI	11
a. Le risque hépatotoxique dans le développement du médicament	11
i. Les retraits pré-AMM	11
ii. Les retraits post AMM	13
b. Les différentes lésions hépatotoxiques d'origine médicamenteuse (DILI)	14
i. Introduction et ADME.....	14
ii. Mécanismes de l'hépatotoxicité.....	17
1. Classification.....	17
2. Mécanismes des DILI	18
a) Stress cellulaire direct.....	20
b) Dysfonctionnements mitochondriaux	21
c) Réactions immunes.....	22
d) Morts cellulaires : Apoptose, nécrose	23
iii. Principales lésions hépatiques toxiques	23
1. Hépatites aiguës (cytolytiques, cholestatiques ou mixtes)	23
a) Hépatite cytolytique	25
b) Hépatite cholestatique	25
c) Hépatite mixte	25
2. Maladies de surcharges (lipides, phospholipides).....	25
3. Autres pathologies	26
iv. Facteurs de risques de DILI	27
1. Les facteurs non génétiques.....	27
2. Les facteurs génétiques.....	28
III. Méthodes de détection des DILI	29
a. Le cadre réglementaire	29
b. Les études précliniques	30
c. Modèles <i>in vitro</i>	31
i. Foie isolé perfusé.....	32
ii. Tissus (coupes de foie).....	33
iii. Cellules isolées en culture	33
iv. Lignées cellulaires.....	34
1. Les cellules HepaRG.....	34
v. Fractions subcellulaires	36
vi. Cellules recombinées hépatiques	37
d. Modèles <i>in silico</i>	39
e. Essais cliniques	39
f. Le suivi post AMM et la toxicovigilance	40

IV. La cholestase	42
a. Définition	42
b. Acides biliaires	42
i. Introduction	42
ii. Synthèse des acides biliaires	44
iii. Cycle entéro-hépatique	47
iv. Transport des acides biliaires	48
1. Transporteurs sinusoïdaux	48
2. Transporteurs canaliculaires	49
c. Etiologie	52
i. Cholestase intra-hépatique	52
ii. La cholestase extrahépatique	52
d. Physiopathologie	52
i. Maladies cholestatiques héréditaires	53
ii. Cholestase acquise	54
1. Cholestase induite par l'inflammation	54
2. La cholestase intrahépatique de grossesse	55
3. La cholestase induite par les médicaments	56
a) Implication du stress oxydant	56
b) Cholestase médicamenteuse aggravée par l'inflammation	57
c) Altération de la dynamique des canalicules, du cytosquelette et de la polarité cellulaire	57
d) Altération des transporteurs hépatiques	59
a. BSEP	60
b. NTCP	60
c. OATP	60
d. MRP2	61
e. MRP3-4	62
e. Diagnostic	63
i. Clinique	63
ii. Biologique	63
f. Méthode de détection de la cholestase	64
i. Modulation des transporteurs (BSEP et autres)	64
3. Modèles acellulaires	65
4. Modèles cellulaires	65
ii. Etude des fonctions biliaires et de l'activité globale	65
iii. Autres méthodes de détection de la cholestase	66
V. Bosentan et autres ERAs	68
a. La famille des Antagonistes des récepteurs à l'endothéline (ERA)	68
i. Endothéline et récepteurs	68
ii. Propriétés pharmacologiques	70
b. Le Bosentan	72
i. Introduction	72
ii. Mécanisme d'action	73
iii. Données cliniques	73
1. Indications thérapeutiques	73
2. Posologie et mode d'administration	74
3. Contre-indication, mise en garde, précaution d'emploi et interactions médicamenteuses	74
4. Effets indésirables	75
iv. Propriétés pharmacologiques	76
1. Pharmacodynamie	76
2. Pharmacocinétique	76
3. Métabolisme	77

c.	Bosentan et hépatotoxicité	80
i.	Données cliniques d'hépatotoxicité	80
ii.	Cholestase	81
1.	Cholestase <i>in vivo</i>	82
2.	Cholestase <i>in vitro</i>	84
a)	Etudes sur les transporteurs	84
b)	Autre mécanisme de cholestase	85
3.	Idiosyncrasie	86
d.	Autres membres de la famille des ERAs	88
i.	Introduction	88
ii.	Comparaison des différents ERA	89
1.	Formule chimique	89
2.	Données pharmacologiques, pharmacodynamiques et pharmacocinétiques	90
3.	Effets indésirables et hépatotoxicité <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	92
	 CONTEXTE ET CADRE DU PROJET	 95
	 RESULTATS	 99
	 CHAPITRE 1	 101
	 CHAPITRE 2	 109
	 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	 165
	 RÉFÉRENCES	 173

Index des figures

Figure 1 : Développement des molécules pharmaceutiques	7
Figure 2 : Eviter les problèmes liés à la toxicologie	9
Figure 3 : Les différentes causes d'attrition entre 1991 et 2000.....	10
Figure 4 : Les différents systèmes organiques impliqués dans les échecs de développements de médicaments.....	12
Figure 5 : Principales causes de retraits sur le marché USA entre 1976 et 2005.....	13
Figure 6 : Principales causes de retraits sur le marché (UE, USA et Asie) entre 1998 et 2008.....	14
Figure 7: Les différentes fonctions hépatiques.....	15
Figure 8 : Métabolisation des xénobiotiques	17
Figure 9 : Mécanismes d'induction de la mort cellulaire induite par les composés hépatotoxiques	19
Figure 10 : Stress oxydant mitochondrial et formation de peroxy-nitrite pendant l'hépatotoxicité induite par le paracétamol	20
Figure 11 : Différents mécanismes altérant la mitochondrie.....	21
Figure 12 : Toxicité immunologique.....	22
Figure 13 : Les mécanismes de l'hépatotoxicité liée aux médicaments	26
Figure 14 : Développement des médicaments et évaluation ADME	31
Figure 15 : Modèles in vitro d'étude de l'hépatotoxicité	32
Figure 16 : Schéma de deux hépatocytes avec jonctions serrées	33
Figure 17 : Différenciation des Cellules HepaRG	35
Figure 18 : Culture et différenciation des cellules HepaRG.....	35
Figure 19 : Arbre décisionnel de fin d'étude préclinique	40
Figure 20 : Schéma d'un acide biliaire	43
Figure 21 : Composition de la bile	43
Figure 22 : Synthèse des acides biliaires	46
Figure 23 : Le cycle entéro-hépatique	47
Figure 24: Les différents transporteurs hépatocytaires	48
Figure 25 : Mécanisme de la cholestase induite par l'inflammation	55
Figure 26 : Modification du cytosquelette des hépatocytes en cas de cholestase	59
Figure 27 : Synthèse de l'endothéline.....	68
Figure 28 : Voie d'activation calcique du récepteur A à l'endothéline.....	69
Figure 29 : Voie d'activation de la NO par activation du récepteur ET _B	70
Figure 30 : Stratégie thérapeutiques de l'HTAP.....	71
Figure 31 : Chronologie du développement et de la mise sur le marché du bosentan.....	72
Figure 32 : Modèle de rat hypertendu	73
Figure 33 : Différents métabolites du bosentan.....	78
Figure 34: Représentation de l'élimination hépatobiliaire du bosentan et des acides biliaires	79

Index des tableaux

Tableau 1: Différents médicaments impliqués dans les hépatites	24
Tableau 2 : Modèles cellulaires d'étude de l'hépatotoxicité	38
Tableau 3: Synthèse des différents transporteurs hépatocytaires	51
Tableau 4 : Classification des lésions hépatiques.....	64
Tableau 5 : Modèles in vitro d'étude de la cholestase	67
Tableau 6 : Effets indésirables du bosentan	76
Tableau 7 : Elévation des transaminases après traitement par le bosentan	80
Tableau 8 : Fréquence des troubles hépato-biliaires après traitement par le bosentan.....	80
Tableau 9 : Etude des effets hépatiques indésirables du bosentan chez l'animal	82
Tableau 10 : Structures chimiques des différents ERA.....	89
Tableau 11 : Données pharmacologiques, pharmacodynamiques, pharmacocinétiques des différents ERAs.....	90
Tableau 12 : Effets indésirables et hépatotoxicité in vivo et in vitro des différents ERA	92

Liste des abréviations

AB : Acide biliaire
ABC : ATP-Binding Cassette
AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdien
ALAT : Alanine aminotransférase
ASAT : Aspartate aminotransférase
ATP : Adénosine tri-phosphate
BSEP : Bile salt export pump
CAR : Constitutive androstane receptor
C_{max} : Concentration plasmatique
CPZ : Chlorpromazine
CSA : Cyclosporine A
CYPs : Cytochromes P450
DILI : Drug-induced liver injury
ERA : Antagonistes des récepteurs à l'endothéline
ET : Endothéline
ET_{A/B} : Récepteur A, B à l'endothéline
FDA : Food and Drug Administration
FXR : Farnesoid X receptor
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire
IL-1 β /6/8 : Interleukine-1 β /6/8
LPS : Lipopolysaccharides
LSN : Limite supérieure de la normale
MDR : Multidrug resistance protein
MLCK : Myosin light-chain kinase
MRP : Multidrug resistance-associated protein
NTCP : Na⁺-Taurocholate cotransporting polypeptide
OATP : Organic anions transporting polypeptide
OCT1 : Organic cation transporter
PAL : Phosphatase alcaline
PFIC : Progressive familial intrahepatic cholestasis
P-gp : P-glycoprotéine
PXR : Pregnane X receptor
RCP : Résumé des caractéristiques du produit
ROCK : Rho-associated protein kinase
ROS : Reactive oxygen species
TCA/TA : Acide taurocholique
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
 γ GT : Gamma-glutamyl-transférase

Introduction Générale

I. Stratégie de développement des médicaments

a. Données générales

La découverte et le développement d'un médicament représentent un processus long (en moyenne, 10 ans de R&D sont nécessaires avant de pouvoir mettre sur le marché un médicament innovant), complexe (seulement 1/10 000 molécules testées en laboratoire deviendra un médicament), coûteux (pour une molécule à visée internationale, la recherche et le développement coûtent plus de 800 M\$) et enfin risqué (les laboratoires ne peuvent compter que sur un nombre limité de produits pour financer leur R&D future). Ce que l'on appelle « le candidat médicament » subit une série de tests précliniques puis cliniques obligatoires avant toute étape de test chez l'homme. Ces phases peuvent durer en moyenne une dizaine d'années et ont pour but tout d'abord de répondre à un besoin médical, et finalement d'obtenir une autorisation de mise sur le marché en vue de la commercialisation du médicament.

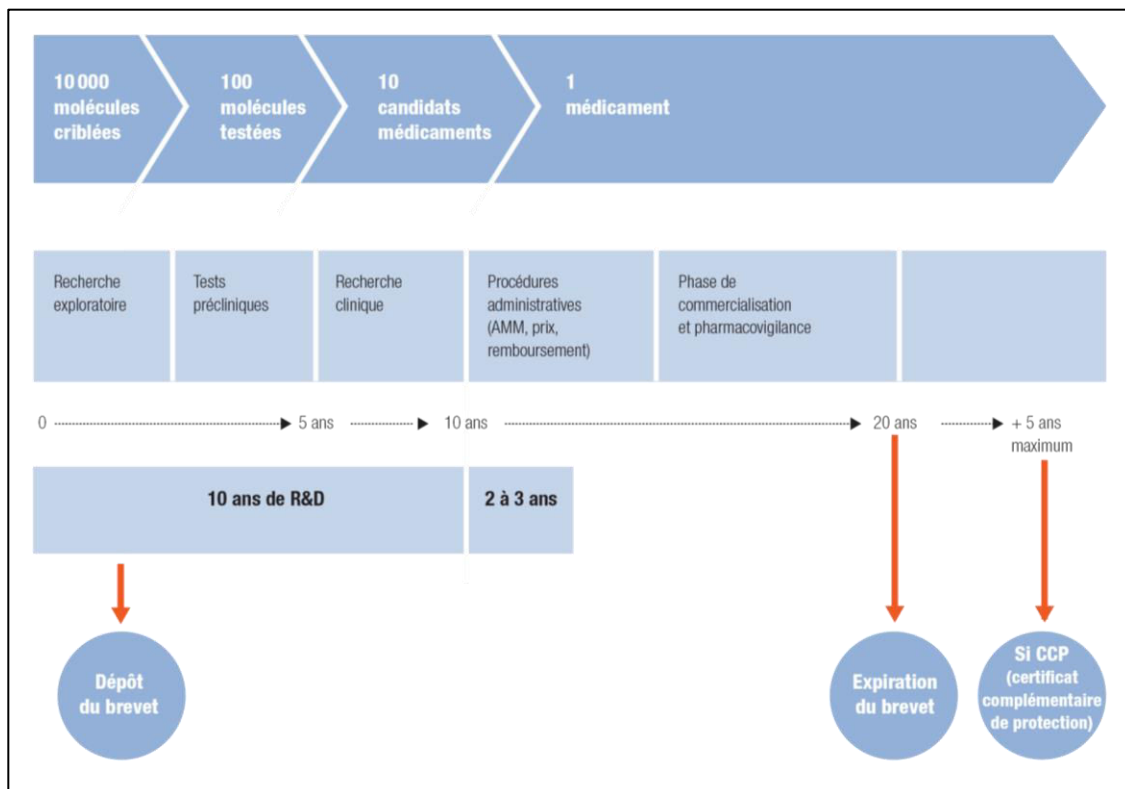


Figure 1 : Développement des molécules pharmaceutiques. Source : Leem

La phase de recherche arrive en amont du développement et a lieu dans les laboratoires de recherche publique (INSERM, CNRS) et privé. Il s'agit alors de trouver une molécule efficace sur différents modèles *in vitro*, *in vivo* ou encore *in silico*... La phase de développement permet par la suite de synthétiser la molécule avec une forme galénique appropriée tout en adaptant les doses et en tenant compte de la sécurité d'emploi. Ainsi, le développement pharmaceutique est depuis toujours une course contre la montre. Les nombreux paramètres économiques, la concurrence, ou encore la demande de nouveaux traitements médicaux, conduisent les firmes pharmaceutiques à être de plus en plus performantes et rapides dans le développement des nouvelles molécules. Un des défis les plus importants dans cette course est l'adéquation entre les phases précliniques et cliniques ; il est en effet nécessaire de déceler au plus tôt la moindre toxicité induite par un médicament afin de pouvoir anticiper tout effet chez l'Homme.

b. L'importance de la toxicologie dans le développement préclinique

La toxicologie préclinique permet lors des études de développement d'un médicament non seulement une évaluation des effets chez l'animal et de la relevance de ces effets pour l'Homme mais aussi une analyse d'un effet pharmacologique exagéré et l'observation d'un effet de classe et d'un mécanisme d'action. Le but des études de toxicité après administration unique ou répétée est de mimer la prise du produit chez l'homme. Il faut alors déterminer les organes cibles (cœur, foie,...), la DMT (dose maximale tolérable), la réversibilité des effets ou non, les doses sans effet ainsi que le facteur de sécurité permettant la transposition des effets à l'homme (Wagner, Zollner, and Trauner 2009). En règle générale, les études non-cliniques réglementaires qui doivent être réalisées avant le passage chez l'homme sont les suivantes :

- Toxicité par administration unique (2 espèces, voie clinique)
- Toxicité par administration répétée (durée d'étude dépendante de la durée d'administration du produit envisagée chez l'Homme, 2 espèces)
- Génotoxicité (2 tests *in vitro* minimum et un test *in vivo*)

- A discuter en fonction de l'emploi : Tolérance locale (en fonction de la voie d'administration), Pharmacologie de sécurité (cœur, système nerveux central, poumons).

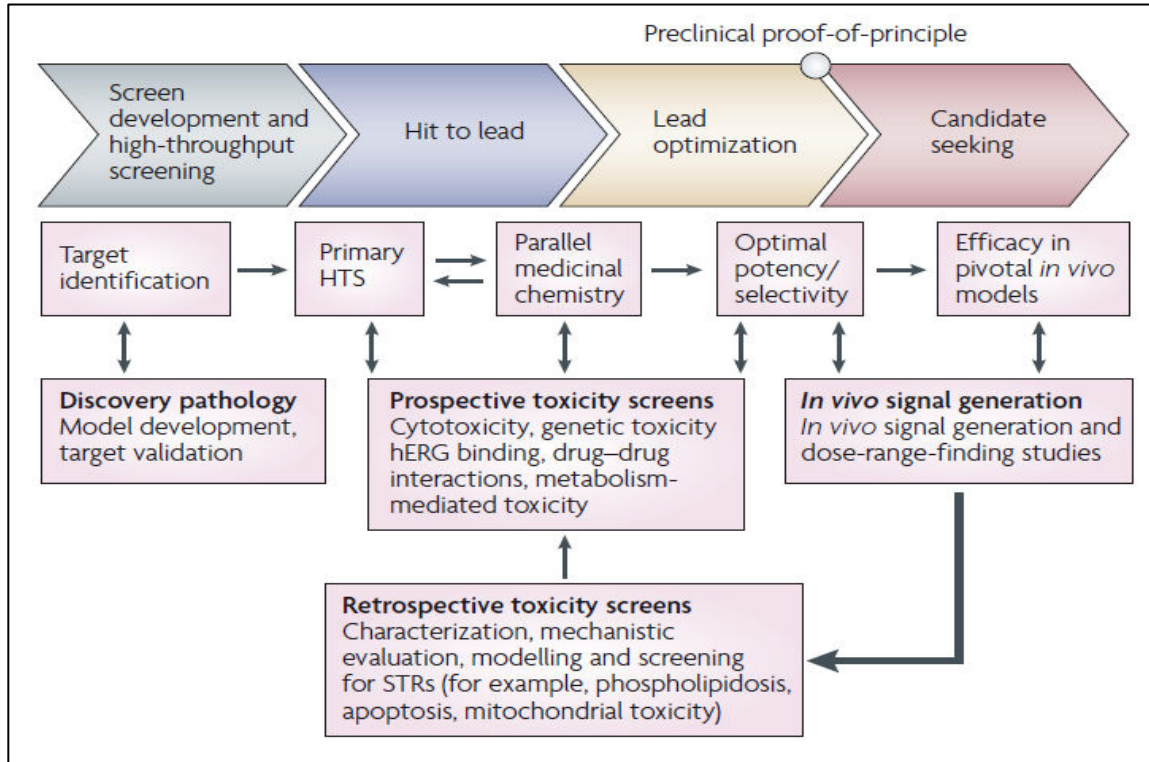


Figure 2 : Eviter les problèmes liés à la toxicologie. D'après (Kramer, Sagartz, and Morris 2007)

Alors qu'en 1991 la principale cause d'attrition dans la découverte des médicaments était la pharmacocinétique, en 2000, une meilleure connaissance des facteurs influençant les propriétés ADME ainsi que des batteries d'essais *in vitro* et *in vivo* plus sophistiquées ont considérablement réduit ce taux d'attrition. A l'inverse, le taux d'attrition pour des raisons de toxicité a augmenté entre 1991 et 2000 (Kola and Landis 2004).

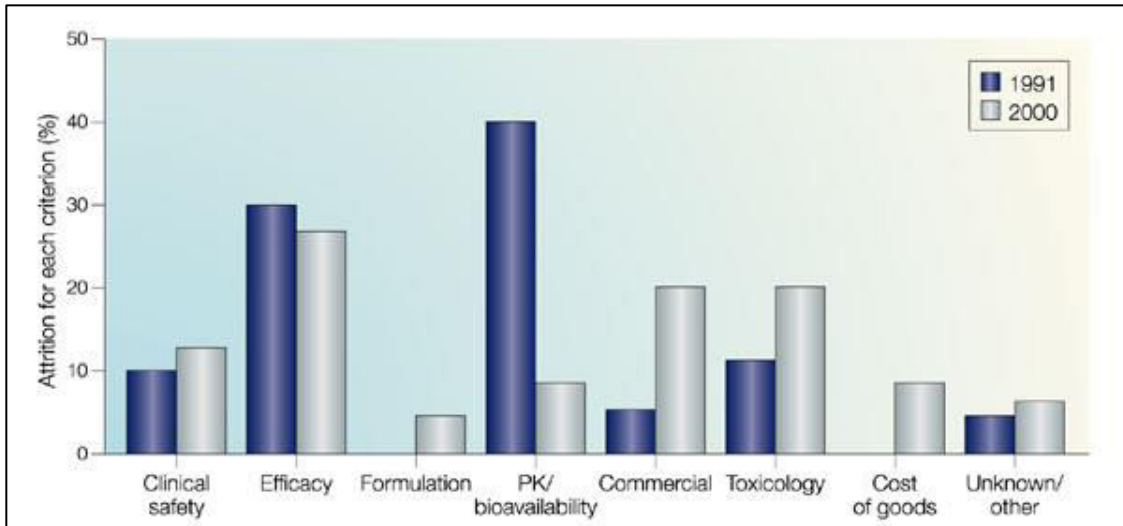


Figure 3 : Les différentes causes d'attrition entre 1991 et 2000 (Kola and Landis 2004)

II. Xénobiotiques, hépatotoxicité et DILI

a. Le risque hépatotoxique dans le développement du médicament

La toxicité hépatique des médicaments est un problème majeur de santé publique qui concerne aussi bien l'industrie pharmaceutique que les agences réglementaires. Aujourd'hui, plus de 1000 molécules disponibles sur le marché sont reconnues pour être potentiellement hépatotoxiques (Biour et al. 2000). Les lésions hépatiques d'origine médicamenteuse couvrent la quasi-totalité des pathologies hépatiques et les hépatites aiguës représentent la complication la plus fréquente pour le praticien et doivent impérativement être reconnues précocement afin d'éviter la survenue d'une forme fulminante ou la constitution de lésions chroniques (Larrey 1995). Il est admis, néanmoins, que les médicaments toxiques sont à l'origine d'environ 10 % des insuffisances hépatiques aiguës et de 5 % des ictères (Døssing and Sonne 1993; Davies 1997). De plus, les médicaments représentent 2 à 5% de cas d'hospitalisations pour cause de jaunisse (Björnsson et al. 2012). Une étude récente a ainsi recueilli sur trois ans, tous les cas symptomatiques déclarés de toxicité hépatique dans une région française. Elle a retrouvé une incidence de 14 cas par an pour 100 000 habitants, un ratio femme/homme de 0,9 avant 49 ans et 2,6 après 50 ans, un taux d'hospitalisation de 12 % et une létalité de 6 % (Sgro et al. 2002). Aux Etats-Unis, entre 2000 et 2300 cas d'insuffisance hépatique aiguë sont recensés chaque année et la cause médicamenteuse représente environ 50% d'entre eux (39% seraient dus à la toxicité du paracétamol, 13% à d'autres médicaments) (Ichai and Samuel 2008; McDowell Torres, Stevens, and Gurakar 2010). Par ailleurs, la première cause d'insuffisance hépatique nécessitant une transplantation est d'origine médicamenteuse (paracétamol) (Navarro and Senior 2006).

i. Les retraits pré-AMM

A partir d'une vaste étude de la littérature, il a été estimé qu'entre 38% et 51% des composés présentant des effets hépatiques chez l'homme ne présentent pas les mêmes effets dans les études animales, y compris les rongeurs et non-rongeurs (Greek 2014). Un

autre exemple montre que sur 28 des nouvelles entités chimiques développées par l'ancien laboratoire Rhône-Poulenc Rorer entre 1988 et 1994, 41% ont provoqué des perturbations hépatiques dans les études de toxicité animale (28% une hépatomégalie, 10% une nécrose hépatocellulaire, 3% une cholestase) (Ballet 1997). Une autre étude longitudinale sur les différents projets de candidats médicaments (petites molécules) des laboratoires AstraZeneca a été effectuée entre 2005 et 2010. Les projets précliniques et cliniques qui avaient été arrêtés en raison de problèmes de sécurité ont été analysés afin de comprendre les principales causes de l'échec. On retrouve dans la figure suivante les grands systèmes d'organes impliqués dans les arrêts précliniques (barres rouges) et cliniques (barres brunes claires). Les arrêts de développement dans les phases précliniques et cliniques ont été classés comme étant liés soit à l'action du médicament sur la cible biologique primaire (barres rouges) soit à d'autres propriétés du candidat médicament (barre brun clair). Les pourcentages sont indiqués dans les barres et le nombre total de projets indiqués sous chaque barre. Les arrêts pour cause d'hépatotoxicité représentent environ 14% en préclinique et 12% clinique (Cook et al. 2014).

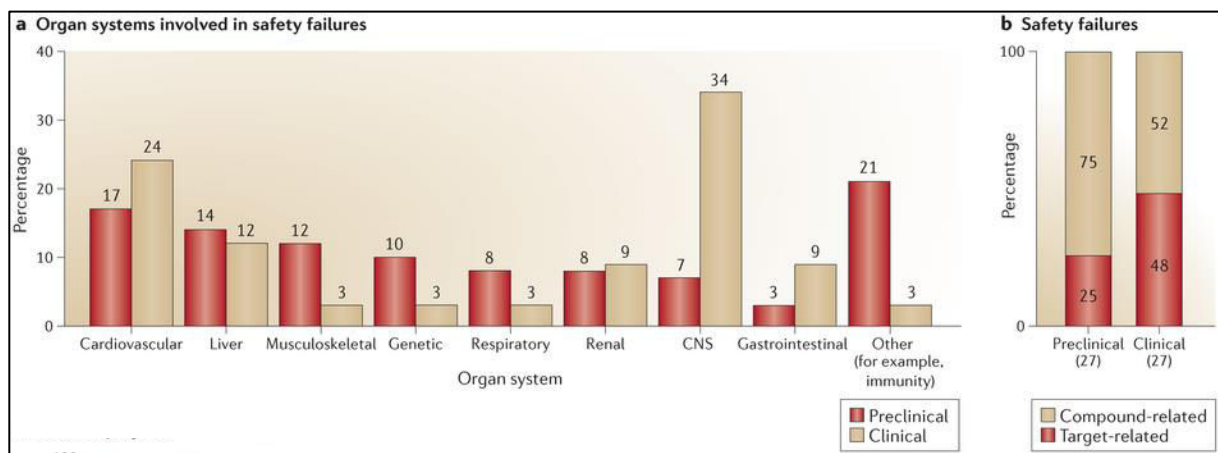


Figure 4 : Les différents systèmes organiques impliqués dans les échecs de développements de médicaments (Cook et al. 2014).

Enfin, dans l'industrie pharmaceutique, 50% des molécules qui arrivent en phase préclinique n'atteignent pas la phase clinique : 30% induisent des effets indésirables non décelés auparavant (Kramer, Sagartz, and Morris 2007).

ii. Les retraits post AMM

En dépit des nombreuses études précliniques et cliniques, la survenue de lésions hépatiques appelées DILI (Drug-Induced Liver Injury) a été la cause la plus fréquente des retraits de commercialisation des médicaments liés à la sécurité dans les 50 dernières années. Parmi les médicaments mis sur le marché entre 1975 et 2000, environ 10% ont été mis sous surveillance (« black box warning ») et 2,9% ont été retirés (Lasser KE et al. 2002)(Watkins and Seeff 2006). Parmi les retraits de la FDA (Food and Drug Administration), on peut citer : le bromfenac, un AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien) mis sur le marché en 1997. Bien qu'approuvé pour une période inférieure à 10 jours, les patients l'ont utilisé pendant une période plus longue. On a recensé 50 cas de lésions hépatiques sévères et le médicament a été retiré en 1998. Ensuite, la troglitazone, un agent antidiabétique a montré en trois ans, 90 cas d'hépatotoxicité (au moins 68 morts et 10 transplantations hépatiques), ce qui a conduit à son retrait en 2000 (Goldkind and Laine 2006). La pemoline (Cylert), utilisée pour les troubles de l'attention et la narcolepsie n'est plus disponible aux Etats-Unis. La FDA a conclu que le risque d'hépatotoxicité était supérieur à ses bénéfices. En mai 2005, les laboratoires Abbott ont décidé d'arrêter les ventes et le marketing de cette molécule. En octobre 2005, toutes les compagnies fabricantes de la version générique ont également été obligées de mettre fin à la commercialisation et au marketing (Safer, Zito, and Gardner 2001).

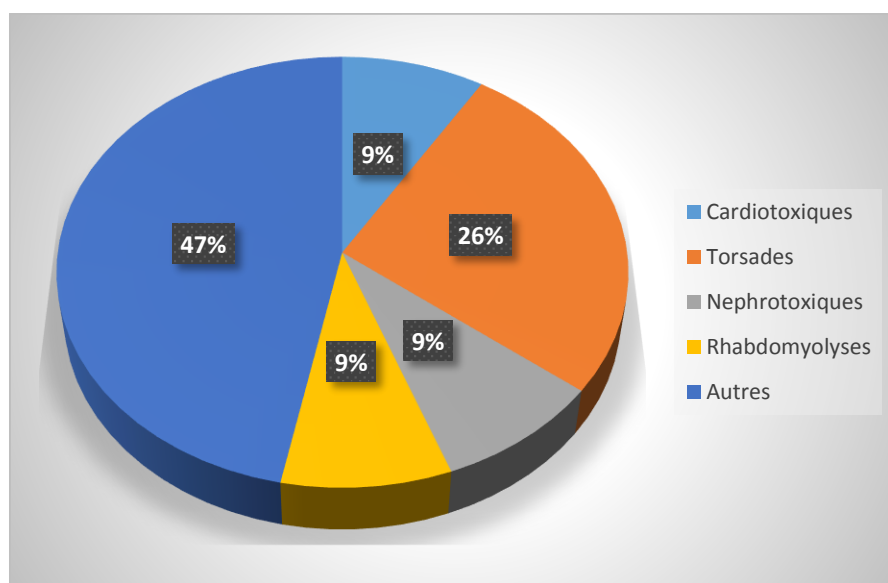


Figure 5 : Principales causes de retraits sur le marché USA entre 1976 et 2005 (autres = hépatique, musculaire, neurotoxique) (Wilke et al. 2007).

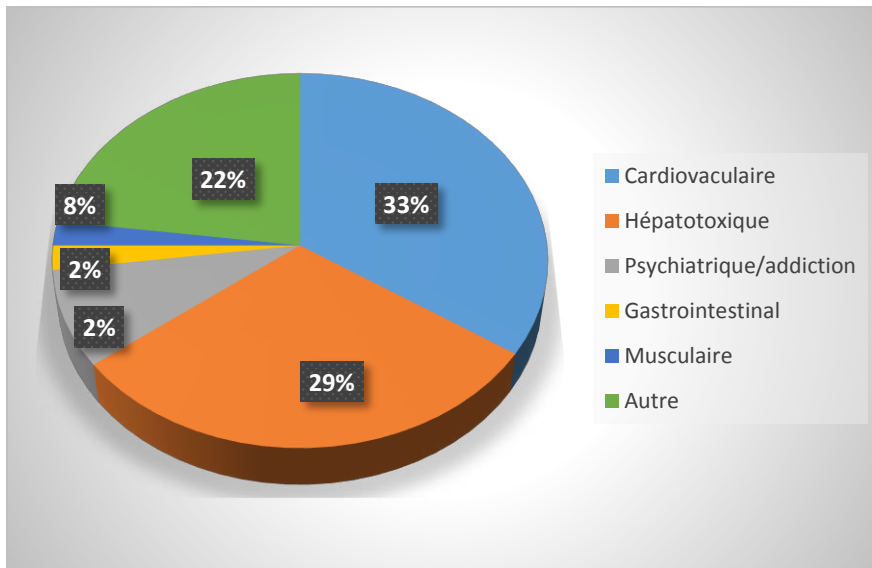


Figure 6 : Principales causes de retraits sur le marché (UE, USA et Asie) entre 1998 et 2008. (MacDonald and Robertson 2009)

b. Les différentes lésions hépatotoxiques d'origine médicamenteuse (DILI)

i. Introduction et ADME

Le foie est considéré comme l'organe cible des composés de par sa localisation dans le corps humain le situant en première place dans l'exposition aux xénobiotiques. Les agents les plus connus comme étant toxiques pour le foie sont l'alcool, les médicaments ou encore d'autres produits chimiques, mais cette toxicité peut aussi être due à des métaux (fer, cuivre,...) des toxines (AFB1, gyromitrine...), des virus (hépatites B, C,...) ou encore des parasites (échinococcose,...). La fonction principale du foie est, chez les êtres vivants ne s'alimentant pas de façon continue, de métaboliser sans cesse les nutriments ingérés de façon intermittente de manière à fournir à l'organisme un courant incessant de matériaux susceptibles d'être transformés en énergie. Les recherches physiologiques ont mis en évidence le métabolisme du tissu hépatique : fonction glycogénique, réglant la glycémie ; fonction de synthèse des protéines (sérum albumine, fibrinogène, complexe prothrombinique) ; fonction de synthèse et de dégradation des lipides et du cholestérol ; fonction de détoxification (métabolisme de l'urée) ; fonction d'uréogénèse (élimination sous

forme d'urée de l'azote ammoniacal produit par la dégradation des acides aminés) ; fonction de stockage (certaines vitamines, fer et glycogène) ; fonction biliaire enfin (formation des sels biliaires aux dépens du cholestérol sanguin, excrétion de bilirubine conjuguée, par transformation de la bilirubine produite à partir de l'hémoglobine dans le système réticulo-endothélial). Le métabolisme, surtout celui des glucides et des lipides, la digestion grâce aux sels biliaires, la circulation du sang, grâce à la fabrication par le foie des facteurs de la coagulation, l'immunité par l'intermédiaire des immunoglobulines, dépendent d'un fonctionnement hépatique correct.

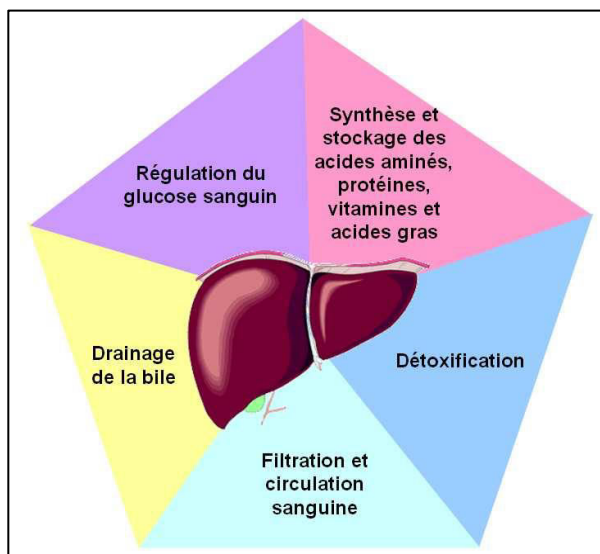


Figure 7: Les différentes fonctions hépatiques

La métabolisation des xénobiotiques occupe une place très importante et peut être responsable d'effets toxiques. En pharmacologie et/ou toxicologie, on peut administrer une prodrogue qui ne sera active qu'après métabolisation, mais des molécules qui sont actives avant métabolisation peuvent devenir inactives après métabolisation. La métabolisation est une étape clé soit pour l'activité pharmacologique mais également pour l'activité toxique d'un produit. L'objectif premier de la métabolisation va être de fabriquer des dérivés hydrosolubles, qui pourront être éliminés dans les urines ou dans les fèces. Pour qu'un produit exerce son activité pharmacologique/toxique, il faut qu'il rentre dans l'organisme. Il y a trois portes d'entrée possibles :

- La porte digestive concerne la majorité des médicaments.
- La porte cutanée concerne quelques médicaments et produits de l'environnement.

- La porte pulmonaire concerne quelques médicaments et majoritairement les produits de l'environnement.

Le xénobiotique pénètre dans une cellule. Soit il est lipophile et est donc capable de passer de manière passive la membrane biologique, soit il est pris en charge par des transporteurs (pour des dérivés plus hydrophiles). Le processus de biotransformation s'opère au niveau hépatique et inclut plusieurs phases :

- **La phase I (ou phase de fonctionnalisation)**

Elle repose principalement sur les cytochromes P450, enzymes de phase I et utilise l'oxygène : il s'agit des réactions d'oxydation et de réduction. L'hydrolyse avec des enzymes de type estérase permet le clivage d'un ester ou d'un amide. On a généralement la formation d'un dérivé hydroxylé plus hydrophile qu'au départ et qui peut être éliminé directement. Mais dans le cas général, il va être pris en charge par des enzymes de phase II.

- **La phase II (ou phase de conjugaison)**

Cette phase va permettre de générer un dérivé conjugué (par sulfo-conjugaison, glucuronoconjugaison, conjugaison au glutathion). Le rôle des enzymes de phase II est de rendre plus polaire des métabolites de phase I afin de faciliter leur élimination mais aussi de neutraliser (inactiver) un produit réactif avant de l'éliminer.

- **La phase III (ou phase d'excrétion)**

Ensuite, le produit conjugué va être excrété par des transporteurs ATP-dépendants dans la bile (élimination fécale sauf si cycle entéro-hépatique), voie majoritaire, ou la circulation sanguine (élimination urinaire). Les protéines de la famille des MDR (*Multi-Drug Resistance proteins*) sont capables d'expulser les xénobiotiques hors des cellules. La P-glycoprotéine (P-gp / ABCB1) et les *multi drug resistance related proteins* (MRP) sont également des protéines importantes dans l'excrétion des xénobiotiques. Cependant, dans certains cas, le métabolisme des xénobiotiques conduit à la formation de métabolites réactifs, plus toxiques que les composés initiaux, entraînant des effets délétères pour l'organisme dont les lésions hépatiques d'origine médicamenteuse.

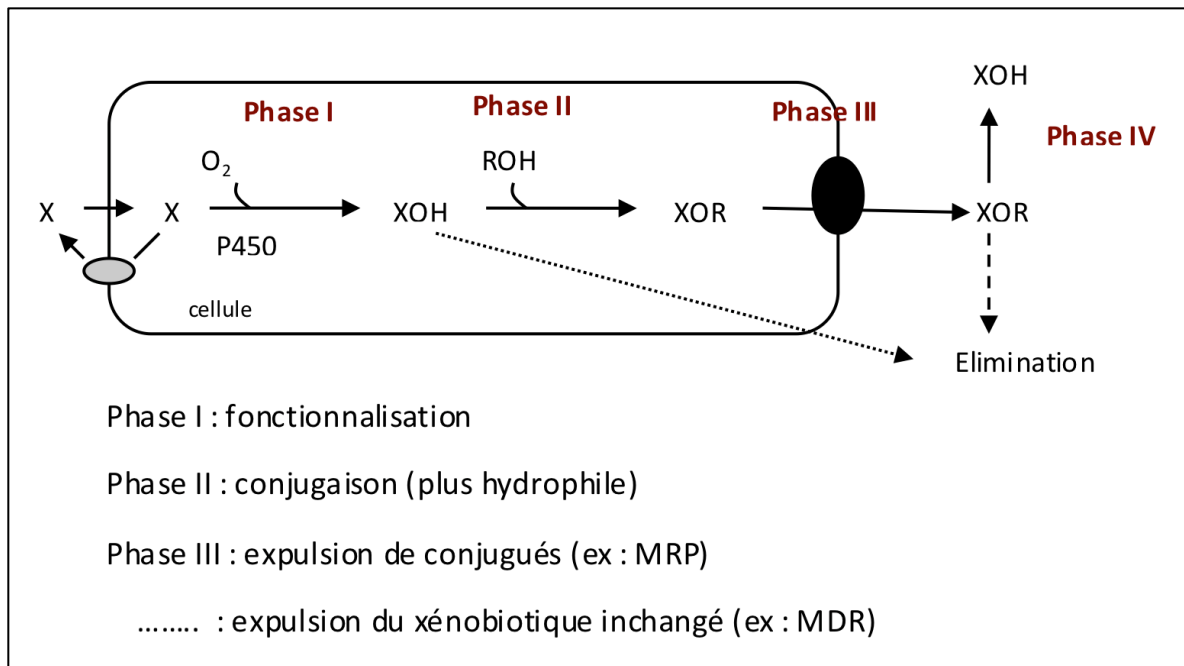


Figure 8 : Métabolisation des xénobiotiques

ii. Mécanismes de l'hépatotoxicité

1. Classification

Il existe au niveau du foie deux types de toxicité. La première dose-dépendante aussi appelée intrinsèque est prévisible (Navarro and Senior 2006) ; elle apparaît généralement après un court délai d'exposition au toxique (1-12 semaines) et on observe une récurrence s'il y a réadministration du médicament. On peut prédire cette toxicité lors des études précliniques chez l'animal. Il s'agit par exemple de la toxicité du paracétamol. L'hépatotoxicité peut être « idiosyncratique », c'est à dire non plus dose-dépendante et apparaît avec une période de latence plus longue (jusqu'à 12 mois) chez un (très) petit nombre de patients traités. Le terme « réaction médicamenteuse idiosyncratique » a été utilisé de diverses manières et n'a pas de définition claire. La propension d'un médicament à provoquer une réaction idiosyncratique dépend de ses caractéristiques chimiques, mais aussi de la sensibilité individuelle déterminée par des facteurs spécifiques au patient, en particulier l'expression des récepteurs immunologiques ou l'expression d'enzymes de métabolisation. Elles représentent un problème majeur pour le développement des produits de santé puisqu'à moins que l'incidence soit très élevée, elles ne sont généralement pas

détectées au cours des essais cliniques et de nombreux exemples graves ont conduit au retrait du médicament du marché (Utrecht 2009).

2. Mécanismes des DILI

Au cours des dernières décennies, beaucoup d'efforts ont porté sur les mécanismes d'hépatotoxicité liés aux médicaments afin de prédire au mieux son apparition chez l'homme. Les mécanismes sous-jacents de la toxicité induite par les médicaments sont variables et parfois mal définis. Ils peuvent être dus à un polymorphisme génétique des enzymes impliquées dans le métabolisme du médicament, des interactions médicamenteuses, à la toxicité mitochondriale, ou à la production de produits intermédiaires hautement réactifs générant un stress oxydant (McGill and Jaeschke 2013). Le processus fondamental est la mort des hépatocytes généralement associée à une réaction inflammatoire (Russmann, Kullak-Ublick, and Grattagliano 2009).

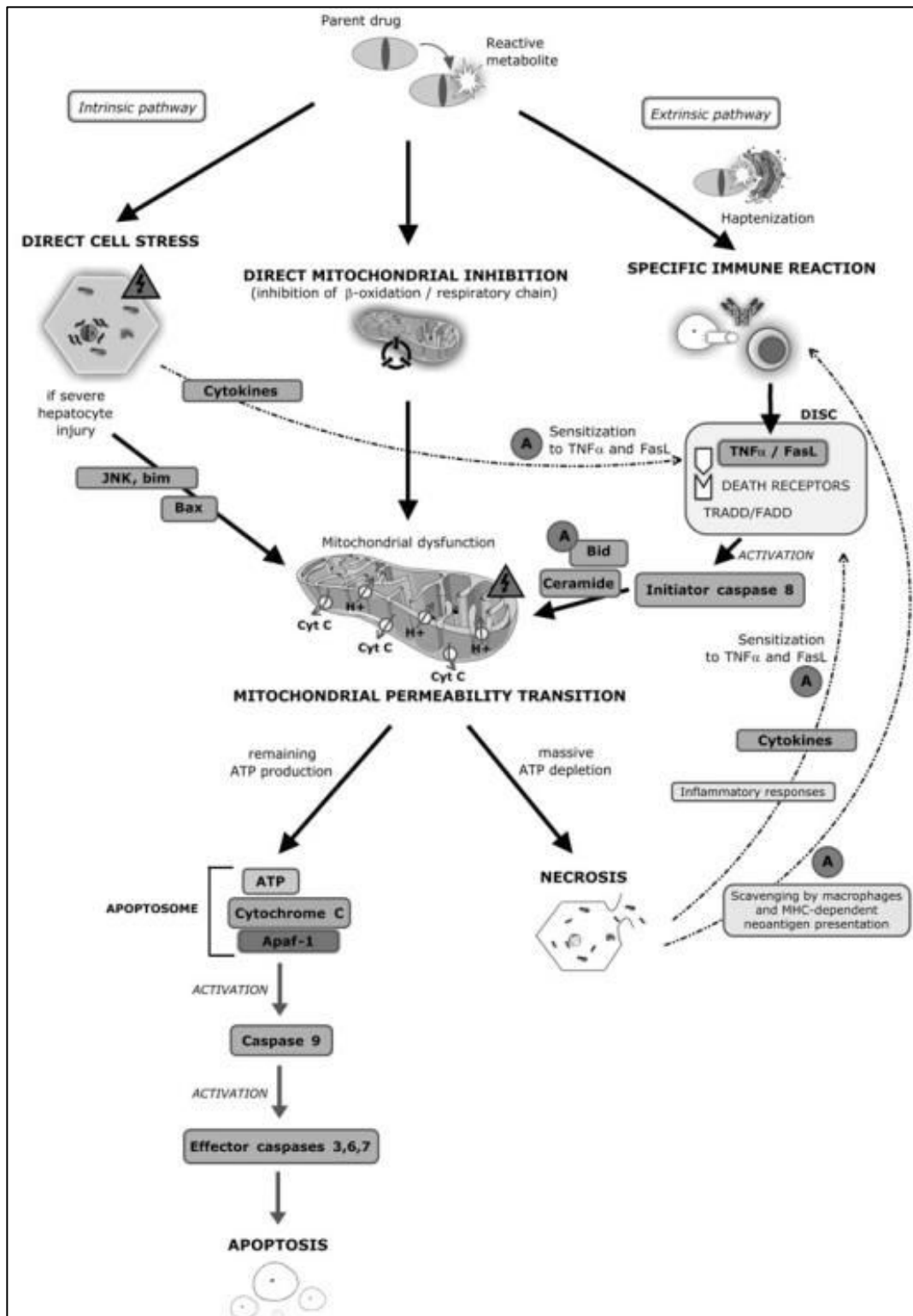


Figure 9 : Mécanismes d'induction de la mort cellulaire induite par les composés hépatotoxiques. Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) Tradd/ FADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein/Fas-Associated protein with Death. D'après (Russmann, Kullak-Ublick, and Grattagliano 2009).

Lors de la biotransformation d'un médicament (par oxydation ou réduction) en métabolites réactifs, ceux-ci peuvent entraîner un stress cellulaire direct, provoquer un dysfonctionnement mitochondrial ou encore former un haptène et activer une réponse immunitaire adaptative.

a) Stress cellulaire direct

L'induction d'un stress cellulaire peut conduire à l'activation de différentes voies de signalisation. L'une d'elle implique la kinase JNK (C-Jun N-terminal kinase) qui déphosphorylée, migre dans la mitochondrie et altère la chaîne respiratoire, aboutissant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le stress oxydant amplifie l'activation de JNK, ce qui peut provoquer une perméabilisation mitochondriale transitoire (PMT), concourant à la mort cellulaire. Le stress cellulaire peut également activer des cytokines capables elles mêmes d'activer les récepteurs de mort de type TNF α /FasL.

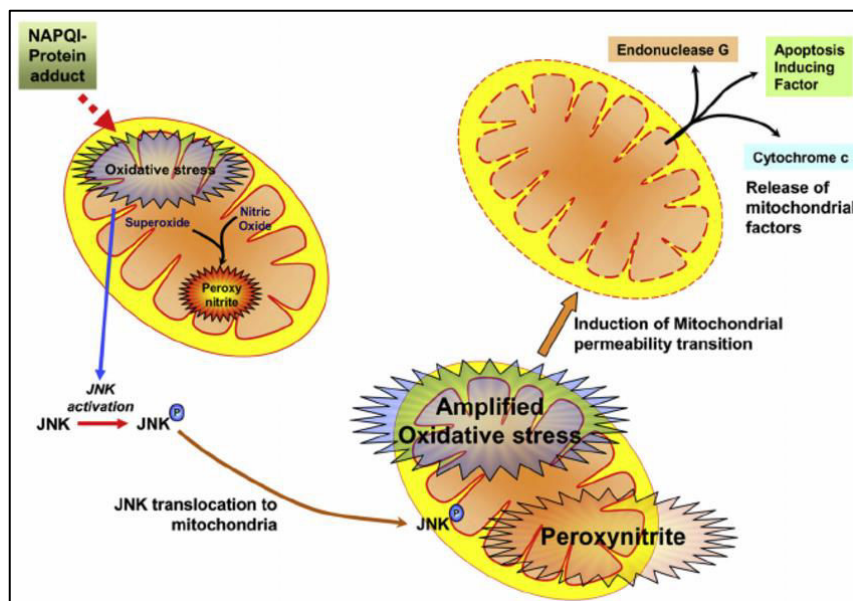


Figure 10 : Stress oxydant mitochondrial et formation de peroxy nitrite pendant l'hépatotoxicité induite par le paracétamol (Hanawa et al. 2008)

b) Dysfonctionnements mitochondriaux

Des molécules mères ou leurs métabolites peuvent altérer les mitochondries selon différents mécanismes :

- inhibition de la chaîne respiratoire entraînant un déficit énergétique (amiodarone, perhexiline,...)
- inhibition de la β -oxydation conduisant à une stéatose microvésiculaire (acide valproïque, AINS,...)
- lésions de l'ADN mitochondrial et effet découplant (fialuridine, tamoxifène,...)
- transition de la perméabilité mitochondriale (aspirine, acide valproïque,...) (Le Gall et al. 1980; Pessayre et al. 1999)

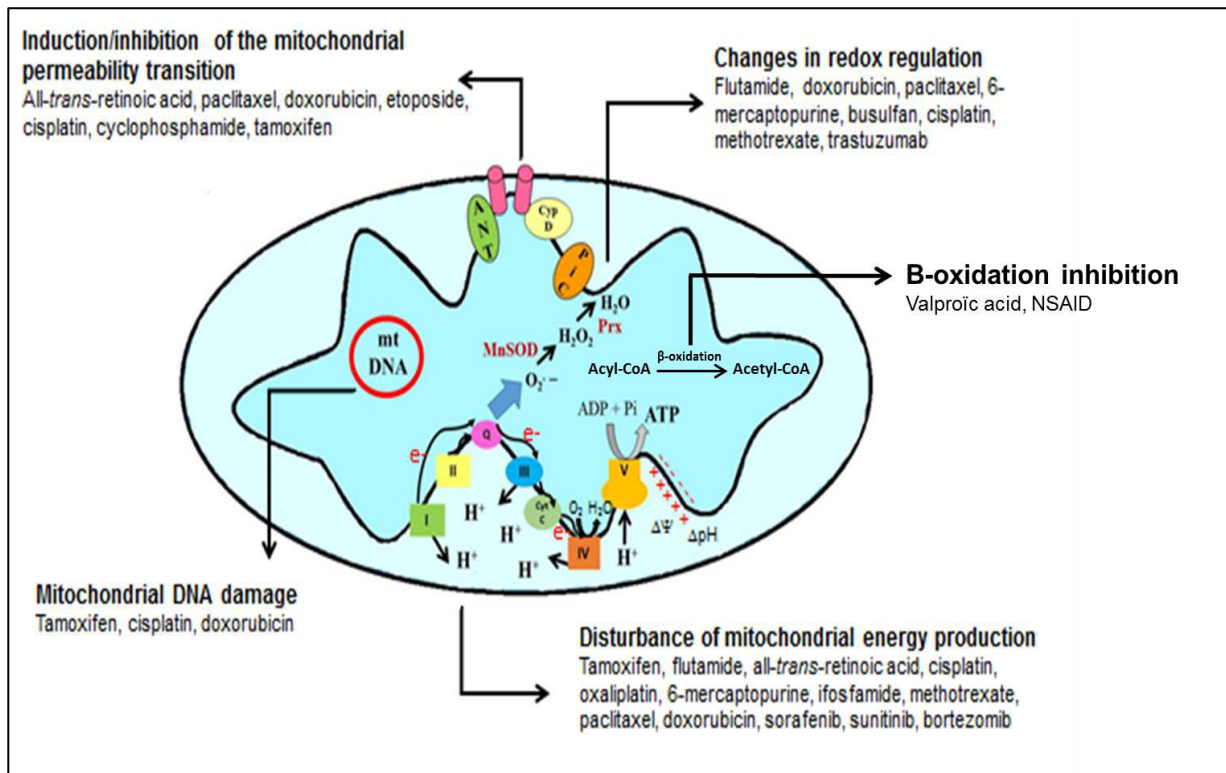


Figure 11 : Différents mécanismes altérant la mitochondrie (Ribeiro, Castro e Santos, and Custódio 2015)

Certains médicaments peuvent aussi léser d'autres organites comme le réticulum endoplasmique (tétrachlorure de carbone) ou encore le lysosome (amiodarone) et engendrer des pathologies hépatiques (Megarbane, Deye, and Baud 2007).

c) Réactions immunes

Le phénotype inflammatoire lors de la toxicité hépatique peut être attribué à la réponse immunitaire innée générée par les cellules de Kupffer, monocytes, neutrophiles et lymphocytes. Le système immunitaire adaptatif est également influencé par la réponse immunitaire innée conduisant à des dommages du foie. Comme dans tous les mécanismes immuns, le métabolite réactif est un haptène qui se lie par liaison covalente aux protéines et devient immunogène. Il y a dans ce cas production des lymphocytes-T cytotoxiques par la cellule présentatrice d'antigène (immunité cellulaire) et production de lymphocytes B (immunité humorale) produisant des anticorps anti- protéine native et/ou protéine modifiée (Jaeschke et al. 2002). Dans un contexte d'inflammation, les lymphocytes T peuvent ensuite être dirigés contre les hépatocytes, causant une cytolyse.

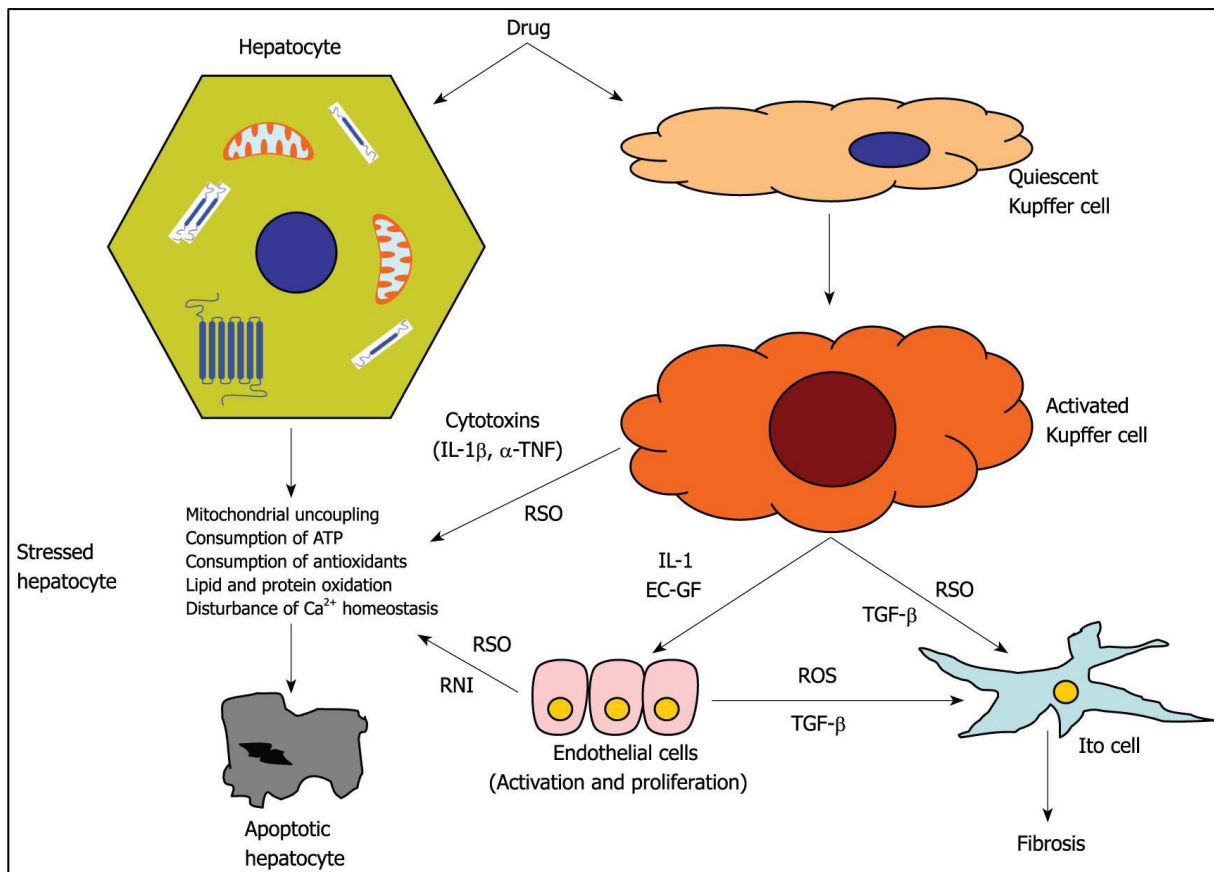


Figure 12 : Toxicité immunologique. EC-GF: Endothelial cell growth factor; IL1: Interleukin 1; IL1β: Interleukin 1β; RNI: Reactive nitrogen intermediates; ROS: Reactive oxygen species; TGF-β: Transforming growth factor β; TNF: Tumor necrosis factor α. D'après (Grattagliano 2009)

d) Morts cellulaires : Apoptose, nécrose

L'activation des voies apoptotiques par les récepteurs du TNF α ou FAS entraîne une cascade intracellulaire de caspases qui conduit à une mort cellulaire programmée (Wang 2014). En effet, suite aux premières lésions causées par les métabolites réactifs, les trois situations précédentes conduisent à la PMT. Lors de cette étape, les pores de la mitochondrie s'ouvrent et laissent transitoirement sortir le cytochrome C (cyt C). En présence d'une production d'ATP continue, le cytochrome C forme l'apoptosome en se liant avec Apaf-1. Le complexe est ensuite capable d'activer une cascade de caspases (9 puis 3,6,7) afin d'initier le phénomène d'apoptose. Par exemple, le diclofenac avec l'activation de la caspase 3 induit une apoptose dans les hépatocytes (Gómez-Lechón et al. 2010). En cas de déplétion massive d'ATP, la mort cellulaire s'oriente vers la nécrose. Globalement la cellule qui se désagrège est digérée par ces propres enzymes (autodigestion). Il y a alors une pénétration massive d'eau dans la cellule. Les cellules gonflent et les organites éclatent, ce qui libère les enzymes lytiques, les lysosomes et les peroxysomes entraînant la digestion de la cellule et donc sa lyse.

iii. Principales lésions hépatiques toxiques

1. Hépatites aiguës (cytolytiques, cholestatiques ou mixtes)

Par définition, une hépatite est une inflammation du foie entraînant une destruction plus ou moins importante des hépatocytes. Lorsque cette inflammation est récente (moins de 6 mois), on parle d'hépatite aiguë. Si l'inflammation persiste plus de six mois, on parle d'hépatite chronique. Le type de lésion hépatique induite par une molécule hépatotoxique est classé selon l'élévation relative des taux d'alanine aminotransférase (ALAT) et de phosphatase alcaline (PAL) (Bénichou 1990). Généralement, le mécanisme des lésions hépatiques n'est pas unique, mais est spécifique du toxique en cause, avec une atteinte sélective du lobule hépatique (Pessayre et al. 1999). Elles peuvent être classées en trois sous classes : cytolytique, cholestatique ou mixte.

TYPES D'HEPATITE	HEPATITE CYTOLYTIQUE	HEPATITE CHOLESTATIQUE	HEPATITE MIXTE
CRITERE DIAGNOSTIQUE	ALAT > 2N ALAT/PAL ≥ 5	PAL > 2N Bilirubine conjuguée >2N ALAT/PAL ≤ 2	ALAT/PAL de 2 à 5
PRINCIPAUX MEDICAMENTS	Ascarbose, acide valproïque, AINS, antiviraux nucléosidiques, allopurinol, amiodaorone, baclofène, bupropion, disulfiram, fluoxétine, flucytosine, furosémide, halothane, isoflurane, enflurane, herbes (piper methysticum ou kava), hydralazine, isoniazide, ketoconazole, fluconazole, voriconazole, lisinopril, losartan, méthotrexate, méthyldopa, ofloxacine, norfloxacine, trovafloxacine, oméprazole, paracétamol, paroxétine, pentamidine, pyrazinamide, ranitidine, rifampicine, rispéridone, sertraline, statines, streptokinase, sulfasalazine, tétracyclines, trazodone	Amoxicilline-acide clavulanique, acide fusidique, chlorpromazine, clopidogrel, contraception orale, érythromycine herbes (larrea tidentata ou créosotier), irbesartan, mirtazapine, estrogènes, phénothiazines, stéroïdes anabolisants, terbinafine, tricycliques	Amitriptyline, azathioprine, captopril, carbamazépine, clindamycine, cloxacilline, cyproheptadine, diazépam, enalapril, flutamide, halopéridol, herbes (teucrium chamaedrys), nitrofurantoïne, phénobarbital, phénytoïne, sulfonamides, trazodone, triméthoprime — sulfaméthoxazole, vérapamil

Tableau 1: Différents médicaments impliqués dans les hépatites. D'après (Bénichou 1990; Holt and Ju 2006; Navarro and Senior 2006)

a) Hépatite cytolytique

Il s'agit des formes les plus sévères caractérisées par une nécrose hépatocytaire intralobulaire et un infiltrat inflammatoire lobulaire ou portal d'intensité variée. Au niveau des manifestations cliniques, on retrouve un ictère ainsi que des manifestations d'encéphalopathie hépatique (confusion) qui témoignent d'une nécrose massive. Un arrêt du médicament est habituellement suivi d'une amélioration nette des tests hépatiques dans les semaines qui suivent, et d'une guérison dans un délai de 3 mois (Megarbane, Deye, and Baud 2007).

b) Hépatite cholestatique

Rarement isolées, elles sont associées à un blocage de la sécrétion biliaire au niveau de l'hépatocyte, du canalicule biliaire ou encore des canaux biliaires (Navarro and Senior 2006). L'inhibition des protéines de transport ou les altérations de la sécrétion biliaire sont des mécanismes propres à la cholestase induite par les médicaments et largement décrite par la suite.

c) Hépatite mixte

Les atteintes mixtes associent les manifestations des atteintes cytolytiques et cholestatiques. Elles représentent les hépatites les plus fréquentes et leur gravité dépend essentiellement de l'importance de la cytolyse (Larrey 1995).

2. Maladies de surcharges (lipides, phospholipides)

Les maladies de surcharge lipidique des hépatocytes (surcharge en triglycérides, diglycérides et cholestérol) constituent des stéatoses soit macrovésiculaires considérées comme bénignes soit microvésiculaires potentiellement graves. La perhexiline, l'amiodarone ou encore le tamoxifène peuvent générer des stéatoses macrovésiculaires. L'acide valproïque ainsi que l'aspirine sont eux responsables de stéatoses microvésiculaires.

La phospholipidose est une accumulation intracellulaire de phospholipides dans les hépatocytes, caractérisée par l'accumulation de corps lamellaires intracytoplasmiques, pouvant entraîner une inflammation et des modifications morphologiques des cellules (N. Anderson and Borlak 2008).

3. Autres pathologies

Il existe encore d'autres pathologies induites par les médicaments au niveau du foie comme par exemple les lésions vasculaires (thrombose de la veine porte induite par les contraceptifs oraux), les hépatites chroniques (par la méthildopa par exemple) qui peuvent évoluer en fibrose et cirrhose (Hillaire, Cazals, and Valla 2008). Les hépatites granulomateuses sont représentées au niveau histologique par des amas de cellules épithéliales entourées de lymphocytes. Les granulomes sont le plus souvent diffus, non nécrotiques, localisés à proximité des canalicules biliaires ou dans le parenchyme hépatique. Ce sont des pathologies rares provoquées par certains médicaments comme la quinidine ou l'allopurinol (Geri and Cacoub 2011).

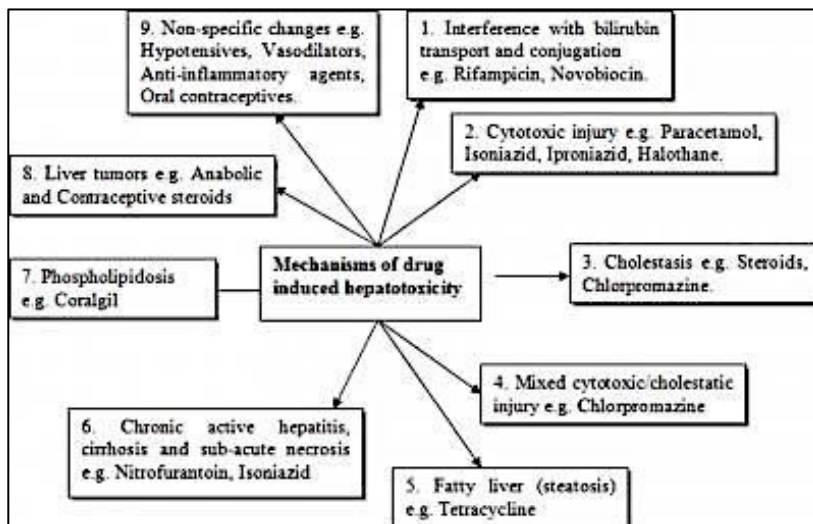


Figure 13 : Les mécanismes de l'hépatotoxicité liée aux médicaments. D'après Kshirsagar et al. 2008.

iv. Facteurs de risques de DILI

Il existe comme pour toutes pathologies, des facteurs de risques qui peuvent être d'origine génétique ou non (CHALASANI and BJÖRNSSON 2010).

1. Les facteurs non génétiques

On peut citer :

- L'âge: En dehors d'une exposition accidentelle, les réactions médicamenteuses hépatiques sont rares chez les enfants. Les personnes âgées ont plus de risque de développer une lésion hépatique en raison de la diminution de la clairance, du nombre plus important d'interactions médicamenteuses, de la réduction du flux sanguin hépatique, de la variation de la liaison aux protéines, et de la diminution du volume hépatique (Bell and Chalasani 2009).
- Le sexe: Bien que les raisons soient inconnues, les réactions médicamenteuses hépatiques sont plus fréquentes chez les femmes (Lucena et al. 2009).
- La dose quotidienne : Bien que les manifestations idiosyncratiques des DILI ne peuvent pas être uniquement basées sur la dose, il existe une relation entre les doses quotidiennes > 50 mg/jour et le risque de DILI (de Abajo et al. 2004).
- L'alcool: les sujets alcooliques semblent être plus sensibles à la toxicité des médicaments car l'alcool induit des lésions hépatiques qui évoluent en fibrose et cirrhose, ce qui entraîne des modifications dans la capacité de métaboliser les médicaments ("Drug-Induced Hepatotoxicity: Overview, Metabolism of Drugs, Clinical and Pathological Manifestations of Drug-Induced Liver Disease" 2016).
- Les maladies hépatiques: une maladie hépatique préexistante ne semble pas rendre les patients plus sensibles aux lésions hépatiques induites par les médicaments, mais il se peut que la plus faible capacité à récupérer puisse aggraver les conséquences des lésions.
- Les cytochromes P-450 : bien que les cytochromes P-450 aient des taux réduits dans les maladies chroniques du foie, certains peuvent être plus affectés que d'autres. La modification des doses chez les personnes ayant une maladie hépatique doit être basée sur la connaissance de l'enzyme spécifique impliquée dans le métabolisme (Minjun Chen et al. 2015).

- La formulation de médicaments: les médicaments à action prolongée peuvent causer plus de dommages que les médicaments ayant une courte durée d'action (Padda et al. 2011).

2. Les facteurs génétiques

Les différences génétiques dans les niveaux d'expression des enzymes P-450 peuvent entraîner des réactions anormales aux médicaments, y compris des réactions idiosyncratiques. La débrisoquine, un médicament anti-arythmique, peut être très faiblement métabolisée lors d'une perte d'expression du CYP2D6. Une analyse par PCR permet d'identifier les sujets prédisposés aux réactions anormales à un médicament (Llerena, Dorado, and Peñas-Lledó 2009). Des différences dans l'expression de protéines associées à l'élimination des médicaments ont également été détectées chez les patients ayant une hépatotoxicité induite par un médicament. Dans ces situations, les protéines de type MDR et BSEP qui sont responsables de l'excrétion des produits toxiques ou des acides biliaires dans la bile ont été associées aux DILI. Dans une récente étude de 110 échantillons de foies humains (Meier et al. 2006), une variabilité interindividuelle significative a été retrouvée dans les niveaux de protéines canaliculaires de BSEP, MDR3, MDR2 et de MRP2. En effet, 30% des échantillons contenaient des taux élevés de ces transporteurs alors que 32% avaient des niveaux bas voire très bas. Le polymorphisme génétique des enzymes intervenant dans le métabolisme des xénobiotiques peut parfois expliquer la susceptibilité de certains individus vis-à-vis de la toxicité des médicaments.

III. Méthodes de détection des DILI

a. Le cadre réglementaire

Historiquement, au niveau de l'hépatotoxicité par administration unique (comme pour toute autre étude de la toxicité en général), deux espèces sont requises pour les médicaments, généralement le rat et souvent le chien et deux voies d'administration sont indispensables (la voie préconisée chez l'homme, le plus souvent, voies orale et intraveineuse) (ICH guideline M3(R2) on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. December 2009). Pour la toxicité par administration répétée, il faut une espèce « rongeur » (rat, souris,...) et une espèce « non rongeur » (chien, singe,...) mais toutes sont des souches caractérisées. Ce sont souvent de jeunes adultes et il est nécessaire de faire des études sur les deux sexes à égalité. Trois concentrations sont généralement utilisées : la plus faible relativement proche de la concentration induisant l'effet pharmacologique, la plus élevée, celle provoquant un effet toxicologique franc avec une mortalité minimale. Si l'on souhaite étudier l'hépatotoxicité induite par un xénobiotique au niveau des fonctions de reproduction, on ne peut s'intéresser qu'au segment II, c'est à dire l'embryotoxicité et la tératogénèse. On veut en effet déterminer si le produit a un impact sur le développement vasculaire embryofœtal. Le traitement se fait de l'implantation jusqu'à la fin de l'organogénèse. On utilise ici au moins deux espèces (rongeur et non rongeur) : rat et lapin.

La toxicologie mécanistique est l'étude du mécanisme par lequel les agents chimiques ou physiques réagissent avec les organismes vivants pour provoquer une réaction toxique (Stellman 2000). Elle intervient dans la toxicité hépatique, notamment grâce aux modèles animaux qui permettent de comprendre en détail les mécanismes de cette toxicité. En conclusion, l'hépatotoxicité d'une molécule intervient dans tout le développement du médicament, de la phase de recherche aux phases cliniques. C'est une toxicologie organo-spécifique à part entière.

b. Les études précliniques

Les animaux sont tous sacrifiés à la fin de l'étude à part une petite partie conservée pendant quelques semaines afin d'étudier la réversibilité des effets. Des observations sont réalisées de manière systématique :

- Le poids et la consommation de nourriture
- Mortalité et signes cliniques
- Biochimie clinique (ASAT, ALAT, γ GT, bilirubine, temps de prothrombine, protéines sériques)
- Evaluation macroscopique, poids des organes et observations histopathologiques des coupes de foie après coloration.

L'objectif est ainsi de déterminer le type de toxicité hépatique ainsi que la sévérité des effets. Il faut aussi évaluer s'il y a réversibilité des effets ou non et enfin déterminer la NOEL (No-Observable-Effect-Level). Comme vu précédemment, les DILI peuvent être classées en deux catégories : directe ou idiosyncratique. La question qui se pose alors pour l'industrie pharmaceutique comme pour les agences réglementaires est de savoir comment faire pour améliorer cette prédictibilité. Basé sur la règle fondamentale des 3R élaborée en 1959 (Richmond et al. 1959) le raffinement des études animales pourrait permettre d'améliorer cette prédictibilité en utilisant des modèles animaux pertinents (profil métabolique, réponse pharmacologique) ou encore des modèles animaux malades (Flecknell 1994). Une meilleure compréhension des différences inter-espèces et une génomique comparative seraient aussi un moyen d'augmenter cette prédictibilité. Enfin, l'approche QSAR *in silico*, l'approche OMICS, la détection des métabolites réactifs ou encore l'utilisation de modèles *in vitro* sont les objectifs principaux.

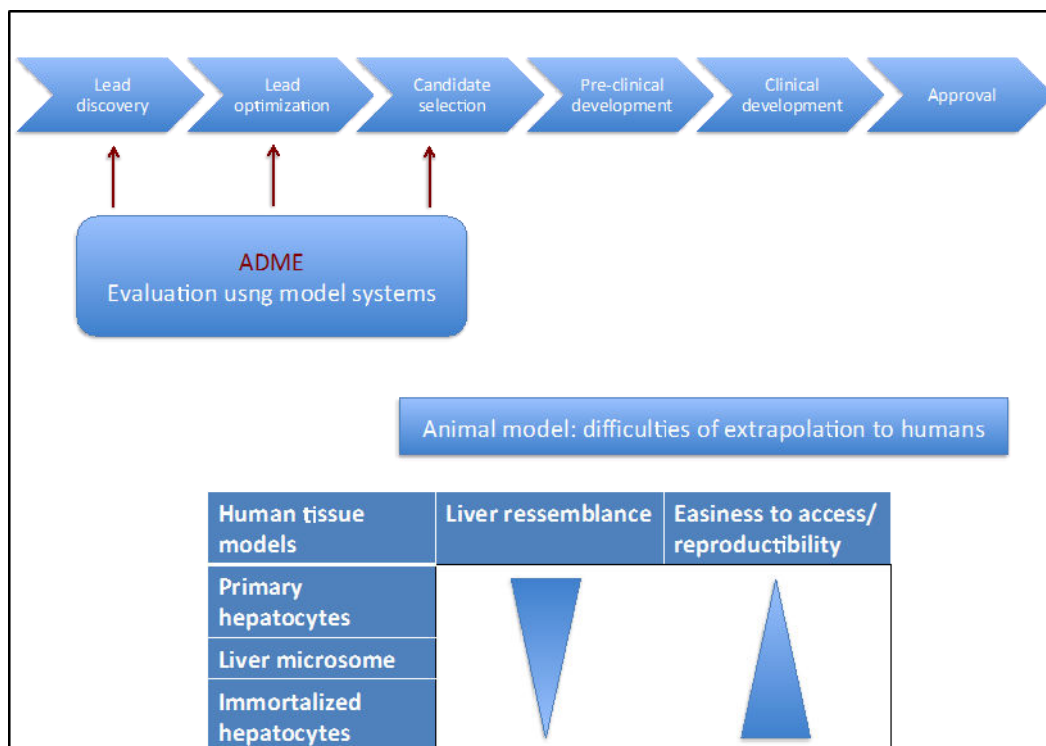


Figure 14 : Développement des médicaments et évaluation ADME (Workshop: “Genetic Toxicology: Opportunities to Integrate New Approaches”, 2012)

c. Modèles *in vitro*

L'approche toxicologique standard pour évaluer la toxicité d'un médicament implique des études complexes *in vivo* qui sont à la fois longues et coûteuses. En raison des préoccupations au sujet du bien-être animal, du temps et du coût des études, du nombre toujours croissant de xénobiotiques à tester, la mise en place de systèmes de culture *in vitro* est devenue une priorité pour les toxicologues. Par ailleurs, la prédictibilité d'un effet toxique sur les rongeurs dans les essais *in vivo* est devenue un sujet de litige au cours des dernières années, en partie en raison d'une mauvaise concordance entre les études animales et humaines. Au fil des années, divers dérivés du foie ont été développés pour permettre l'étude des effets indésirables potentiels de médicaments. Les tranches de tissu, les microsomes, les lignées cellulaires immortalisées, et les hépatocytes primaires ont été largement utilisés. Les lignées cellulaires immortalisées et les cellules hépatiques primaires isolées sont actuellement les plus largement utilisées pour les tests de toxicité hépatique. Les développements récents dans le domaine de l'hépatotoxicité *in vitro* comprennent des tissus (coupes de foie), des foies bioartificiels, des co-cultures de divers types cellulaires avec

hépatocytes, et la différenciation des cellules souches en cellules hépatiques (Soldatow et al. 2013).

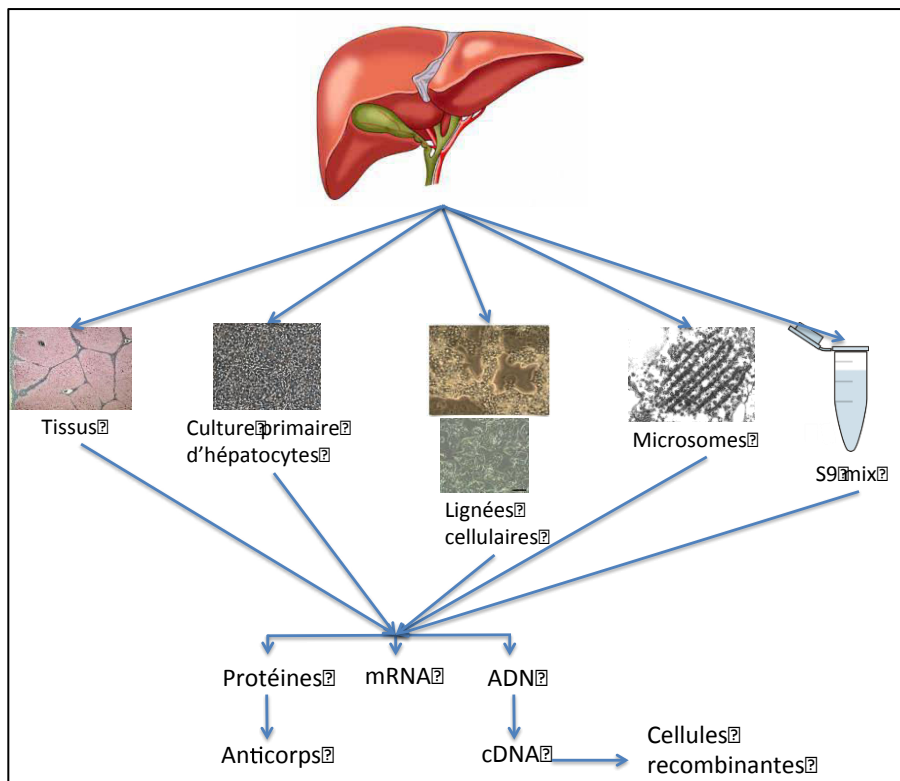


Figure 15 : Modèles in vitro d'étude de l'hépatotoxicité

i. Foie isolé perfusé

Durant des années, le foie isolé perfusé de rat a été utilisé pour étudier la physiologie et la pathophysiologie hépatique. Ce modèle permet en effet d'évaluer les lésions cellulaires et les fonctions hépatiques dans une conformation « isolée » (Bessems et al. 2006). Cette méthode reste cependant adaptée uniquement aux rongeurs et ne peut servir que pour des expérimentations de courte durée du fait de la courte viabilité des organes. Ce modèle qui se rapproche le plus de la situation *in vivo* présente deux avantages principaux : maintien de l'architecture en 3D et possibilité de recueillir la bile afin de l'analyser. Il est également largement utilisé pour les études de pharmacocinétique et de pharmacodynamie. C'est toutefois un modèle difficile à mettre en œuvre (André Guillouzo, Marano, and Adolphe 1995).

ii. Tissus (coupes de foie)

Avec une viabilité de quelques jours maximum et une utilisation du tissu humain majoritairement, les tranches de tissus semblent être un bon modèle d'étude de la fonction hépatique (Gandolfi, Wijeweera, and Brendel 1996). Les interactions cellules-matrice et cellule-cellule sont conservées ce qui permet par exemple l'étude des réactions inflammatoires. Leur utilisation aussi bien en biochimie qu'en microscopie électronique permet d'étudier la toxicité de différents composés en même temps et de démontrer une localisation intralobulaire préférentielle des toxiques.

iii. Cellules isolées en culture

Les hépatocytes isolés en culture (majoritairement d'origine humaine) représentent une bonne alternative aux méthodes *in vivo*. En effet, les perfusions de collagénases et de pronases permettent depuis quelques années de récupérer et de mettre en culture différents types cellulaires hépatiques (hépatocytes, cellules de Kupffer,...).

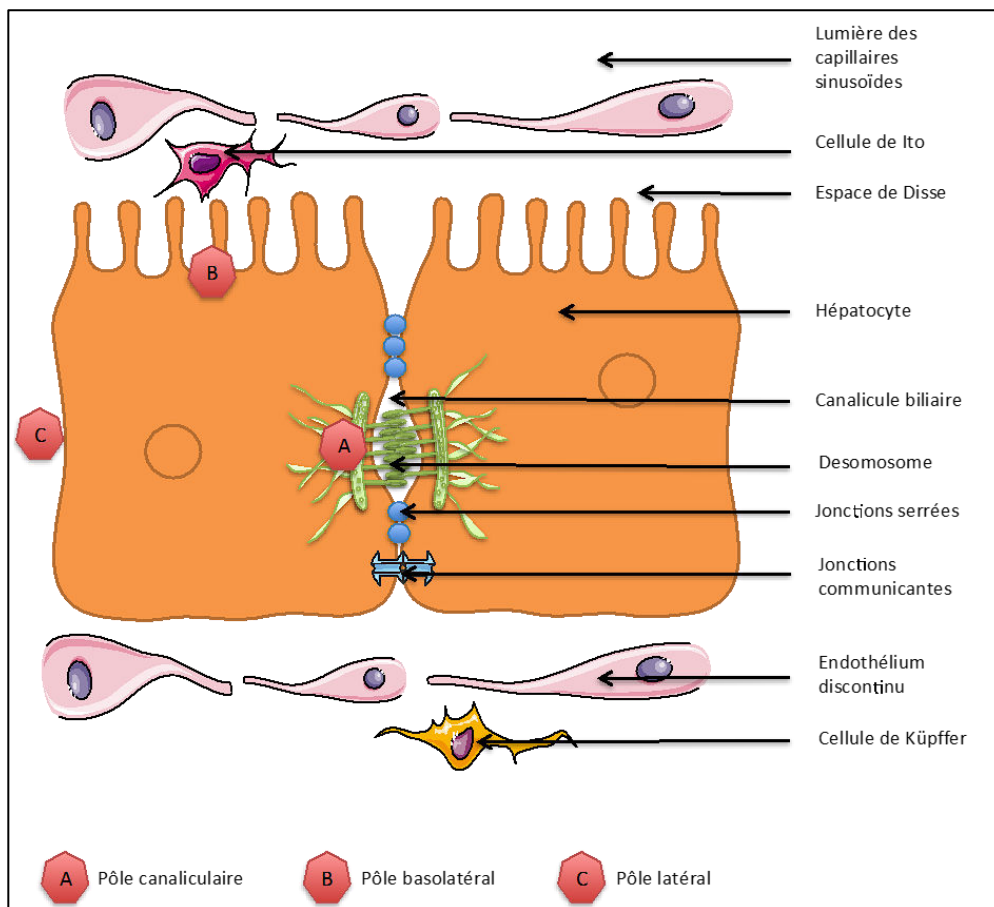


Figure 16 : Schéma de deux hépatocytes avec jonctions serrées

Les hépatocytes en culture primaire représentent à priori, le modèle cellulaire hépatique le plus proche de la situation *in vivo*. Fraichement isolés, ils conservent leur structure particulière et expriment transitoirement (pendant plusieurs jours) *in vitro* la plupart des fonctions spécifiques du foie. Leur intérêt réside également dans le fait que l'on peut également induire ou inhiber les enzymes de biotransformation, ce qui en fait un bon modèle pour l'étude du métabolisme (André Guillouzo, Marano, and Adolphe 1995). Cependant, des altérations fonctionnelles et phénotypiques sont rapidement observées. De plus, leur disponibilité et leur survie sont limitées (A. Guillouzo 1998; Brandon et al. 2003). Actuellement, la cryoconservation est la seule méthode disponible à long terme pour le stockage d'hépatocytes humains primaires. Les hépatocytes primaires humains en culture ont une survie limitée, une absence de prolifération et surtout une variabilité interindividuelle importante au niveau de l'expression génique (Rogue et al. 2012).

iv. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires d'origine tumorale ont pris une place importante dans le développement des molécules pharmaceutiques depuis quelques années. Les lignées de cellules hépatiques offrent un certain nombre d'avantages, parmi lesquels une quantité illimitée de cellules (Castell et al. 2006). Cependant, ces lignées, y compris la lignée humaine HepG2, la plus couramment utilisée dans les études de toxicologie, ont perdu une part importante des fonctions hépatiques, en particulier l'expression des enzymes de phase I et des transporteurs de médicaments (Castell et al. 2006; Westerink and Schoonen 2007). La lignée HepaRG se distingue cependant de toutes les autres lignées par sa capacité à exprimer des fonctions hépatiques différenciées et représente une alternative efficace aux hépatocytes humains en culture primaire.

1. Les cellules HepaRG

La lignée HepaRG a été isolée en 2002 à partir d'une patiente atteinte d'un cholangio-hépatocarcinome et infectée par le virus de l'hépatite C (Gripon et al. 2002). Ces cellules capables de se (dé)différencier (Cerec et al. 2007) contiennent deux types cellulaires bien distincts : des cellules ayant la même morphologie que des hépatocytes matures ayant atteint un niveau de différenciation maximale, entourées de cellules peu différenciées

correspondant à des cellules biliaires primitives. Lorsqu'elles ne sont pas différenciées, elles présentent une morphologie cellulaire allongée et sont capables d'exprimer les marqueurs de progéniteurs hépatiques bipotents. C'est lorsque l'on ajoute 2% de DMSO après 15 jours d'ensemencement (les cellules sont à confluence), que l'on potentialise leur différenciation en deux types cellulaires bien distincts.

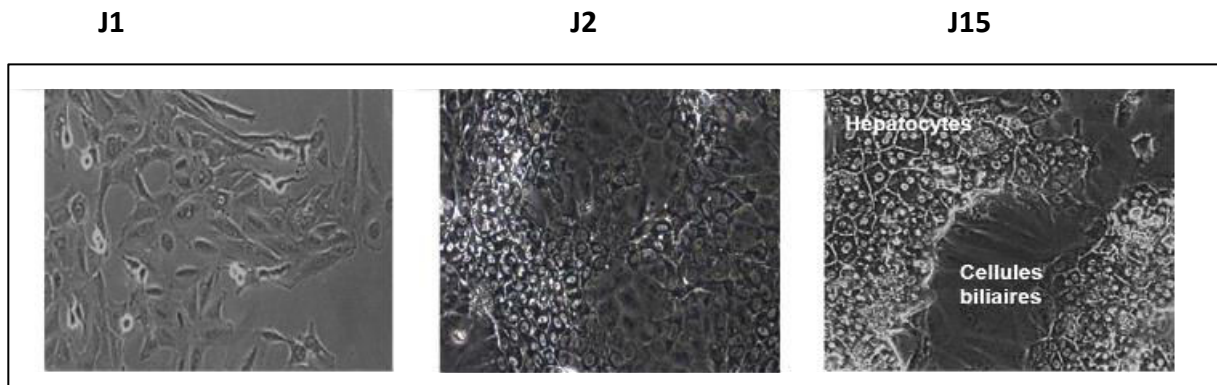


Figure 17 : Différenciation des Cellules HepaRG

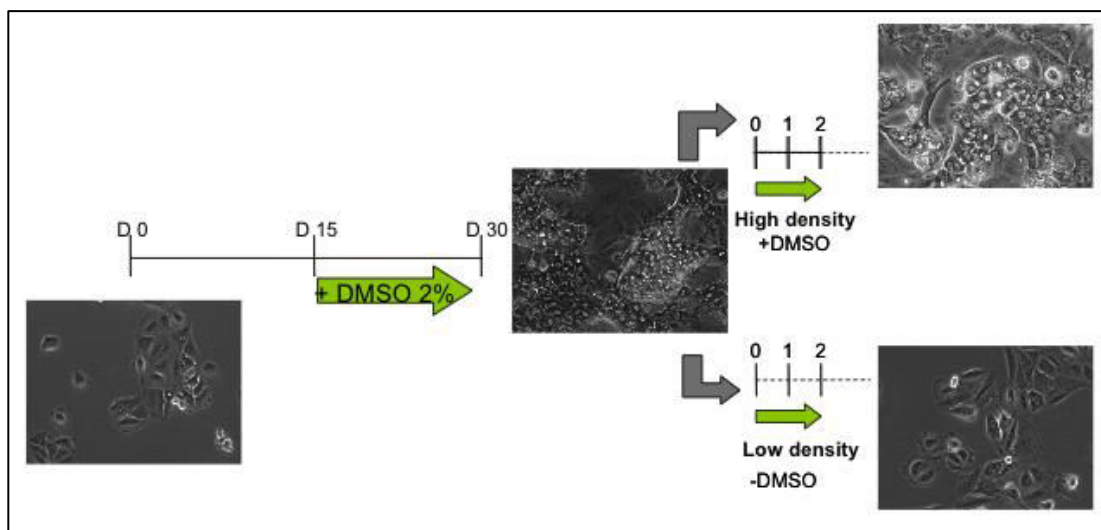


Figure 18 : Culture et différenciation des cellules HepaRG

La lignée HepaRG présente un caractère transformé modéré comparativement à des lignées d'hépatome comme HepG2. L'analyse du profil d'expression de l'ensemble du génome a révélé que les transcrits des cellules HepaRG sont à plusieurs niveaux bien plus proches de ceux des hépatocytes humains primaires et des tissus hépatiques humains comparés à ceux d'autres lignées telles que HepG2 (Hartman et al. 2010). Elles ont également la capacité à conserver leurs caractéristiques morphologiques pendant au moins

un mois après leur différenciation (Josse et al. 2008). Elles conservent également la capacité à assurer le métabolisme oxydatif des xénobiotiques (Aninat et al. 2006; Kanebratt and Andersson 2008) et la synthèse de glycogène. Elles expriment les transporteurs fonctionnels responsables de l'efflux et de l'influx des xénobiotiques et des acides biliaires, permettant ainsi de tester simultanément l'effet d'un composé chimique et de ses métabolites en aigu comme en chronique. L'expression de gènes caractéristiques d'hépatocytes différenciés (*Aldolase B*, *CYP3A4*), impliqués dans le métabolisme et le transport de xénobiotiques (*CYP3A4*, *CYP1A2*, *CYP2E1*, *CYP2B6*, *GSTA1/2*, *mEH*, *UGT1A1*) ou codant des facteurs nucléaires (*CAR*, *PXR*), reste relativement stable pendant au moins 4 semaines après la différenciation des cellules HepaRG. De même, les activités enzymatiques correspondantes des CYPs sont maintenues et restent inductibles par des inducteurs modèles, notamment la rifampicine, l'oméprazole et le 3- méthylcholanthrène (Kanebratt and Andersson 2008; Rogue et al. 2012; Gerets et al. 2012). Enfin, La pertinence du modèle des cellules HepaRG pour les études de toxicité hépatique *in vitro* par rapport aux modèles cellulaires classiquement utilisés a été également évaluée, de même que son intérêt pour des études de toxicité chronique (Dumont et al. 2010; McGill et al. 2011; Josse et al. 2008; Jossé et al. 2012). Aujourd'hui, la plupart des laboratoires pharmaceutiques comme les laboratoires de recherche publique utilisent la lignée HepaRG comme substitut des hépatocytes primaires pour des études prédictives de cinétique et d'interactions médicamenteuses (McGinnity et al. 2009).

v. Fractions subcellulaires

Une homogénéisation ou rupture des membranes des hépatocytes par traitement chimique ou mécanique puis une séparation (par la masse, surface ou poids) permet d'obtenir des fractions subcellulaires. Les fractions subcellulaires comme les microsomes (qui contiennent les enzymes membranaires comme les cytochromes P450) ou la fraction S9 (qui contient les microsomes et le cytosol) sont des modèles *in vitro* communs pour évaluer la clairance hépatique ("Biologie Cellulaire et Moléculaire - Eduardo D. P. De Robertis, E. M. F. De Robertis - Google Livres" 2016). Ils sont aussi largement utilisés pour identifier les métabolites formés par voie oxydative et pour l'étude des mécanismes de l'hépatotoxicité induite par des xénobiotiques (André Guillouzo, Marano, and Adolphe 1995).

vi. Cellules recombinées hépatiques

Les levures, les bactéries, les cellules d'insectes et de mammifères non-hépatiques peuvent être transfectées avec des ADNc codant pour les CYP450 humains afin d'exprimer de manière transitoire ou stable un ou plusieurs cytochromes humains. Elle permettent en effet d'identifier et de confirmer l'implication individuelle des cytochromes (A. Guillouzo 1998).

	VIABILITE	AVANTAGES	INCONVENIENTS
FOIE ISOLE PERFUSE	1-3h	- Organe reproduit	- Expériences de courte durée - Procédure difficile
TISSUS HEPATIQUES	1-3 jours	-Architecture du tissu préservé -Fonction hépatique proche du foie -Bonnes capacités métaboliques -Etudes morphologiques possibles	-Difficile à obtenir à partir de foies sains -Changements phénotypiques rapides - Variabilité biologique -Procédure d'obtention difficile -Courte variabilité
CELLULES ISOLEES EN CULTURE (HEPATOCYTES PRIMAIRES)	7-14 jours	- Obtention à partir de foies humains -Fonctions proches de celles des hépatocytes <i>in vivo</i>	-Pas de canalicule biliaire -Courte viabilité
HEPATOCYTES PRIMAIRES EN CULTURE	Plusieurs jours	-Forte ressemblance au foie humain -Comparaison interspèce possible -Bonne caractérisation -Cryopréservation possible	-Difficile à obtenir -Procédure difficile -Variabilité courte -Variabilité inter-espèces -Perte de fonctions hépatiques
LIGNEES CELLULAIRES : HEPARG	Plusieurs semaines	- Majorité des enzymes hépatiques exprimées - Reproductible et robuste -Bonne prolifération et différenciation	-Cellules transformées -Originaire d'un seul donneur
LIGNEES CELLULAIRES : HEPG2	Plusieurs semaines	- Bien caractérisé pour les études de toxicité - Exprime une partie des enzymes hépatiques	- Faible expression des enzymes du métabolisme hépatique -Composition du milieu de culture impacte l'expression des cytochromes - Cellules transformées
FRACTIONS SUBCELLULAIRES	Temps courts > 1ou 2h	-Activité enzymatique préservée -Production de métabolites	-Etudes à court terme -Pas de réaction de phase 2 -Besoin de cofacteurs
CELLULES RECOMBINEES HEPATIQUES	Temps courts mais longs possible	-Plusieurs enzymes humaines exprimées -Utile pour les CYPs -Nombre de cellules illimité	-Utilisable pour certaines études seulement -Pas de niveau enzymatique physiologique

Tableau 2 : Modèles cellulaires d'étude de l'hépatotoxicité. D'après (Faqi 2013; A. Guillouzo 1998)

d. Modèles in silico

Appelées QSAR pour Quantitative Structure-Activity Relationships ou « systèmes experts », ces méthodes font appel à des outils informatiques. Elles représentent une relation entre la structure d'un composé ou d'une classe de composés et un effet biologique, et donnent une réponse de type oui/non. Les QSAR utilisent des modèles mathématiques élaborés qui reposent sur des bases de données obtenues d'après les études *in vivo*, *in vitro*, ou cliniques, et relient par des corrélations statistiques les informations structurales à la toxicité. La qualité des QSAR dépend donc de la qualité de la base de données utilisée. Actuellement, ces méthodes *in silico* jouent un rôle d'orientation pour l'évaluation de produits pour lesquels aucune donnée n'est disponible. Parmi les nombreux modèles disponibles, l'industrie pharmaceutique privilégie ceux qui ont été validés, comme DEREK ou MCASE, très utilisés pour le médicament mais aussi dans l'industrie chimique, et reconnus par les instances réglementaires. Ces bases sont enrichies en permanence par les utilisateurs, ce qui augmente d'année en année leur prédiction (Claude, Goldfain-Blanc, and Guillouzo 2009). Ainsi, une équipe américaine a mis au point un nouveau modèle *in silico* capable de prédire la survenue d'une hépatotoxicité dose-dépendante chez l'Homme avec une précision de 80%. Le modèle classe les composés comme toxiques ou non toxiques et fournit un niveau de confiance pour indiquer les prévisions qui sont les plus susceptibles d'être correctes (A. Cheng and Dixon 2003).

e. Essais cliniques

Il s'agit avant d'administrer une molécule à l'homme de définir ce que l'on appelle le FIM (« First In Human »). Généralement, on utilise toutes les données précliniques, c'est à dire le type et l'intensité des lésions, la présence de biomarqueurs de toxicité, toutes les données mécanistiques ou encore les données sur la réversibilité des effets pour calculer une marge de sécurité chez l'homme. Des calculs sont ensuite effectués en prenant en compte la surface du corps humain afin de définir une dose initiale maximale recommandée.

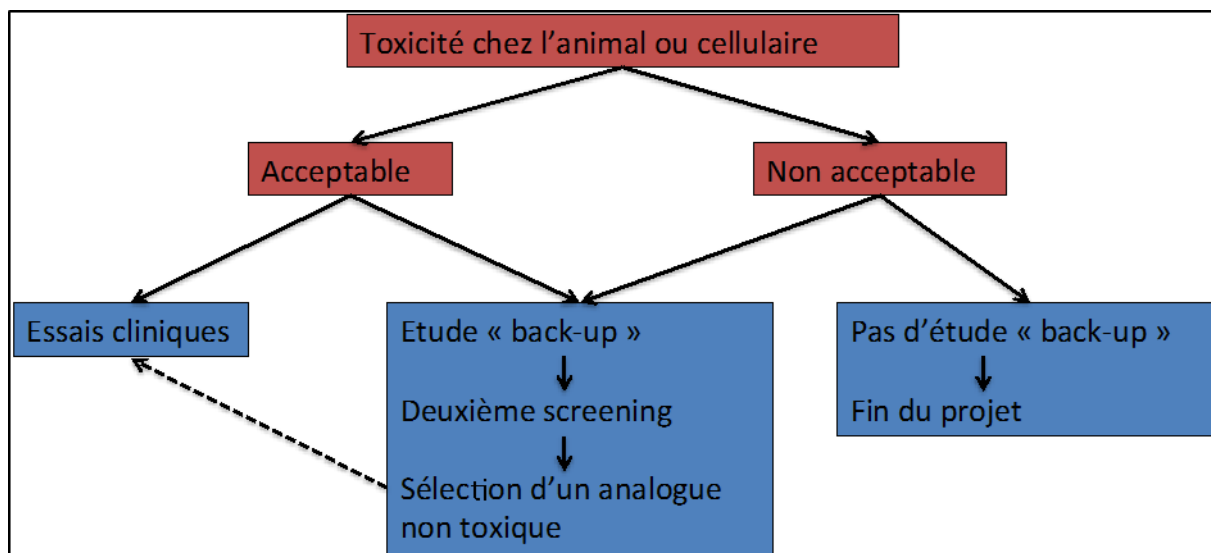


Figure 19 : Arbre décisionnel de fin d'étude préclinique

Les essais cliniques peuvent ainsi débuter : Les essais de Phase I ont pour objectif d'évaluer la tolérance d'un tout nouveau médicament, et donc la tolérance de l'organisme au traitement, dans le but de déterminer la dose recommandée. Le traitement évalué est administré à un petit nombre de malades (10 à 40). Les essais de Phase II évaluent l'efficacité d'un traitement. Ils nécessitent en général l'inclusion de 40 à 80 malades. Les essais de Phase III sont des essais comparatifs. Ils permettent de comparer le nouveau traitement avec le traitement utilisé habituellement, dit « traitement de référence » ou « traitement standard ». Deux groupes de patients sont constitués par tirage au sort (randomisation), ce qui permet de constituer des groupes homogènes et comparables (âge, sexe, caractéristiques de la maladie,...) : l'un recevra le traitement de référence, l'autre le nouveau traitement. Ce n'est donc pas le médecin qui décide de l'attribution de l'un ou l'autre des traitements à son patient. Ils permettent ainsi d'assurer un bon profil de sécurité hépatotoxique chez l'homme.

f. Le suivi post AMM et la toxicovigilance

Enfin la surveillance de l'effet hépatotoxique continue pendant toute la durée de vie du médicament. Le système de pharmacovigilance s'attache notamment à évaluer les facteurs évitables du risque médicamenteux, concernant les médicaments en développement ainsi que les médicaments commercialisés. La pharmacovigilance est présente tant au niveau clinique que préclinique. Tout effet indésirable lié à un problème hépatotoxique doit être

évalué par les médecins ou par les organismes réglementaires chargés de pharmacovigilance. Par exemple, en 2012, les données semblaient limitées sur les DILI associées aux statines. Les rapports sur les effets indésirables suspectés d'être dus à des statines ont été analysés par un comité suédois entre 1988 et 2010. Seuls les cas avec >5x la limite supérieure de la normale de transaminases et/ou > 2x la normale de phosphatases alcalines ont été inclus. Il en a été conclu après la récupération des données, qu'un schéma similaire de lésion hépatique pouvait être reproduit après chaque nouvelle exposition. La plupart des patients présentaient des lésions hépatiques 3-4 mois après le début du traitement. Enfin, l'atorvastatine a été principalement associée à des lésions hépatiques cholestatiques, alors que les lésions hépatocellulaires semblaient plus fréquentes avec la simvastatine (Björnsson, Jacobsen, and Kalaitzakis 2012).

IV. La cholestase

a. Définition

Le terme cholestase a été introduit en 1970 par Popper et Schaffner afin d'expliquer l'accumulation de la bile dans les cellules et dans l'arbre biliaire (Popper and Schaffner 1970). Par définition, la cholestase est une diminution ou un arrêt de la sécrétion biliaire (défaut de transport des acides biliaires du foie vers l'intestin). Les maladies cholestatiques constituent donc un groupe de maladies d'origine intra ou extra-hépatique. Ce phénomène a pour conséquence une augmentation des concentrations sériques et tissulaires d'acides biliaires (AB). La cholestase peut être (i) intrahépatique lors d'une diminution de l'excrétion canaliculaire conduisant à une accumulation des ABs dans le cytoplasme des hépatocytes ou encore (ii) extrahépatique quand il s'agit d'une obstruction qui empêche la progression de la bile au niveau des conduits biliaires. Elle est associée à une augmentation des taux sériques de la bilirubine conjuguée et peut se manifester par un ictère, un prurit et une stéatorrhée (Arrese and Trauner 2003). Elle est souvent accompagnée d'une nécrose et/ou apoptose (cholestase mixte) (Perez and Briz 2009).

b. Acides biliaires

i. Introduction

Le foie est l'organe glandulaire le plus important. C'est une glande digestive qui sécrète la bile, liquide jaune et amer, destiné à faciliter la digestion intestinale. En effet, l'organisme a deux problèmes à résoudre. Le premier vient du fait que les graisses ne sont pas solubles dans l'eau ; aucun lipide ne peut être absorbé tel quel par la muqueuse intestinale. Les lipides doivent donc être émulsifiés pour être absorbés. Les AB se regroupent en micelles, structures qui ont la capacité d'intégrer d'autres molécules lipidiques (cholestérol, phospholipides, acides gras). Dans la lumière intestinale, les micelles solubilisent les lipides alimentaires et permettent leur absorption.

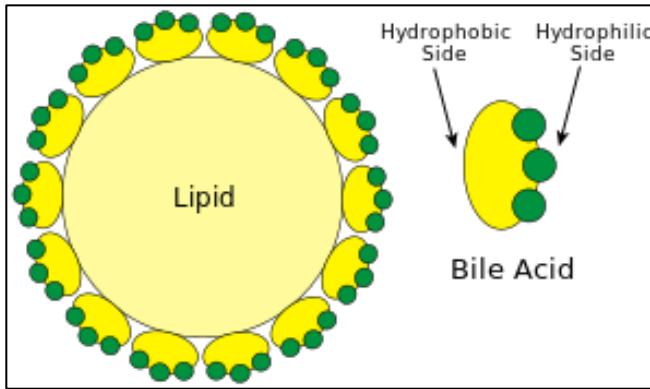


Figure 20 : Schéma d'un acide biliaire

Deuxièmement, les globules rouges du sang ont une durée de vie d'environ 120 jours. Ensuite, lors de l'hémolyse, l'hémoglobine est dégradée en une protéine plus légère, la bilirubine. La rate et la moelle transforment cette hémoglobine en bilirubine dite "libre" insoluble dans l'eau. C'est là qu'intervient le foie, capable de transformer cette bilirubine libre en bilirubine "conjuguée", qui elle, est soluble dans l'eau. La bile permet ainsi l'élimination de l'hémoglobine qui sans cela s'accumulerait dans l'organisme et donnerait une couleur jaune citron à notre peau et des prurits (ictère). Et en même temps, cette bile permet une émulsion des graisses dans l'intestin et donc leur absorption ainsi que celles des vitamines A, D, E et K. La bile neutralise le chyme gastrique acide, grâce à des ions bicarbonates. Elle est constituée d'ABs (dont 50% d'ABs primaires), de protéines, de cholestérol et de bilirubine (Reshetnyak 2013).

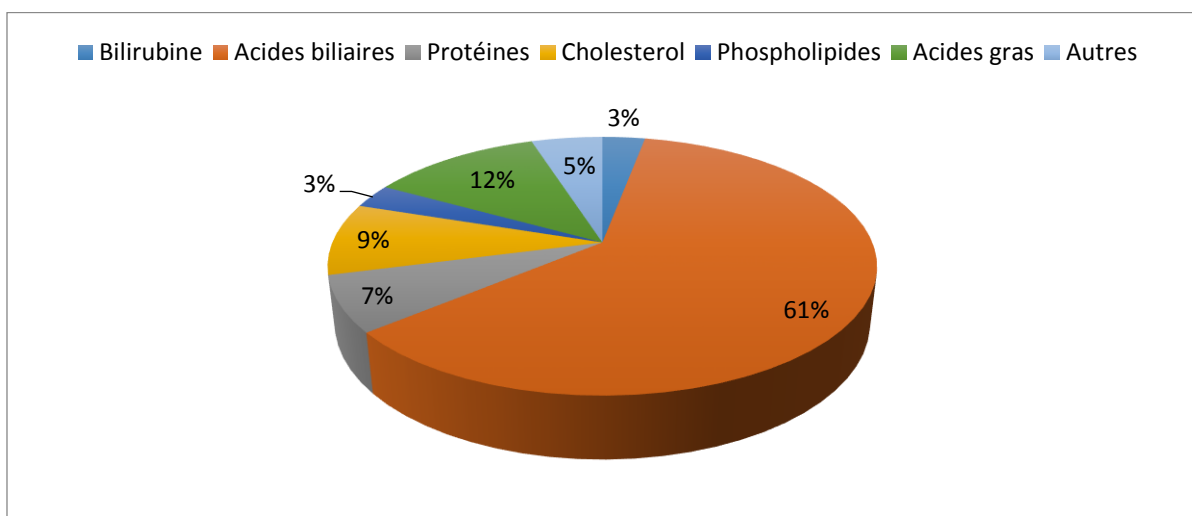


Figure 21 : Composition de la bile. D'après (Farina et al. 2009)

Le débit de la bile est d'environ 700 ml/jour. Trois types d'acides biliaires sont décrits : primaires, secondaires et tertiaires selon leur lieu de synthèse (foie, lumière digestive et foie). Un foie adulte normal produit environ 500 mg d'acides biliaires par jour (Reshetnyak 2013).

ii. Synthèse des acides biliaires

Les produits finaux à partir du cholestérol sont les acides biliaires. En effet, leur synthèse est la principale voie de catabolisme du cholestérol chez les mammifères. Bien que plusieurs des enzymes impliquées dans la synthèse des acides biliaires soient actives dans de nombreux types cellulaires, le foie est le seul organe où leur complète biosynthèse peut se produire. Il s'agit de l'un des mécanismes prédominants pour l'excrétion de l'excès de cholestérol. La synthèse d'un effectif complet d'acides biliaires nécessite 17 enzymes et a lieu dans plusieurs compartiments intracellulaires (cytosol, réticulum endoplasmique (RE), les mitochondries et les peroxysomes) (Björkhem and Eggertsen 2001; Bove et al. 2004). Les gènes codant plusieurs des enzymes de la synthèse d'acides biliaires sont sous stricte régulation afin d'assurer que le niveau nécessaire de production d'acides biliaires soit coordonné aux conditions métaboliques. Compte tenu du fait que de nombreux métabolites d'acides biliaires sont cytotoxiques, il est compréhensible que leur synthèse soit étroitement contrôlée (Chiang 1998). Synthétisés à partir du cholestérol et sous l'action de l'enzyme : cholestérol-7-hydrolase, les acides biliaires primaires (acides cholique et chénodéoxycholique) sont les seuls à être synthétisés par le foie (80% des sels biliaires de la bile). La voie neutre débute par l'hydroxylation du cholestérol par la 7-alpha-hydroxylase (CYP7A1) dans le réticulum endoplasmique. La voie acide (alternative) qui représente 10 à 15% de la totalité des acides biliaires synthétisés commence par l'hydroxylation du cholestérol par la 27-hydroxylase (CYP27). Le produit issu du CYP27, le 5-cholesten-3 β -27-diol est ensuite hydroxylé par le CYP7B1 (Russell 2003). A partir de cette étape, les deux voies se chevauchent. Le CDCA doublement hydroxylé et le CA triplement hydroxylé sont les principaux acides biliaires. Leur ratio dépend de l'activité de la stérol-12 α -hydroxylase (CYP8B1). Enfin la synthèse d'acides biliaires est complétée dans les peroxisomes hépatocytaires où la coenzyme d'acides biliaires, la BAAT (Bile Acid-CoA:Amino Acid N-Acyltransferase), conjugue soit la taurine, soit la glycine sur le CA ou le CDCA. Au moins 95% du pool d'acides biliaires est généré via ces deux voies (Boden et al. 2007). Sous forme

conjuguée, les sels biliaires sont sécrétés dans la bile par les hépatocytes. Parvenus dans l'intestin, les acides biliaires sont transformés par la flore bactérienne (déshydroxylation bactérienne) pour former les acides biliaires secondaires : acide désoxycholique et acide lithocholique. Parvenus en zone iléale, les acides biliaires conjugués sont déconjugués par les enzymes bactériennes (la flore intestinale devient importante en zone iléale). Tous les acides biliaires recaptés par le foie sont reconjugués comme les acides biliaires primaires, sauf l'acide lithocholique qui est sulfoconjugué ou réoxydé en ursodésoxycholate, acide biliaire tertiaire. Après déconjugaison, l'acide désoxycholique est réabsorbé par l'intestin et il se retrouve dans le foie où il sera immédiatement réexcrété vers la bile par un effet de premier passage ; on parle de cycle entéro-hépatique. En revanche l'acide lithocholique est peu réabsorbé (Chiang 1998). Les acides biliaires peuvent passer dans le sang et leur concentration augmente lors de cholestases.

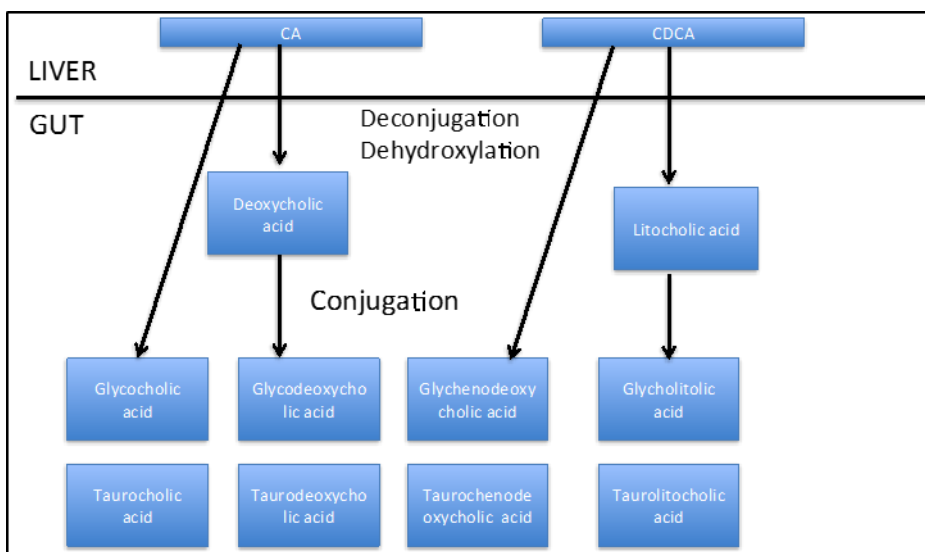
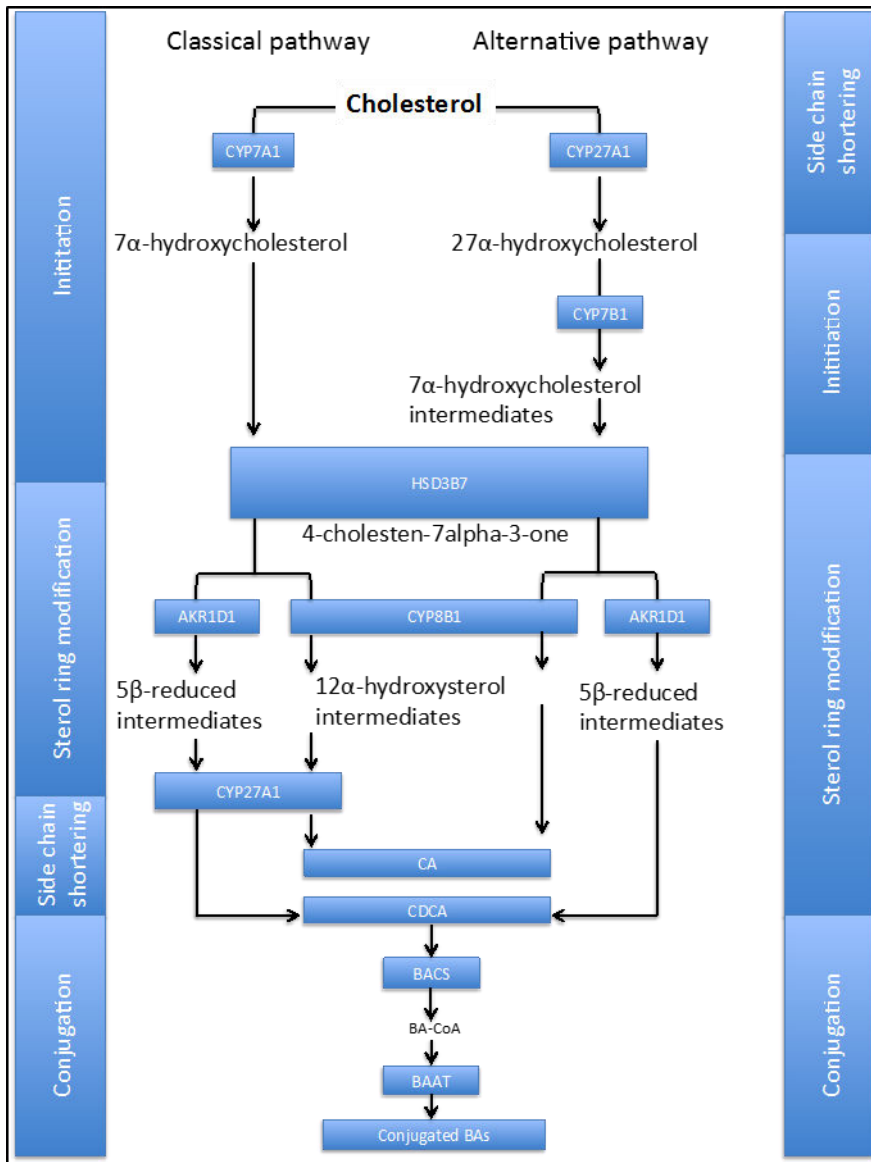


Figure 22 : Synthèse des acides biliaires

iii. Cycle entéro-hépatique

De grandes quantités d'acides biliaires sont sécrétées dans l'intestin chaque jour, mais seulement des proportions relativement faibles sont excrétées par l'organisme. En effet, environ 95% des acides biliaires livrés au duodénum sont ré-absorbés dans le sang avant le passage vers l'iléon (5% des ABs ne sont pas réabsorbés et sont éliminés dans les selles) (Ridlon, Kang, and Hylemon 2006). Le sang veineux de l'iléon va directement dans la veine porte, et donc à travers les sinusoides du foie. Les hépatocytes extraient les acides biliaires très efficacement à partir de sang sinusoidal et une petite quantité s'échappe du foie vers la circulation systémique. Les acides biliaires sont ensuite transportés à travers les hépatocytes pour être resécrétés dans les canalicules. L'effet de ce cycle entéro-hépatique est que chaque molécule de sel biliaire est réutilisée environ 20 fois, souvent deux ou trois fois pendant une phase digestive unique (González et al. 2012). Certaines maladies du foie peuvent modifier radicalement ce modèle de recirculation ; par exemple, les hépatocytes lésés peuvent diminuer la capacité d'extraction des acides biliaires à partir du sang veineux et des dommages sur le système canaliculaire peuvent entraîner des échappements d'acides biliaires vers la circulation systémique. Des dosages des taux systémiques d'acides biliaires sont utilisés en clinique en tant qu'indicateur sensible de maladie hépatique (Sponholz et al. 2015).

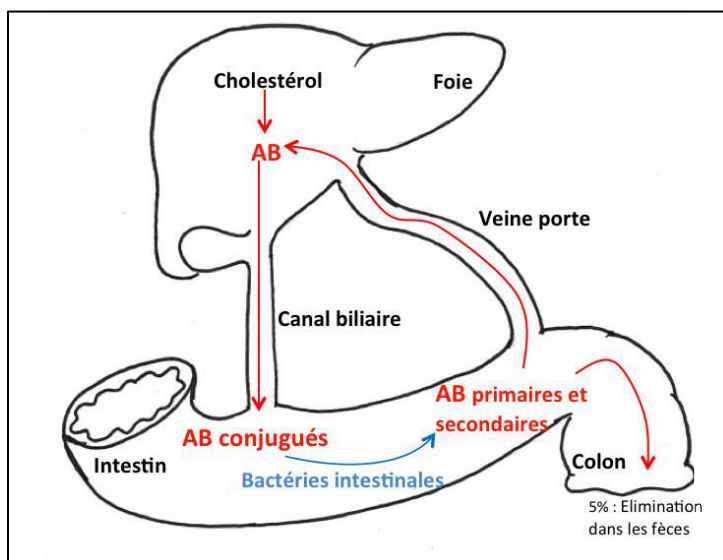


Figure 23 : Le cycle entéro-hépatique

iv. Transport des acides biliaires

Le transport des ABs, anions ou cations organiques, bilirubine ou encore des médicaments, fait appel à des transporteurs spécifiques dont l'expression est régulée au niveau génique notamment par les récepteurs nucléaires. On distingue des transporteurs d'influx et d'efflux canaliculaires et basolatéraux.

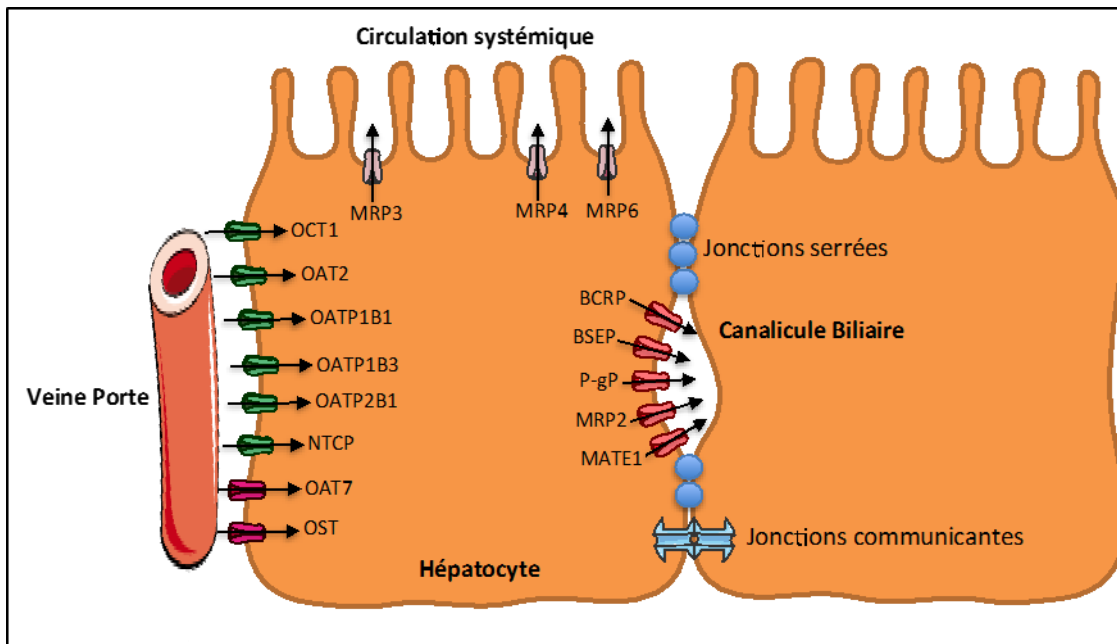


Figure 24: Les différents transporteurs hépatocytaires

1. Transporteurs sinusoidaux

Il s'agit des transporteurs d'influx et également des transporteurs d'efflux (International Transporter Consortium et al. 2010). Les transporteurs d'influx sont de type SLC (Solute Carrier Family) et permettent l'entrée des acides biliaires par diffusion facilitée ou transport actif secondaire dans l'hépatocyte. Il existe différents types de transporteurs qui se différencient notamment par la nature et la composition des acides biliaires transportés :

- NTCP (« Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide » / SLC10A1) : il assure le transport unidirectionnel et sodium-dépendant des acides biliaires conjugués et de certains médicaments de la veine porte vers l'hépatocyte (P. A. Dawson, Lan, and Rao 2009).

- OATP 1B1, 1B3, et 2B1 (« Organic Anion Transporting Polypeptides »/SLC0) : ils assurent le transport d'anions organiques de poids moléculaire élevé (> 350 g/mol) et de certains cations.
- OAT2 (« Organic Anion Transporter 2 »/SLC22A7) : il assure le transport d'anions organiques (salicylés) d'un poids moléculaire généralement plus faible que celui des substrats des autres OATPs.
- OCT1 (« Organic Cation Transporter »/SLC22A1) : il assure le transport de cations.

Les transporteurs basolatéraux d'efflux sont des pompes de type ABC (ATP-Binding Cassette) et assurent le retour vers le sang par transport actif primaire de composés ou de leurs métabolites pour une élimination rénale secondaire (Köck and Brouwer 2012) : Ces transporteurs appartiennent à la famille des MRPs « Multidrug Resistance-associated Protein »/ABCC : ils prennent en charge des composés anioniques ou conjugués, notamment au glutathion. Situés au pôle basolatéral de l'hépatocyte, les transporteurs d'efflux basolatéraux assurent le passage des ABs de l'hépatocyte dans la circulation systémique, qui seront ensuite éliminés dans les urines. A l'état basal, ces transporteurs sont faiblement exprimés. Ils font partie de la famille des MRP et sont dépendants de l'ATP. Les plus connus sont MRP3 et MRP4 (Keppler and König 2000; Soroka et al. 2010). Leur expression augmente lors de situations pathologiques dont la cholestase pour diminuer l'accumulation intra-hépatique des ABs.

2. Transporteurs canaliculaires

A l'inverse des transporteurs précédemment décrits, il s'agit de transporteurs d'efflux assurant la sécrétion d'acides biliaires et de xénobiotiques ou de leurs métabolites dans la bile (Köck and Brouwer 2012). Lors de leur passage, le pouvoir osmotique des ABs crée un appel d'eau interstitiel, qui traverse les jonctions serrées intercellulaires des hépatocytes. Un courant biliaire principal est ainsi formé. Ce gradient de concentration favorise la sécrétion des phospholipides et du cholestérol, ce qui permet la formation de micelles avec les AB, les rendant moins toxiques pour les cholangiocytes (Nathanson and Boyer 1991). On trouve principalement les pompes ABC :

- P-glycoprotéine (P-gp/ABCB1) : elle transporte les cations hydrophobes amphiphiles, notamment les médicaments anticancéreux. Cette protéine est codée par le gène *MDR1* (« Multidrug Resistance gene1 »).

- MRP2 (ABCC2) : prend en charge notamment les composés anioniques et des conjugués au glutathion.

- BCRP (« Breast Cancer Resistance Protein »/ABCG2) : assure notamment le transport de médicaments anticancéreux et de statines, mais aussi de composés hormonaux (estrone-3-sulfate).

- BSEP (« Bile Salt Export Pump »/ ABCB11) : elle assure l'efflux de l'hépatocyte vers les canalicules biliaires des acides biliaires et de certaines statines. Son expression est régulée par le récepteur nucléaire FXR (Farnesoid X Receptor).

- MATE1 (« Multidrug And Toxin Extrusion Protein 1 »/SLC47A1) transporteur canaliculaire SLC d'efflux, fonctionnant comme un antiport couplé à un passage de proton, et prenant en charge des composés cationiques souvent aussi transportés par OCT1.

Nom	Nomenclature	Fonction
Basolatéraux		
NTCP	SLC10A1	Transport sodium-dépendant des acides biliaires du sang portal vers les hépatocytes
OATP1A2	SLCO1A2; SLC21A3; OATP; OATP-A; OATPA	Transport sodium-indépendant des acides biliaires, des anions organiques, des stéroïdes conjugués, de certains types de cations et de nombreux médicaments
OATP2B1	SLCO2B1; OATP2B1; OATPB; SLC21A9; OATP-B;	Rôle possible dans le transport des stéroïdes sulfatés
OATP1B1	SLCO1B1; OATP2; OATPC ; SLC21A6;	Transport des acides biliaires conjugués, de la bilirubine, de la bilirubine glucuro- conjuguée, des stéroïdes conjugués et des hormones thyroïdiennes
OATP1B3	SLCO1B3 ; SLC21A8 ; OATP8; OATP-8	Transport des acides biliaires conjugués, des anions organiques et du 17 β - glucuronosyl estradiol
OCT1	SLC22A1	Excrétion de certains types de cations
MRP3	ABCC3	Transport des acides biliaires surtout bivalents et de la bilirubine glucuro- conjuguée
MRP4	ABCC4	Co-transport des acides biliaires avec le glutathion, transport des stéroïdes conjugués et de certains médicaments
MRP6	ABCC6	Rôle possible dans le transport des conjugués au glutathion
OST α/β	SLC51	Transport des acides biliaires conjugués à la taurine et à la glycine
Canaliculaires		
BSEP	ABCB11	Transport ATP-dépendant des acides biliaires monovalents dans la bile; Activation du flux biliaire dépendent des acides biliaires
MRP2	ABCC2	Transport ATP-dépendant des anions organiques (comme la bilirubine diglucuronide) dans la bile et des acides biliaires sulfatés; Contribution au flux biliaire indépendant des acides biliaires
MDR1	ABCB1	Excrétion ATP-dépendante des divers cations organiques, xénobiotiques et des cytotoxines dans la bile
MDR3	ABCB4	Transport ATP-dépendant des phospholipides du feuillet interne vers le feuillet externe de la bicouche membranaire
BCRP	ABCG2	Transport des médicaments. Son rôle dans l'excrétion des acides biliaires n'est pas encore confirmé
MATE 1	SLC47A1	Son rôle dans l'excrétion biliaire n'est pas encore confirmé

Tableau 3: Synthèse des différents transporteurs hépatocytaires. D'après (Trauner, Meier, and Boyer 1998; Halilbasic, Baghdasaryan, and Trauner 2013)

c. Etiologie

Il est habituel de distinguer la cholestase intra-hépatique de la cholestase extra-hépatique

i. Cholestase intra-hépatique

La cholestase est dite intra-hépatique lorsqu'elle résulte d'une diminution de l'excrétion canaliculaire des AB aboutissant à une accumulation des constituants de la bile dans le cytoplasme des hépatocytes. La principale cause est la toxicité médicamenteuse et une septicémie est souvent associée. Ces pathologies hépatiques sont souvent associées à un nombre réduit de conduits biliaires. On retrouve la cirrhose biliaire primitive qui est une maladie chronique d'origine autoimmune, responsable d'une cholestase lente et progressive, touchant les canalicules biliaires, et qui est susceptible de provoquer une insuffisance hépatique terminale. La cholangite sclérosante primitive est également une maladie intra-hépatique cholestatique chronique caractérisée par une inflammation et une fibrose des voies biliaires. Il existe d'autres atteintes qui détruisent les voies biliaires : les réactions médicamenteuses chroniques, le rejet chronique après transplantation de foie, la réaction du greffon ou encore la cholangite septique chronique.

ii. La cholestase extrahépatique

Les obstructions des voies biliaires sont généralement dues à une lithiase biliaire (formation de dépôts (calculs, ou sédiments) dans une partie de l'organisme, un tissu, un conduit ou une cavité), à des sténoses (rétrécissement des conduits) ou des tumeurs. Parmi les tumeurs malignes qui causent une obstruction biliaire, les plus fréquentes sont le cholangiocarcinome et l'adénocarcinome du pancréas.

d. Physiopathologie

L'exposition prolongée des hépatocytes aux acides biliaires, dans le cas d'une cholestase intrahépatique ou extrahépatique, est à l'origine d'une toxicité cellulaire entraînant une nécrose et une apoptose cellulaires impliquant divers mécanismes dont la génération de ROS et un dysfonctionnement mitochondrial (Perez and Briz 2009). A une

concentration physiologique, cet effet toxique est contré par la formation de micelles avec les phospholipides et par leur excréation rapide dans la bile, réduisant l'exposition des membranes plasmiques à ces choléphiles (Trauner, Meier, and Boyer 1998). Cependant, dans un contexte cholestatique et lorsque le flux biliaire est interrompu, les membranes plasmiques sont exposées à des concentrations élevées d'acides biliaires et pour une durée prolongée, subissant alors leurs effets toxiques. Les transporteurs hépatiques ainsi que leur régulation transcriptionnelle, sont capables de gérer cette accumulation d'acides biliaires mais plusieurs facteurs peuvent altérer leur fonctionnement et induire une cholestase comme des mutations, un état inflammatoire, une altération de la polarité cellulaire ou des jonctions serrées, une modification du cytosquelette ou encore de la dynamique des canalicules biliaires (Wagner, Zollner, and Trauner 2009).

i. Maladies cholestatiques héréditaires

Les polymorphismes génétiques et les mutations affectant les gènes des transporteurs hépatobiliaires sont habituellement la cause de l'altération de l'expression et la fonction des protéines codées par ces gènes. Les cholestases dues à des mutations génétiques sont dites « cholestases intra-hépatiques progressives familiales » (PFIC). C'est un groupe hétérogène de maladies autosomiques récessives rares de l'enfant affectant les gènes des transporteurs des ABs. La PFIC-1 correspond à la mutation du gène *ATP8B1* codant pour la protéine FIC1 qui est présente dans les membranes des cholangiocytes, du pancréas et de l'intestin. La mutation de FIC1 correspond à une perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane canaliculaire, ce qui la rend vulnérable aux propriétés détergentes des ABs hydrophobes et entraîne la perte des fonctions de transports des canalicules. Le tableau est caractérisé par une cholestase ictérique à γ GT (gamma-glutamyl-transférase) normales, pouvant évoluer en cirrhose et nécessitant une transplantation hépatique. La PFIC-2 correspond à la mutation du gène *ABCB11* codant pour le transporteur BSEP. Au niveau biologique, les γ GT sont normales. Il peut par la suite y avoir une insuffisance hépatique, mais sans manifestations extra-hépatiques (Bull et al. 1998). La PFIC-3 correspond à la mutation du gène *ABCB4* codant pour le transporteur MDR3. La protéine peut être absente ou faiblement exprimée dans le foie. Par conséquent, les phospholipides ne sont plus sécrétés dans la bile alors que ceux-ci sont essentiels pour la formation des

micelles des ABs et pour la solubilisation du cholestérol. Les AB deviennent toxiques et le cholestérol précipite, entraînant une inflammation et une altération des canalicules biliaires. (G. Zollner et al. 2001; Wagner, Zollner, and Trauner 2009). Enfin, ces mutations du gène *MRP2* sont associées au syndrome de Dubin-Johnson caractérisé par un déficit de l'excrétion biliaire de la bilirubine conjuguée et donc une augmentation de sa concentration sérique sans qu'il y ait une élévation des taux de transaminases (Trauner 1997).

ii. Cholestase acquise

Les troubles cholestatiques peuvent provenir soit de plusieurs mutations génétiques comme vu précédemment, soit de maladies acquises. Les formes acquises de lésions hépatiques cholestatiques comprennent des troubles tels que la cirrhose biliaire primitive, la cholangite sclérosante primitive, la cholestase secondaire à une septicémie, la cholestase induite par l'inflammation, la cholestase induite par un médicament ou encore la cholestase gravidique. Ils sont responsables, entre autres, des principaux effets cliniques en comparaison des conditions héréditaires telles que les défauts dans le métabolisme des acides biliaires ou encore la PFIC (J. Lee and Boyer 2000).

1. Cholestase induite par l'inflammation

La cholestase induite par l'inflammation est une complication fréquente chez les patients atteints d'infections extra-hépatiques ou de processus inflammatoires, de type cholestase associée au sepsis. Les produits microbiens, comme l'endotoxine, activent des voies de signalisation au sein des hépatocytes, soit directement, soit par l'activation de cytokines pro-inflammatoires, notamment le facteur de nécrose tumorale (TNF- α), l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'interleukine-6 (IL-6), et les interférons (Teng and Piquette-Miller 2008), menant à des réductions du flux biliaire. Par exemple, l'administration du lipopolysaccharide (LPS), de TNF α ou d'IL- 1 β inhibe significativement l'expression de *Ntcp* chez le rat et chez la souris (Green, Beier, and Gollan 1996). Ces cascades de signalisation pro-inflammatoires conduisent également à une diminution de l'expression et de l'activité d'un grand nombre de régulateurs de transcription nucléaires, dont beaucoup sont essentiels pour le maintien de l'expression hépatobiliaire des gènes des transporteurs (Kosters and Karpen 2010). Les cytokines pro-inflammatoires, sécrétées par les cellules de

Kupffer mais aussi par les hépatocytes (Luster et al. 1994) sont considérées comme des inhibiteurs de l'expression et de l'activité des récepteurs nucléaires (Geier et al. 2007). L'activation de NFκB par le LPS antagonise l'activité FXR et suggère ainsi un rôle anti-inflammatoire. Ceci a été remarqué dans un modèle murin KO en FXR où son expression a été augmentée en cas de traitement par LPS (Y.-D. Wang et al. 2008; Zhou et al. 2006). Fait intéressant, il a récemment été découvert une relation entre l'activité des récepteurs nucléaires induite par les ABs et les médiateurs nucléaires pro-inflammatoires pouvant fournir de nouveaux moyens de comprendre les processus d'adaptation au sein du foie (Allen, Jaeschke, and Copple 2011).

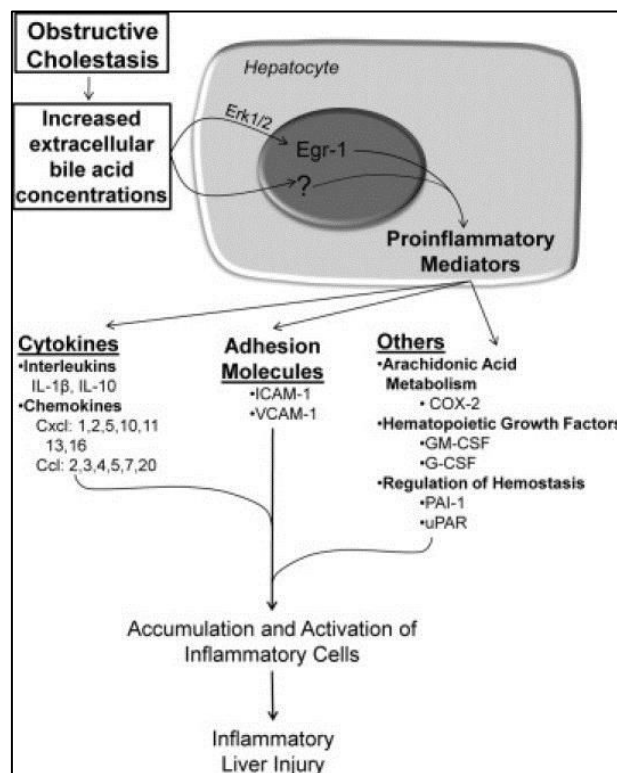


Figure 25 : Mécanisme de la cholestase induite par l'inflammation. D'après (Allen, Jaeschke, and Copple 2011)

2. La cholestase intrahépatique de grossesse

A la fin de la grossesse, certaines femmes présentent des prurits très graves commençant souvent au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds et pouvant devenir généralisés. Les démangeaisons graves et intenses sont dues aux sels biliaries qui

sont déposés dans la peau. Dans ce cas, le débit normal de la bile dans la vésicule biliaire est perturbé par des quantités élevées d'hormones de la grossesse. Ces changements hormonaux induisent en effet des modifications dans l'expression des gènes de transporteurs. Par exemple, l'expression des ARNm et des protéines de OATP2 sont inhibées et une réduction de moitié de l'expression de la protéine de Mrp2 (Cao et al. 2001) est observée dans le foie de rat pendant la grossesse ou suite à une exposition à l'éthinylestradiol (Trauner 1997). Contrairement à Mrp2, l'expression de Bsep reste relativement constante après une administration d'éthinylestradiol chez le rat (W. M. Lee 2003). En particulier, des mutations touchant certains gènes de transporteurs hépatocytaires (*MRD3*, par exemple) semblent être impliquées dans 15 % des cholestases gravidiques (Jacquemin 2001).

3. La cholestase induite par les médicaments

a) Implication du stress oxydant

Des études ont démontré que le stress oxydant est un des mécanismes de cholestase impliqué dans le foie humain. Des études *in vitro* ont prouvé que les acides biliaires sont capables de lyser les hépatocytes par un mécanisme qui dépend des ROS. D'autres études ont toutefois montré que ce mécanisme semble être limité *in vivo* (Copple, Jaeschke, and Klaassen 2010). Le stress oxydant est parmi les diverses hypothèses suggérées, comme étant impliqué dans le mécanisme d'hépatotoxicité notamment par la chlorpromazine (CPZ). Ce pouvoir pro-oxydant peut être dû au fait que la CPZ s'oxyde facilement par les peroxydases générant ainsi un radical pro-oxydant, la chlorpromazine cationique (CPZ^{•+}). Ce dernier réagit avec des nucléophiles pour donner le SO-CPZ ou des dérivés hydroxylés. Ce type de cytotoxicité peut intervenir *in vivo* et contribuer à la cholestase intrahépatique causée par la CPZ. (H. Y. Cheng, Sackett, and McCreery 1978; Anthérieu et al. 2013). Plus récemment sur des prélèvements sanguins de patients atteints de cholestase, les niveaux de ROS (ainsi que les niveaux d'ABs) se sont avérés être de très bons marqueurs de la pathologie (Masubuchi et al. 2015).

b) Cholestase médicamenteuse aggravée par
l'inflammation

Il est intéressant de signaler que la plupart des réactions hépatiques dues aux médicaments présentent une composante inflammatoire et partagent donc des points communs avec la cholestase induite par l'inflammation (Wagner, Zollner, and Trauner 2009). Notre équipe a montré que les cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-1 β), sont capables d'induire un stress inflammatoire ainsi que des caractéristiques cholestatiques dans les cellules HepaRG, et qu'elles sont également capables d'augmenter la cytotoxicité et d'aggraver certaines caractéristiques en combinaison avec la CPZ, molécule idiosyncratique (Bachour-El Azzi et al. 2014).

c) Altération de la dynamique des canalicules, du
cytosquelette et de la polarité cellulaire

En plus des défauts dans l'activité des transporteurs d'ABs, la modification de la polarité cellulaire ou des jonctions serrées canaliculaires, la perturbation du trafic intracellulaire et les modifications du cytosquelette peuvent également représenter des mécanismes importants de cholestase (Wagner, Zollner, and Trauner 2009). Les hépatocytes sont des cellules épithéliales polarisées dont la fonction dépend de leur capacité à distinguer les surfaces apicales des surfaces basolatérales intercellulaires. La surface apicale des hépatocytes est définie comme étant la zone cellulaire générant des canalicules biliaires. La membrane basale des hépatocytes fait face à l'endothélium sinusoidal et participe activement à l'échange d'éléments nutritifs, de toxines, de métabolites et de l'approvisionnement en sang. Des études ont démontré que l'obstruction des voies biliaires pouvait provoquer une inversion du pôle sécrétoire d'ABs dans les hépatocytes de rat (Fricker, Landmann, and Meier 1989). En plus des changements dans la polarité cellulaire, des altérations importantes des différents composants du cytosquelette des hépatocytes ont été notées au cours d'une cholestase. La plupart des troubles hépatiques cholestatiques humains et animaux sont associés à des changements profonds dans le cytosquelette des hépatocytes, y compris la perturbation des microtubules, l'augmentation des filaments intermédiaires et l'accumulation de faisceaux désorganisés de microfilaments d'actine dans le domaine pericanaliculaire (Phillips, Poucell, and Oda 1986). Ceux-ci peuvent interférer

avec les processus de transport transcellulaire des constituants biliaries et altérer la contraction des canalicules biliaries (Trauner, Meier, and Boyer 1998). Ces changements peuvent aussi entraîner une perte des microvillosités apicales et ainsi diminuer la contractilité de la membrane canaliculaire ; ils contribuent à une modification de la perméabilité des jonctions serrées entre les cellules (J. M. Anderson 1996) entraînant une augmentation de la perméabilité paracellulaire, une fuite des constituants biliaries dans le plasma et une réduction des gradients osmotiques dans les canalicules biliaries qui entraînent normalement la sécrétion de la bile (Trauner, Meier, and Boyer 1998). Outre les processus actifs de transport au niveau des membranes plasmiques des canalicules, la formation et la composition finale de la bile canaliculaire dépendent de plusieurs autres mécanismes moins bien définis, comme l'exocytose canaliculaire des vésicules transcytotiques et des vésicules canaliculaires. Leurs perturbations entraînent une rétention des transporteurs canaliculaires sur la surface basolatérale des hépatocytes et un retard dans le transport vésiculaire vers les canalicules biliaries. On trouve également une modification de l'activité de nombreuses nucléotidases et peptidases, des contractions périodiques des canalicules biliaries et diverses activités des transporteurs d'électrolytes et de canaux ioniques hépatocytaires (Phillips, Poucell, and Oda 1986). Enfin, la signalisation calcique à l'intérieur et entre les hépatocytes peut aussi être altérée dans la cholestase, ce qui entraîne une modification dans les contractions des canalicules biliaries (Beuers et al. 1993). Les protéines impliquées dans les jonctions serrées (connexines 32 et 26) disparaissent dans les 24 heures après la ligature du canal cholédoque chez les rats, ce qui se traduit par une diminution des vagues de calcium entre les différents hépatocytes. Cette baisse peut diminuer les contractions ordonnées des canalicules biliaries et altérer le processus de micro- péristaltisme qui facilite le mouvement de la bile du canalicules biliaire vers les voies biliaries (Nathanson and Schlosser 1996).

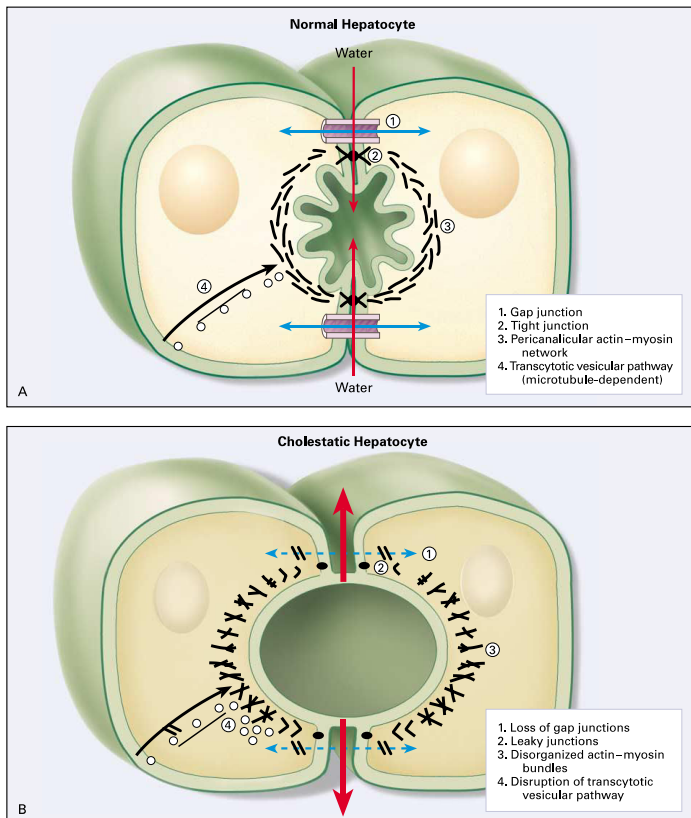


Figure 26 : Modification du cytosquelette des hépatocytes en cas de cholestase. D'après (Trauner 1997)

d) Altération des transporteurs hépatiques

Au niveau clinique, la cholestase provoquée par les médicaments est le plus souvent due, soit à une inhibition du transport des acides biliaires aboutissant à une cholestase intrahépatique, soit à une ductopénie (vanishing bile duct syndrome) pouvant progresser vers une cirrhose biliaire. L'altération des transporteurs d'acides biliaires représente la cause la plus fréquente. L'inhibition de l'efflux canaliculaire de la bile par un médicament peut avoir lieu directement par une inhibition cis (CsA, rifampicine ou glibenclamide) ou indirectement par une inhibition trans (estradiol- 17 β -glucuronide) du transporteur BSEP (Stieger et al. 2000) et/ou via une inhibition de MRP2 (fusidate) (Bode et al. 2002). Les altérations de l'expression des gènes observées également au cours d'une cholestase peuvent être classées en pro-cholestatiques considérées comme des facteurs contributeurs et/ou aggravant de la pathologie et en anti-cholestatiques représentant des mécanismes de compensation, de défense et de protection vis à vis des complications cholestatiques (Zollner and Trauner, 2008, Wagner et al., 2009).

a. BSEP

En plus des ABs toxiques qui sont les substrats physiologiques majeurs de BSEP, ce transporteur canaliculaire est capable de transporter certains médicaments comme par exemple la pravastatine (Hirano et al. 2005). Beaucoup de xénobiotiques ont été reconnus comme étant des inhibiteurs de l'activité de BSEP. Un exemple de cette toxicité est la troglitazone, retirée du marché : le métabolite de phase II de la troglitazone, la troglitazone sulfate, est excrété par le foie via le transporteur MRP2. Si MRP2 n'est plus capable d'éliminer le métabolite, il s'accumule dans le foie où il peut atteindre des concentrations capables d'inhiber BSEP et d'engendrer l'hépatotoxicité qui en résulte (Funk et al. 2001; Kostrubsky 2005). Le bosentan un anti-hypertenseur pulmonaire, inhibe également le transport de l'acide taurocholique dans des vésicules membranaires exprimant BSEP (Fattinger et al. 2001; Funk et al. 2001). L'expression des transcrits de BSEP est également inhibée par de nombreux composés (troglitazone, glimepiride,...) (Garzel et al. 2014).

b. NTCP

NTCP représente l'influx d'environ 80% des ABs allant du sang vers les hépatocytes et transporte les ABs conjugués et non-conjugués. L'obstruction biliaire chez les rongeurs entraîne des changements importants dans l'expression de ce transporteur. Le transporteur NTCP qui extrait la plus grande partie des acides biliaires est très souvent inhibé (activité ou expression) pour empêcher l'absorption des acides biliaires dans les hépatocytes (Van Mil et al. 2007). Il a même été démontré que l'accumulation des ABs entraîne une activation du récepteur FXR qui lui-même induit SHP-1 entraînant une répression de NTCP (Denson et al. 2001). Par exemple, la troglitazone et le bosentan altèrent l'absorption de taurocholate par inhibition de NTCP, ce qui représente un mécanisme compensatoire à l'inhibition de BSEP (Kemp, Zamek-Gliszczynski, and Brouwer 2005).

c. OATP

Les transporteurs de type OATPs impliqués dans le transport des anions et cations organiques principalement sont également impliqués dans l'absorption des sels biliaires et xénobiotiques par l'hépatocyte. De nombreux composés se sont révélés être des inhibiteurs des isoformes d'OATPs ; toutefois, l'effet de l'inhibition sur l'homéostasie des acides biliaires reste non élucidé (Cattori et al. 2001; Arrese and Trauner 2003). (Alexander Treiber et al.

2004) ont rapporté que la digoxine, la quinidine, et la cholécystokinine, inhibiteurs des trois principaux isoformes d'OATP chez le rongeur ont altéré l'absorption du bosentan dans les hépatocytes de rats, ce qui suggère que le bosentan, en tant que substrat d'OATP, peut rivaliser avec les acides biliaires dans l'absorption hépatique médiée par OATP. Toutefois, étant donnée la contribution mineure d'OATP dans l'absorption hépatique des acides biliaires, une inhibition compétitive des OATPs seules ne devrait pas affecter de manière significative l'homéostasie globale des ABs (Kemp, Zamek-Gliszczyński, and Brouwer 2005). Même si NTCP est responsable majoritairement de l'absorption de l'acide taurocholique dans les hépatocytes de rat en culture (conformation sandwich), la quantité de taurocholate absorbée par OATP ne peut être négligée (Xingrong Liu et al., n.d.). L'élévation du niveau d'acides biliaires intra-hépatique et systémique dans des conditions cholestatiques orchestre une réponse adaptative, qui est principalement coordonnée par une interaction complexe entre acides biliaires et récepteurs nucléaires activés par la bilirubine (principalement FXR, PXR et CAR), dans le but de contrer l'effet cholestatique. À la suite de ce programme transcriptionnel, les systèmes d'absorption basolatéraux des acides biliaires sont nettement réduits (NTCP, OATPs), alors que les pompes basolatérales exportatrices d'acides biliaires sont augmentées simultanément (MRP3, MRP4), ce qui est considéré comme un mécanisme de défense majeur hépatocellulaire pour contrecarrer la toxicité des ABs intracellulaires (Gernot Zollner and Trauner 2008). Keitel et al., ont également montré qu'au cours d'une cholestase hépatique, l'influx dépendant et non dépendant de sodium est inhibé suite à une réduction de l'expression de NTCP et de OATP1B1 chez l'Homme (Keitel et al. 2005).

d. MRP2

Il est principalement chargé de transporter les acides biliaires bivalents comme ceux qui sont conjugués aux sulfates, à l'acide glucuronique, et au glutathion réduit (Gernot Zollner and Trauner 2008) ainsi que d'autres composés amphiphatiques conjugués au glutathion alors que les acides biliaires monovalents ne sont pas des substrats de ce transporteur (Keppler and König 2000). (Kostrubsky 2005) ont rapporté que MRP2 était le transporteur majeur de l'excrétion des métabolites de la troglitazone (dont le sulfate de troglitazone, métabolite toxique) chez le rat. De même, (Fouassier et al. 2002) ont étudié l'effet cholestatique du bosentan qui peut être associé à des altérations de la formation de la bile canaliculaire par modulation de MRP2. Par contre, la régulation de l'expression de MRP2

par les acides biliaires est plus compliquée et fait appel à plusieurs autres récepteurs nucléaires comme PXR et CAR dont les ligands possèdent également un effet inducteur de Mrp2 dans les hépatocytes de rat et de souris (Kast et al. 2002).

e. MRP3-4

MRP3 et MRP4 sont les transporteurs basolatéraux les plus connus en plus du transporteur OST α /OST β . MRP4 (ABCC4) transporte principalement les dérivés sulfatés et se charge du cotransport des acides biliaires avec le glutathion alors que MRP3 (ABCC3) prend en charge les dérivés glucuronidés, les acides biliaires bivalents, ainsi que le glutathion, permettant ainsi l'évacuation des acides biliaires dans la circulation sanguine afin qu'ils soient éliminés dans l'urine (Keppler and König 2000; Soroka et al. 2010). Alors que dans des conditions physiologiques normales, les acides biliaires sont excrétés dans la bile, leur excrétion dans la circulation systémique constitue une voie alternative en cas de cholestase. Les transporteurs basolatéraux (MRP3, MRP4 et OST α /OST β) qui sont normalement faiblement exprimés, se trouvent fortement induits chez les rongeurs après une alimentation riche en acides biliaires et chez l'homme en cas de maladies cholestatiques (Donner and Keppler 2001; Soroka et al. 2010; G. Zollner et al. 2001). En effet, une induction de l'expression de la protéine MRP3 et une augmentation de sa localisation au pôle basolatéral ont été notées sur les foies des patients souffrant d'une cirrhose biliaire primitive (Gernot Zollner et al. 2003). De même, chez les patients souffrant de PFIC, l'expression des ARNm et de la protéine MRP4 est significativement induite (Keitel et al. 2005). Des recherches récentes ont aussi montré que le bosentan a le potentiel d'inhiber MRP4 (Morgan et al. 2013). Le mécanisme d'induction de MRP3 et MRP4 dans la cholestase obstructive n'a pas encore été complètement élucidé. PXR et CAR, récepteurs nucléaires pouvant être activés par une accumulation de choléphiles ou encore le facteur de transcription Nrf2, un régulateur commun de l'expression des transporteurs basolatéraux MRP2 et MRP3, peuvent être impliqués (Maher et al. 2007).

e. Diagnostic

i. Clinique

Les syndromes de la cholestase sont variables : au niveau clinique, on observe un prurit dû à l'accumulation d'AB en sous cutané, ainsi qu'un ictère à urines foncées, une stéatorrhée due à l'incapacité de l'organisme à assimiler les graisses sans l'action des ABs et une asthénie avec parfois des fièvres, des douleurs abdominales, des frissons et des signes d'hypersensibilité. A plus long terme, on voit apparaître des signes de carences en vitamines A, D, E et K, un amaigrissement, une pigmentation cutanée ainsi qu'une évolution en cirrhose biliaire secondaire. Les symptômes sont le plus souvent réversibles en deux semaines à 3 mois.

ii. Biologique

Au niveau biologique, les phosphatases alcalines (non exclusivement hépatiques) sont augmentées jusqu'à 1,5 fois la normale. Leur augmentation est progressive et leur diminution lors de la guérison est lente (Valla et al. 2013). Les γ GT sont supérieures à 3 fois la normale, en l'absence d'élévation importante des transaminases. L'augmentation des γ GT est non spécifique et peut se retrouver dans l'éthylisme chronique ou dans le syndrome métabolique. Il s'agit cependant du test le plus sensible de cholestase (mais il existe également des cholestases à γ GT normales). La 5'-nucléotidase est une forme circulante d'origine hépatique (membrane plasmique hépatocytaire, effet détergent des acides biliaires). Elle est plus spécifique mais moins sensible que les PAL. Lors de la cholestase, la bilirubine conjuguée est également augmentée et est très utilisée comme biomarqueur. Au niveau hépatique, les mécanismes de conjugaison ne sont généralement pas affectés, mais elle n'est plus déversée dans la bile et est refoulée dans le sang. Lorsque la concentration en bilirubine conjuguée dépasse 40 $\mu\text{mol/mL}$, il se forme une coloration de la peau et des téguments en jaune : syndrome ictérique. Les urines deviennent également foncées. Cependant, la cholestase peut être anictérique dans le cas où le métabolisme de la bilirubine n'est pas touché (Valla et al. 2013). Les ALAT, la PAL ainsi que la bilirubine totale sont dosées en routine. Ces marqueurs permettent d'apprécier l'état général du foie, mais ils demeurent peu sensibles et spécifiques. On retrouve enfin une hyper-cholestérolémie.

Type de lésion hépatique	Rapport $\left(\frac{ALT}{LSN}\right) / \left(\frac{PA}{LSN}\right)$
Hépatocellulaire	> 5
Cholestatique	< 2
Mixte	2 - 5

Le type de lésion hépatique induite par une molécule hépatotoxique est classé selon l'élévation relative des taux d'alanine aminotransférase (ALT) et de phosphatase alcaline (PA). Les lésions hépatiques peuvent être i) hépatocellulaires avec l'élévation des ALT > 2 x la limite supérieure à la normale (LSN) et un rapport $(ALT/LSN)/(PA/LSN) > 5$, ii) cholestatiques avec une augmentation PA > 2 x ULN ou un ratio $(ALT/LSN)/(PA/LSN) < 2$, ou iii) mixtes avec une élévation des ALT > 2 x LSN et PA > 2 x LSN avec un rapport $(ALT/LSN)/(PA/LSN)$ entre 2 et 5.

Tableau 4 : Classification des lésions hépatiques (Benichou et al. 1990)

f. Méthode de détection de la cholestase

Bien que rare, la cholestase induite par les médicaments est un sujet important qui intéresse les industries pharmaceutiques ainsi que les centres de recherche. L'idiosyncrasie de la cholestase en fait une pathologie impossible à prévoir chez l'homme mais pouvant être anticipée avec des modèles *in vitro*. Largement utilisée, la modulation des transporteurs (BSEP principalement) est la méthode de référence actuelle. Cependant, avec les modèles cellulaires présentant des caractéristiques fonctionnelles hépatocytaires, de nouvelles méthodes sont en cours de développement et seront largement décrites tout au long de ce manuscrit.

i. Modulation des transporteurs (BSEP et autres)

Beaucoup de médicaments ont montré leur potentiel à inhiber l'activité du transporteur canaliculaire BSEP, et cette inhibition est maintenant considérée comme étant un des principaux mécanismes par lequel les iDILI peuvent être initiées chez les patients. Plusieurs instances réglementaires ont reconnu l'importance de ce transporteur. L'European Medicines Agency et le International Transporter Consortium ont recommandé qu'elles soient étudiées en cas de doute dans les études sur l'animal ou même à postériori après les études cliniques. L'inhibition de BSEP est un facteur de risque chez certaines personnes, capable d'initier des lésions cholestatiques de type idiosyncratique (Kenna 2014). Ainsi, on peut différencier les modèles acellulaires des modèles cellulaires. L'étude d'autres

transporteurs (moins utilisés) comme MRP2, NTCP ou OATP est également un moyen de détection de la cholestase, mais ces modèles moins décrits ne sont pas encore validés par les instances réglementaires.

3. Modèles acellulaires

On retrouve dans ces modèles, les vésicules membranaires plasmiques de foie qui correspondent à des membranes inversées exprimant BSEP à leur surface. On peut citer également des vésicules membranaires de lignées cellulaires d'insecte transfectées (comme par exemple les lignées Sf9, dérivées de l'insecte *Spodoptera frugiperda*), qui expriment un seul transporteur (par exemple BSEP). Ces modèles permettent de démontrer un effet direct de la molécule sur le transporteur.

4. Modèles cellulaires

Les modèles cellulaires permettent une étude de la cholestase en prenant en compte l'intégralité de la cellule ou encore la fonctionnalité du canalicule biliaire et le métabolisme du composé. On retrouve des lignées cellulaires polarisées transfectées, des hépatocytes isolés en culture (souvent en conformation sandwich), ou encore des lignées cellulaires exprimant BSEP ou un autre transporteur d'intérêt, ou des fonctions proches des hépatocytes primaires (cellules HepaRG).

ii. Etude des fonctions biliaires et de l'activité globale

Hormis le transporteur BSEP qui a été largement utilisé dans la détection de la cholestase sur les modèles cellulaires ou acellulaires, les acides biliaires et la bilirubine représentent également de bons biomarqueurs de cholestase *in vivo* (J. Chen et al. 2013). En effet, la fonctionnalité des canalicules biliaires a permis depuis quelques années d'étudier de façon plus précise la cholestase en utilisant des modèles de foie perfusé isolé ou de canaux biliaires *in vivo*. De façon plus historique, les hépatocytes de rat isolés en couplets ont été utilisés à la fin des années 80 dans l'étude de la sécrétion biliaire et de la cholestase (Graf, Gautam, and Boyer 1984; Thibault, Claude, and Ballet 1992). En 2014, une équipe a tenté de mettre en place une méthode sur des hépatocytes humains en conformation sandwich. Elle

consistait à évaluer le potentiel d'une molécule à altérer l'homéostasie des ABs en se basant sur la capacité à réduire la formation de l'urée (Chatterjee et al. 2014), mais cette méthode ne semble pas être d'une grande prédiction dans la cholestase mais plutôt être un test fonctionnel cellulaire.

iii. Autres méthodes de détection de la cholestase

Ces dernières années, des données ont suggéré que le miR- 122 sérique, un micro ARN circulant possédait un fort potentiel comme biomarqueur spécifique et non invasif pour le diagnostic des lésions hépatiques induites par la cholestase mais aussi comme un bon biomarqueur d'hépatotoxicité seule (par exemple induite par l'alcool) (Shifeng et al. 2013). Les méthodes *in silico* sont plus rares dans l'étude de la cholestase. Cependant une étude récente a réussi à démontrer, à développer et à valider un modèle de pharmacophore qui décrit les caractéristiques moléculaires trouvées dans les inhibiteurs de BSEP. Ce modèle peut être utilisé comme un outil de dépistage *in silico* dans l'identification de médicaments potentiellement cholestatiques (Greupink et al. 2012).

METHODE	PRINCIPE	AVANTAGES	LIMITES
VESICULES MEMBRANAIRES PLASMATIQUES DE FOIE	Membrane inversée exprimant BSEP à leur surface.	-Données reproductibles et robustes -Présence de BSEP mais également d'autres transporteurs -Quantification directe de l'effet des composés -Données générées rapidement	-Préparation des vésicules -Coût -Besoin d'un substrat bien caractérisé -Pas de capacité métabolique
VESICULES MEMBRANAIRES TRANSFECTEES DE LIGNEES CELLULAIRES D'INSECTE	Même principe	-Disponibles dans le commerce -Robuste, rapide et reproductible -Quantification directe -Données générées rapidement -Permet l'étude d'un seul transporteur sans être gêné par les autres	- Pas de capacité métabolique - Seul BSEP est exprimé
LIGNEES CELLULAIRES POLARISEES TRANSFECTES	Cellules épithéliales transfectées capables d'exprimer BSEP	-Permet l'accumulation intracellulaire de substrats -Plusieurs transporteurs peuvent être exprimés	- Difficulté technique - Coût et manque de rapidité - Plusieurs jours pour générer les données -Les substrats doivent être bien caractérisés -Peu de capacité de biotransformation
HEPATOCYTES ISOLES EN CULTURE (SANDWICH)	Rapidement isolés à partir de foie humain	-Permet d'avoir les transporteurs d'influx et d'efflux - Bien pour étudier les mécanismes complexes de l'excrétion biliaire -Permet de calculer un indice d'excrétion biliaire	-Niveau technique et coût -Expression des transporteurs différents. -Plusieurs jours pour générer les données -Besoin de substrats bien caractérisés -Capacité de biotransformation limitée dus à la régulation de différentes enzymes du métabolisme
LIGNES CELLULAIRES	Les lignées cellulaires d'origine tumorale	-Permet d'avoir les transporteurs d'influx et d'efflux -Bien pour étudier les mécanismes complexes de l'excrétion biliaire -Permet de calculer un indice d'excrétion biliaire	-Expression des transporteurs différents -Cellules transformées -Originaire d'un seul donneur
FOIE PERFUSE ISOLE		-Modèle ex-vivo qui reproduit les effets <i>in vivo</i> -Données quantitatives sur le flux biliaire et la composition biliaire -Etude possible des métabolites	-Technique et coût -Non rapide -Non utilisable chez l'homme
CANAUX BILIAIRES IN VIVO	Etude directe des canaux biliaires chez l'animal	-Modèle <i>in vivo</i> -Données quantitatives sur le flux biliaire et la composition biliaire -Etude possible des métabolites	-Technique et coût -Procédure chirurgicale invasive -Non utilisable chez l'homme -Circulation entéro-hépatique altérée
ACIDES BILIAIRES PLASMATIQUES IN VIVO	Dosage analytique par prise de sang	-Permet d'avoir les effets indirects des composés à tester -Non invasif -Peut être incluse dans les études non cliniques de toxicité	-Méthode lente -Non spécifique de BSEP

Tableau 5 : Modèles in vitro d'étude de la cholestase. D'après (Kenna 2014)

V. Bosentan et autres ERAs

a. La famille des Antagonistes des récepteurs à l'endothéline (ERA)

i. Endothéline et récepteurs

Ce n'est qu'en 1988 que (Yanagisawa et al. 1988) ont décrit la structure en acides aminés d'un puissant vasoconstricteur libéré par l'endothélium qu'ils ont nommé endothéline (ET). Il s'agit d'un peptide de 21 acides aminés qui possède trois isoformes, nommés ET-1, ET-2, ET-3. Elles sont synthétisées sous la forme de trois précurseurs beaucoup plus gros : les préendothélines 1,2 et 3 (polypeptides d'environ 200 acides aminés).

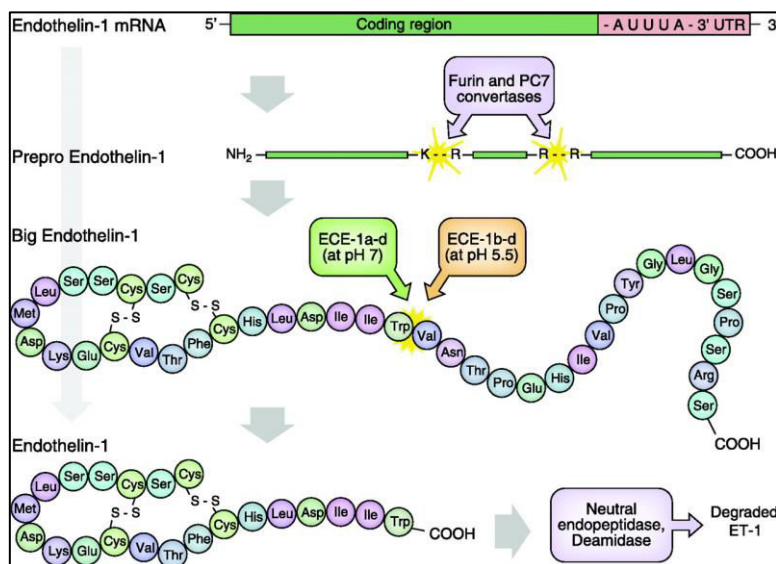


Figure 27 : Synthèse de l'endothéline. D'après (Kohan et al. 2011)

Les récepteurs à l'endothéline sont au nombre de trois : les récepteurs A, B et C. Le récepteur A conduit généralement à une vasoconstriction tandis que le récepteur B va conduire à une vasodilatation indirecte par libération de monoxyde d'azote et de prostaglandine. ET_B est généralement classé en 2 sous-unités nommées ET_{B1} et ET_{B2} , qui résultent d'un épissage alternatif (Frommer and Müller-Ladner 2008). Enfin le récepteur C conduit à une inhibition de la sécrétion de prolactine au niveau de l'hypophyse. La liaison de l'endothéline à ses récepteurs active une protéine G couplée à la phospholipase C qui

conduit à l'hydrolyse des phospholipides membranaires, donnant ainsi naissance à l'inositol triphosphate d'une part, et au 1-2 diacylglycérol d'autre part. Ces deux messagers intracellulaires entraînent une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium responsable de la contraction du muscle lisse vasculaire (Huggins, Pelton, and Miller 1993).

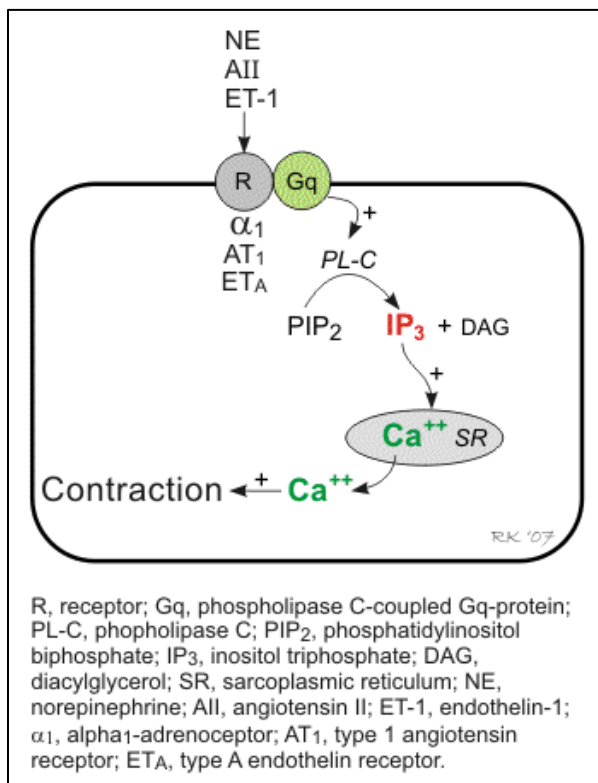


Figure 28 : Voie d'activation calcique du récepteur A à l'endothéline. D'après Klabunde et al. 2014.

De plus, l'ET peut induire une vasodilatation en se liant au récepteur B et en activant la libération de NO (oxyde nitrique) et/ou du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, EDHF), aussi bien au niveau de la circulation pulmonaire (Zellers, McCormick, and Wu 1994) que dans d'autres territoires vasculaires.

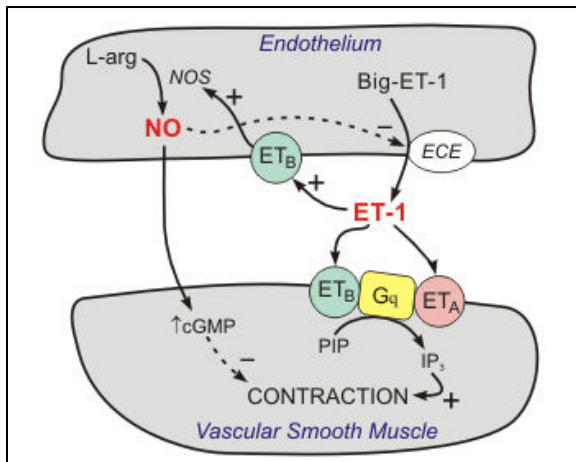


Figure 29 : Voie d'activation de la NO par activation du récepteur ET_B. D'après (Zellers, McCormick, and Wu 1994)

La répartition des récepteurs des cellules endothéliales et des muscles lisses permet d'expliquer le phénomène de vasodilatation transitoire induite par l'ET (activation initiale de l'ET_B) et de l'hypotension, suivi par une vasoconstriction prolongée et une hypertension (activation de ET_A et ET_B musculaires). Les effets directs de l'ET-1 sur le cœur sont modifiés par des réflexes de barorécepteurs en réponse aux changements de pression artérielle après administration systémique de l'ET-1 (Seo et al. 1994). L'endothéline a été impliquée dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) lors de sa liaison aux deux récepteurs ET_A et ET_B (Dupuis and Hoeper 2008). En effet (Giaid et al. 1993) ont mis en évidence une augmentation de l'expression de l'ET1 dans les cellules endothéliales vasculaires et dans les concentrations plasmatiques de patients atteints d'hypertension pulmonaire. Avec la reconnaissance de son rôle important dans les maladies vasculaires cardiovasculaires et pulmonaires, l'attention a été portée vers l'application thérapeutique des agents qui inhibent ce système.

ii. Propriétés pharmacologiques

Actuellement, trois stratégies peuvent être utilisées : inhibition des enzymes de conversion de l'endothéline (ECE), antagonisme dual des récepteurs à l'endothéline (ET_A et ET_B), et antagonisme sélectif de l'ET_A.

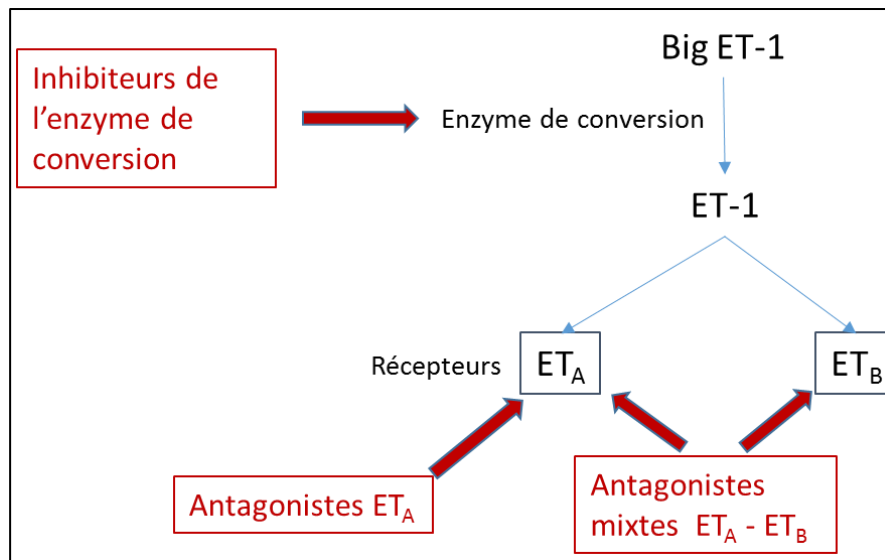


Figure 30 : Stratégie thérapeutiques de l'HTAP

Le développement thérapeutique des antagonistes des récepteurs à l'endothéline a précédé celui des inhibiteurs de l'ECE. De façon générale, les substances les plus utilisées sont des antagonistes sélectifs des récepteurs ET_A, ou des antagonistes mixtes ET_A-ET_B, bien que quelques antagonistes sélectifs ET_B aient été développés récemment. En 1992, quatre ans seulement après la découverte de l'ET-1, un premier antagoniste des récepteurs de l'ET-1 a été synthétisé. Des dizaines d'expériences sur des modèles animaux ont suivi, avec des résultats très encourageants.

- **Antagonistes ET_A**

Il s'agit des premiers antagonistes peptidiques spécifiques développés. Spécifique du récepteur A, le BQ-123 développé chez le rat ou encore le FR 139317 développé chez le cochon d'inde ont été décrits dans de nombreuses études (Cardell, Uddman, and Edvinsson 1993; Eguchi et al. 1992).

- **Antagonistes ET_B**

Plusieurs antagonistes ET_B ont été décrits, en particulier des antagonistes peptidiques, comme le BQ-788, mais aussi un antagoniste ET_B non peptidique, le Ro 46-8443, qui provoque une baisse de pression artérielle chez le rat normotendu, et une augmentation de cette pression chez le rat hypertendu (M. Clozel and Breu 1996).

- **Antagonistes mixtes ET_A/ET_B**

Il s'agit d'un progrès important dans le développement thérapeutique de cette famille thérapeutique. Actifs par voie orale, on peut citer le Ro 46-2005 ou le bosentan (M. Clozel and Breu 1996).

b. Le Bosentan

i. Introduction

La découverte de l'ET- 1 en 1988, a conduit au développement des ERA basé sur la classe des sulfamides pyrimidiques, dont la molécule Ro 46-2005, un antagoniste des récepteurs ET_A et ET_B (Martine Clozel et al. 1993). Afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, une optimisation structurelle a été réalisée conduisant à une nouvelle molécule en 1991: Ro 47-0203, le bosentan (M. Clozel et al. 1994). Commercialisé sous le nom de Tracleer® par les laboratoires Actelion (Suisse) dans un peu plus de 60 pays, le bosentan a été mis sur le marché aux USA en, 2001, dans l'UE en 2002 et au Japon en 2005.

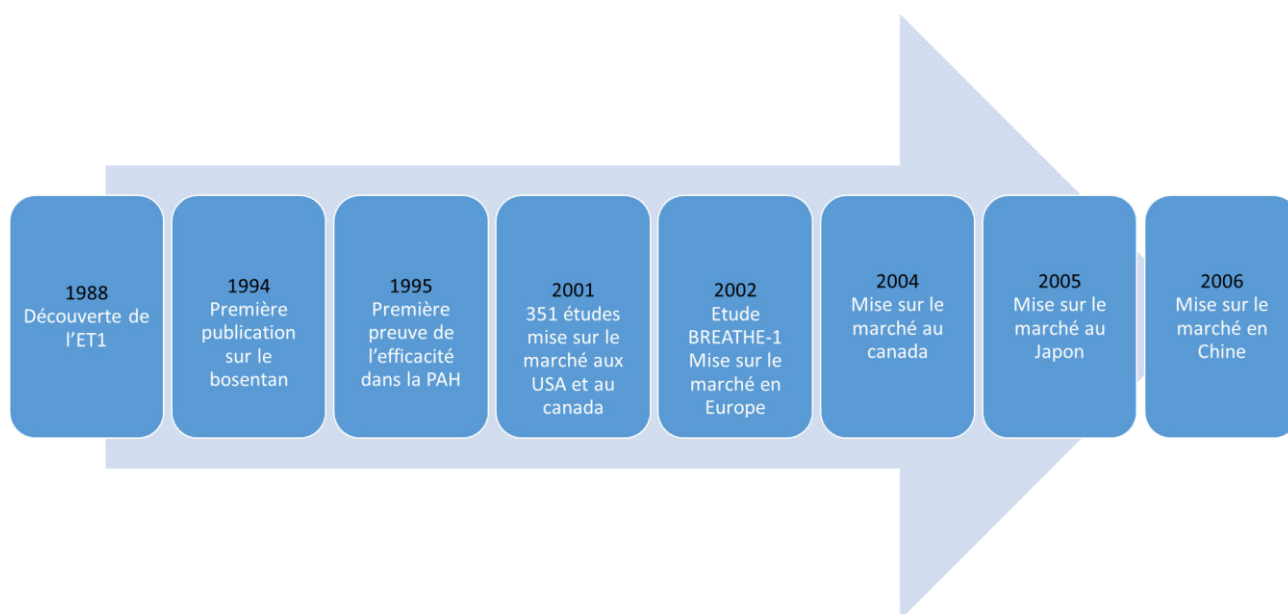


Figure 31 : Chronologie du développement et de la mise sur le marché du bosentan. D'après Actélon

ii. Mécanisme d'action

Le bosentan est un antagoniste mixte des récepteurs de l'endothéline (ERA) qui présente une affinité pour les deux récepteurs ET_A et ET_B avec une affinité légèrement plus élevée pour le récepteur A. Il diminue les résistances vasculaires pulmonaires et systémiques, et augmente ainsi le débit cardiaque sans accélérer la fréquence cardiaque (M. Clozel et al. 1994). En l'absence d'antagoniste des récepteurs de l'endothéline, les concentrations d'ET-1 sont fortement corrélées à la sévérité et au pronostic de l'hypertension artérielle pulmonaire et de l'insuffisance cardiaque.

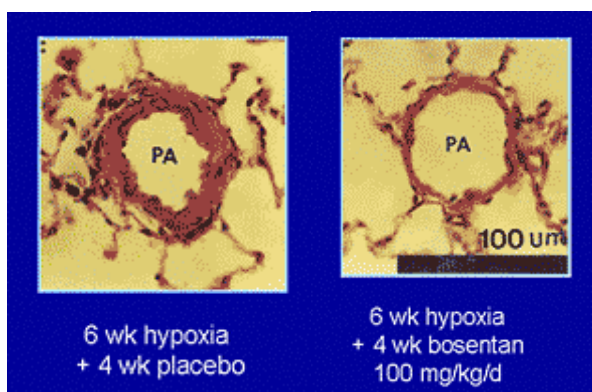


Figure 32 : Modèle de rat hypertendu. D'après (S. J. Chen et al. 1995)

iii. Données cliniques

1. Indications thérapeutiques

Aux USA, le bosentan est indiqué pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire (Groupe I de l'OMS) chez les patients présentant des symptômes de classe OMS II à IV, afin d'améliorer la capacité d'exercice et de diminuer le taux d'aggravation clinique. En Europe, le Tracleer a été approuvé pour le traitement de l'HTAP de classe fonctionnelle III pour améliorer la capacité d'exercice et les symptômes liés à la pathologie, ainsi que pour l'HTAP de classe II, où il a également montré quelques améliorations. Dans l'UE, Tracleer est également indiqué depuis 2007 pour réduire le nombre de nouveaux ulcères digitaux chez les patients atteints de sclérose systémique et d'ulcères digitaux persistants.

2. Posologie et mode d'administration

Le bosentan se présente sous forme de comprimés à prendre par voie orale le matin et le soir avec de l'eau pendant ou en dehors du repas. La dose utilisée pour une initiation de traitement est souvent de 62,5 mg deux fois par jour pendant 4 semaines. La dose est ensuite augmentée pour une posologie d'entretien de 125mg deux fois par jour. Si l'arrêt de Tracleer est envisagé, cet arrêt devra être progressif, parallèlement à l'initiation d'un nouveau traitement.

3. Contre-indication, mise en garde, précaution d'emploi et interactions médicamenteuses

Le bosentan est contre-indiqué en cas :

- Insuffisance hépatique modérée à sévère
- Taux sériques des aminotransférases hépatiques, supérieurs à 3 fois la limite supérieure de la normale avant la mise en route du traitement
- Association à la cyclosporine A

Concernant les fonctions hépatiques, des anomalies du bilan hépatique apparaissent généralement au cours des 26 premières semaines de traitement. Il s'agit de l'augmentation des taux sériques d'aminotransférases hépatiques, aspartate et alanine aminotransférases (ASAT et/ou ALAT). Il est expliqué dans les RCP (résumé des caractéristiques du produit) que cette augmentation de l'activité sérique des transaminases pourrait être en partie liée à une inhibition compétitive de l'élimination des sels biliaires par les hépatocytes. Par ailleurs il est également dit que « d'autres mécanismes qui n'ont pas encore été clairement déterminés, pourraient également être impliqués quand apparaît une perturbation des fonctions hépatiques. ». Ainsi, les aminotransférases hépatiques sériques seront dosées avant le début du traitement puis tous les mois pendant toute la durée du traitement par le bosentan. De plus, un dosage sérique des aminotransférases hépatiques doit être réalisé 2 semaines après toute augmentation de posologie (résumé des caractéristiques du produit, TRACLEER[®] bosentan. date d'approbation/Révision : août 2006 .V06). Le bosentan est un inducteur des isoenzymes du cytochrome P450, CYP2C9 et CYP3A4. Les données *in vitro* suggèrent également une induction du CYP2C19. Les concentrations plasmatiques des substances métabolisées par ces isoenzymes peuvent être diminuées quand le bosentan est associé. Il

est également métabolisé par les isoenzymes CYP2C9 et CYP3A4. L'inhibition de ces isoenzymes peut augmenter la concentration plasmatique du bosentan (Dingemans et al. 2014). L'association de cyclosporine A (inhibiteur de la calcineurine) et du bosentan est contre-indiquée puisque cette association a révélé des taux plasmatiques résiduels de bosentan environ 30 fois supérieurs à ceux mesurés après administration du bosentan seul. A l'état d'équilibre, ces taux étaient 3 à 4 fois supérieurs à ceux mesurés avec le bosentan administré seul. Cette interaction s'explique très probablement par une inhibition des protéines de transport du bosentan dans les hépatocytes par la cyclosporine. Par ailleurs, les concentrations plasmatiques de cyclosporine A (un substrat du CYP3A4) étaient diminuées d'environ 50%, observation très probablement liée à l'effet inducteur par le bosentan du CYP3A4 (A. Treiber et al. 2007; Jemnitz et al. 2012).

4. Effets indésirables

Les résultats des études cliniques, y compris de deux études pivots randomisées, l'étude 351 et l'étude BREATHE-1, ont démontré l'efficacité du bosentan dans le traitement des patients atteints d'HTAP idiopathique ou HTAP secondaire à des maladies du tissu conjonctif telles que la sclérodermie (Channick et al. 2001; Barst et al. 2003). Dans une analyse groupée de 100 patients atteints d'HTAP inclus dans les études pédiatriques non-contrôlées FUTURE 1/2 et FUTURE 3/Extension, des élévations des aminotransférases hépatiques supérieures à trois fois la normale ont été observées chez 2% des patients. FUTURE-4, une étude randomisée et contrôlée par placebo, a étudié la pharmacocinétique, l'innocuité et l'efficacité du bosentan en thérapie adjuvante à l'inhalation d'oxyde nitrique (NO) dans le traitement de l'hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né. La pharmacocinétique, la sécurité et la tolérance du bosentan oral ont également été étudiées chez des volontaires sains de sexe masculin. Le médicament a été très bien toléré, ne montrant aucun effet sur la fréquence du pouls, l'électrocardiogramme ou d'autres tests de laboratoire cliniques (Weber et al. 1999). Cependant, l'effet indésirable le plus fréquent est une hépatotoxicité qui résulte de l'inhibition d'une pompe d'exportation d'acides biliaires par le bosentan et ses métabolites (Roberts and Preston 2009). Les effets indésirables sont définis comme des événements se produisant chez au moins 1% des patients traités par le bosentan et à une fréquence d'au moins 0,5 % supérieure à celle observée sous placebo. Les effets indésirables les plus fréquents sont des céphalées (11,5%), des oedèmes/rétentions

hydrosodées (13,2 %), des anomalies des tests de la fonction hépatique (10,9 %) et une anémie/diminution de l'hémoglobine (9,9 %).

Classe organe/événement indésirable	Placebo		Tracleer (toutes les posologies)	
	N = 80 N°.	%	N = 165 N°.	%
Troubles respiratoires, thoraciques et médiastinaux				
Infection respiratoire haute	9	11 %	20	12 %
Rhinopharyngite	6	8 %	18	11 %
Pneumonie	1	1 %	5	3 %
Troubles cardiaques				
Œdèmes des membres inférieurs	4	5 %	13	8 %
Palpitations	1	1 %	8	5 %
Œdèmes	2	3 %	7	4 %
Troubles gastro-intestinaux				
Dyspepsie		–	7	4 %
Sécheresse buccale	1	1 %	5	3 %
Troubles du système nerveux				
Céphalées	16	20 %	36	22 %
Troubles d'origine vasculaire				
Bouffées de chaleur	4	5 %	15	9 %
Hypotension	3	4 %	11	7 %
Atteintes cutanées				
Prurit		–	6	4 %
Troubles généraux et au site d'administration				
Asthénie	1	1 %	6	4 %
Troubles hépato-biliaires				
Anomalies de la fonction hépatique	2	3 %	14	8 %

Tableau 6 : Effets indésirables du bosentan. D'après les RCP

iv. Propriétés pharmacologiques

1. Pharmacodynamie

Le bosentan agit par compétition avec la liaison d'ET-1 à la fois sur les récepteurs ET_A et ET_B avec une affinité légèrement plus élevée pour les récepteurs ET_A ($K_i = 4,1-43$ nanomolaires) que pour les récepteurs ET_B ($K_i = 38-730$ nanomolaires).

2. Pharmacocinétique

La pharmacocinétique du bosentan est dose et temps-dépendante. La clairance et le volume de distribution diminuent avec les doses intraveineuses croissantes et augmentent en fonction du temps. Après administration par voie orale, l'exposition systémique est proportionnelle à la dose jusqu'à 500 mg. A des doses supérieures par voie orale, la C_{max} (concentration plasmatique) et le SSC (surfaces sous la courbe) augmentent

proportionnellement moins vite que la dose. Au niveau de l'absorption, la biodisponibilité du bosentan est d'environ 50% et ne semble pas être modifiée par la prise de nourriture. Les concentrations plasmatiques sont atteintes en 3 à 5 heures. Concernant la distribution, il y a une forte liaison aux protéines plasmatiques (> 98%) et le volume de distribution est d'environ 18 litres après administration intraveineuse de 250 mg. Enfin la clairance est de 8,2 L/h après administration par voie intraveineuse de 250 mg et la demi-vie d'élimination est de 5,4h (résumé des caractéristiques du produit, TRACLEER[®] bosentan. date d'approbation/Révision : août 2006 .V06).

3. Métabolisme

Le bosentan est métabolisé au niveau du foie par les CYP3A4 et CYP2C9, puis éliminé par excrétion biliaire. Moins de 3% de la dose orale administrée sont retrouvés dans les urines. De plus, il possède trois métabolites dont un seul est pharmacologiquement actif. Ro 48-5033, le métabolite majeur dans le plasma, les urines et les fèces sont le résultat d'une hydroxylation au niveau du groupement t-butyl du bosentan. Les deux autres métabolites, Ro 47-8634 et Ro 64-1056, représentent des métabolites mineurs (Lausecker et al. 2000). Ro 47-8634 est le résultat de la O-demethylation de l'ester méthyl phénolique et Ro 64-1056 est généré par déméthylation et hydroxylation (Weber et al. 1999). Le métabolite majeur est principalement excrété sous forme inchangée par la bile. Chez les patients adultes, l'exposition au métabolite actif est supérieure à celle observée chez les sujets sains. Chez les patients présentant des signes évocateurs de cholestase, l'exposition au métabolite actif peut être augmentée.

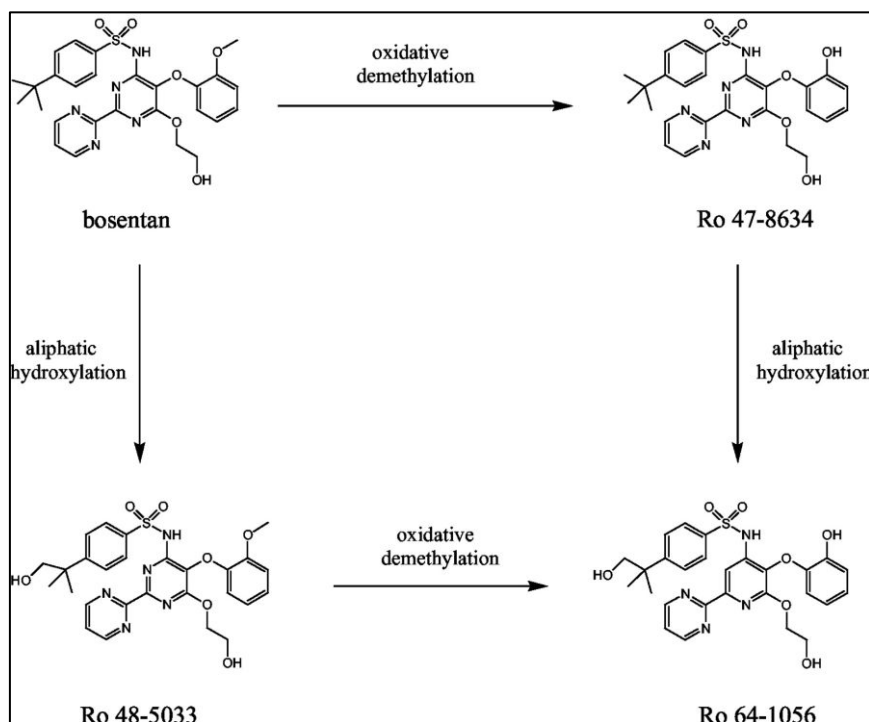


Figure 33 : Différents métabolites du bosentan. D'après (A. Treiber et al. 2007)

In vitro, le bosentan n'a pas d'effet inhibiteur significatif sur les isoenzymes CYP testés (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4). En conséquence, il est vraisemblable que le bosentan n'augmente pas les concentrations plasmatiques des médicaments métabolisés par ces isoenzymes. Le bosentan est un inducteur des isoenzymes CYP2C9 et CYP3A4 et probablement aussi du CYP2C19 et de la P-glycoprotéine. Des données *in vitro* ont indiqué que le bosentan était un substrat de UGT1A1 (Fahrmayr et al. 2013). *In vitro*, le bosentan inhibe BSEP dans des cultures d'hépatocytes. Enfin, comme ses métabolites il rentre dans les hépatocytes par les transporteurs membranaires OATP1B1 et OATP1B3 (A. Treiber et al. 2007).

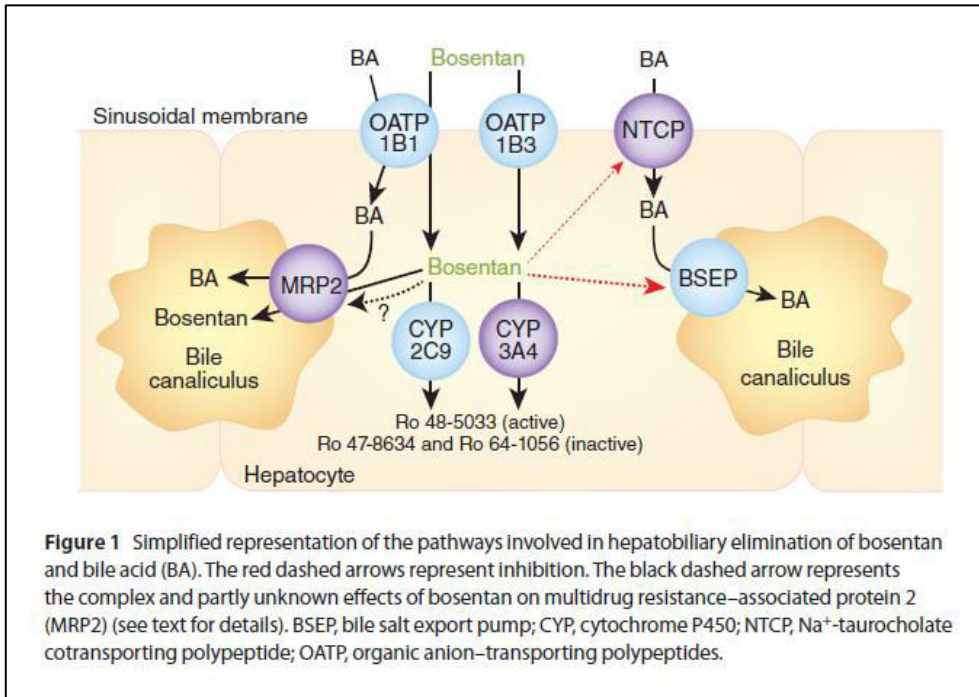


Figure 34: Représentation de l'élimination hépatobiliaire du bosentan et des acides biliaires. D'après (Roustit et al. 2014)

c. Bosentan et hépatotoxicité

i. Données cliniques d'hépatotoxicité

En 2002, Actelion Pharmaceuticals met sur le marché le bosentan dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Les études cliniques révèlent que 11% des patients dans les études de pré-commercialisation sont atteints d'une triple augmentation de la concentration sérique de l'une ou des deux transaminases hépatiques. Sur l'ensemble des études contrôlées contre placebo, des augmentations des aminotransférases hépatiques ≥ 3 fois la limite supérieure de la normale (LSN) ont été observées chez 11,6% des patients traités par le bosentan contre 0 % des patients traités par placebo. Des élévations jusqu'à ≥ 8 xLSN ont été observées chez 4,6% des patients contre 0,4% des patients sous placebo. Les élévations des aminotransférases hépatiques étaient associées avec des augmentations de la bilirubine (≥ 2 xLSN) sans preuve d'obstruction biliaire chez 0,2% (5 patients) traités par le bosentan et 0,3% (6 patients) sous placebo.

	<i>Placebo (n=69)</i>	<i>Bos. 125 mg (n=74)</i>	<i>Bos. 250mg (n=70)</i>
<i>Fonction hépatique anormale</i>	2 (3%)	3 (4.2%)	10 (14.3%)
<i>ALT/AST > 3xULN</i>	0 (0%)	11 (11.6%)	10 (14.3%)
<i>ALT/AST > 8xULN</i>	0 (0%)	2 (2.1%)	5 (7.1%)

Tableau 7 : Elévation des transaminases après traitement par le bosentan. D'après Actelion: Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. Isaac Kobrin, MD. Head of Clinical Development. Actelion Pharmaceuticals. 9001.01. 2.

<i>Troubles hépatobiliaires</i>	Très fréquent	Anomalie du bilan hépatique
	Peu fréquent	Elévation des aminotransférases hépatiques associée à une hépatite et/ou un ictère
	Rare	Cirrhose hépatique, insuffisance hépatique

Tableau 8 : Fréquence des troubles hépatobiliaires après traitement par le bosentan. D'après les RCP

Encore en 2002, la FDA, en approuvant la commercialisation du bosentan, exige que la société mette en place un système de distribution restreint afin de suivre chaque patient ayant pris le médicament. Par ailleurs l'augmentation sérique d'ALAT ou d'ASAT n'étant pas rare pendant le traitement, toute augmentation supérieure à 8 fois la normale doit engendrer l'arrêt définitif du médicament. Une élévation de 5 à 8 fois la normale doit être confirmée par des tests répétés et le médicament arrêté si les valeurs des transaminases persistent ou augmentent avec un redémarrage possible si les valeurs retombent dans la gamme normale. Les élévations d'ALAT sont généralement transitoires et asymptomatiques et peuvent disparaître malgré la poursuite du médicament sans ajustement de la dose. La plupart des cas d'atteinte hépatique aiguë due au bosentan ont été auto-limitées et n'ont pas donné lieu à une insuffisance hépatique aiguë (Eriksson et al. 2011). Cependant, des cas isolés d'insuffisance hépatique aiguë ont été notifiés, et ont abouti à un programme de surveillance stricte pour son utilisation. Fait intéressant, plusieurs cas d'atteinte hépatique aiguë attribués aux antagonistes des récepteurs de l'endothéline ont eu une réponse bénéfique apparemment rapide à la corticothérapie, malgré l'absence de caractéristiques immunoallergiques ou auto-immunes (Hartman et al. 2010).

ii. Cholestase

Après sa mise sur le marché, des rapports concernant de rares cas de lésions hépatiques cliniquement apparentes avec la jaunisse ont été associés à l'utilisation du bosentan. L'apparition de la maladie arrivait habituellement dans les 6 mois après l'initiation du traitement et des cas survenus au cours de thérapie chronique ont également été décrits (Eriksson et al. 2011). Une étude (Fattinger et al. 2001) a examiné si l'inhibition de BSEP (rongeurs et humains) pourrait représenter une lésion hépatique induite par le bosentan. La base de données sur les essais cliniques a été ré-analysée afin de trouver les cas de cholestases induites par le bosentan et d'évaluer le potentiel cholestatique chez le rat ainsi que l'effet de la molécule et de ses métabolites sur le transport de l'acide taurocholique *in vitro*. Ils ont pu mettre en évidence une augmentation significative d'acides biliaires sériques chez les patients. L'induction de cholestase a été confirmée chez le rat ainsi que sur des modèles *in vitro* (vésicules membranaires exprimant BSEP).

1. Cholestase *in vivo*

Dans une étude de toxicité orale de 12 mois, le bosentan a induit une élévation moyenne de PAL sériques chez les chiens ayant reçu des doses élevées. L'augmentation enzymatique hépatique observée avec le bosentan a suggéré une obstruction biliaire primitive avec une nécrose hépatocytaire secondaire ainsi qu'une hépatotoxicité de type cholestatique. Les augmentations de PAL et de γ GT sont indicatives de la lésion des voies biliaires, et ne sont pas élevées dans les cas de nécrose hépatocytaire primaire. La pigmentation des canalicules biliaires et de la vésicule biliaire observée par histopathologie chez les chiens ayant reçu la dose la plus élevée est également un signe de cholestase. De plus, la sécrétion biliaire a semblé être inhibée par le bosentan, puisque le cholestérol biliaire a été réduit par des doses élevées (18 et 50 fois la dose recommandée chez l'humain) et les phospholipides biliaires ainsi que les acides biliaires ont également été diminués.

	Effets secondaires observés avec le bosentan	Dose orale		Durée de l'étude
		mg/kg/jour	Multiple de la dose humaine recommandé*	
Chien	PAL élevée	400	40 X	6 mois
	Hypertrophie des acini	400	40 X	
	Hypertrophie du foie	60	5 X	
	Augmentation des ALAT, PAL et du poids du foie	1000	100 X	4 semaines
	Prolifération des canaux biliaires, nécrose cellulaire			
Rat	Augmentation du poids du foie	1000	33 X	6 mois

Tableau 9 : Etude des effets hépatiques indésirables du bosentan chez l'animal. D'après (John E. Koerner 2001)

Comme vu précédemment, le bosentan a augmenté le niveau d'acides biliaires sériques après un traitement chez le rat (Fattinger et al. 2001). Peu après, (Fouassier et al. 2002) ont également voulu savoir si le bosentan ou ses métabolites, tous deux éliminés par la bile, induisaient des altérations de la sécrétion biliaire. Pour ce faire, des rats KO aux

récepteurs mrp2 (TR-) ont reçu des injections de bosentan. Ils ont pu observer une augmentation dose-dépendante de l'excrétion de la bilirubine. Chez les rats recevant le bosentan (≥ 10 mg/kg), à la fois dans des conditions basales et sous perfusion intraveineuse de taurocholate ($2 \mu\text{mol} / \text{min} / \text{kg}$), les sécrétions de phospholipides et de cholestérol ont été profondément inhibées et découplées de la sécrétion des sels biliaires. Chez les rats TR-, l'effet cholérétique du bosentan a été réduit à des niveaux non significatifs. La stimulation de la sécrétion de la bilirubine n'a montré aucun changement, alors que celle du cholestérol a été maintenue. En conclusion, le bosentan a modifié la formation de la bile en majeure partie par l'implication de MRP2. La molécule s'est révélée être un inhibiteur plus puissant de l'absorption de Na^+ dépendant de taurocholate chez le rat (IC_{50} $5,4 \text{ M}$) que sur des hépatocytes humains en suspension (IC_{50} de $30 \mu\text{M}$). Ainsi, le transporteur NTCP de rat serait plus sensible que NTCP humain (Leslie et al. 2007). Dans une autre étude, des souris NOG exprimant un transgène de la thymidine kinase (TK-NOG) avec des foies humanisés ont montré un profil humanisé d'excrétion biliaire après administration du médicament. Cette étude a aussi constaté que les lésions hépatiques cholestatiques facilement détectables se développent chez les souris TK-NOG avec foies humanisés après 1 semaine de traitement par le bosentan (160, 32, ou 6 mg / kg par jour par voie orale), alors que la toxicité hépatique ne s'est pas développée chez les souris témoins après 1 mois de traitement. Les caractéristiques de toxicité hépatique et histologiques induites par le bosentan chez la souris humanisée en laboratoire reflètent le mécanisme chez les sujets humains (Xu et al. 2015).

2. Cholestase *in vitro*

a) Etudes sur les transporteurs

Bien que les mécanismes de cholestases soient nombreux, le bosentan est connu principalement pour ses fonctions sur les transporteurs hépatiques. En effet, de nombreuses études *in vitro* ont été menées sur différents modèles cellulaires ou acellulaires afin de démontrer le potentiel cholestatique de cette molécule depuis sa mise sur le marché.

- **Vésicules membranaires de lignées cellulaires d'insecte transfectées**

Pour élucider la pathogénèse moléculaire de la cholestase induite par les médicaments, (Stieger et al. 2000) ont étudié l'effet de différentes molécules sur des vésicules de cellules Sf9 et ont démontré l'effet inhibiteur du bosentan sur le transporteur canaliculaire BSEP. En 2001 (Fattinger et al. 2001), a montré également la capacité du bosentan à inhiber le transport du taurocholate via BSEP, sur les mêmes vésicules. Dans une étude japonaise la même année (Mano, Usui, and Kamimura 2007), les effets du bosentan sur BSEP/Bsep et MRP2/Mrp2 ont été évalués en utilisant encore des vésicules membranaires dérivées de cellules de *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Les résultats suggèrent que le bosentan inhibe BSEP chez l'homme avec une puissance similaire chez le rat, et que l'augmentation du flux d'acides biliaires chez le rat est au moins partiellement attribuable à l'activation de Mrp2. Enfin, sur plusieurs études de screening depuis ces dernières années utilisant encore un modèle de vésicules membranaires plasmiques issues de cellules (Sf21 ou Sf9) le bosentan a encore confirmé son fort pouvoir inhibiteur de BSEP (Morgan et al. 2010; S. Dawson et al. 2012; Pedersen et al. 2013; Schadt et al. 2015).

- **Hépatocytes isolés en culture (sandwich)**

Il s'agit d'un modèle très prisé dans l'étude du potentiel cholestatique des molécules et particulièrement du bosentan. En règle générale, les études ont majoritairement utilisé des hépatocytes de rats pour montrer une diminution de l'accumulation d'acide taurocholique (Leslie et al. 2007; Ansele et al. 2010). De plus, en utilisant des hépatocytes humains cultivés en configuration sandwich, le bosentan a également montré une

atténuation de transport de NTCP à des concentrations élevées et a également diminué l'activité de BSEP (Hartman et al. 2010; Jemnitz et al. 2012; Lepist et al. 2014; Susukida et al. 2015). En 2014, de façon plus originale, une étude de (Garzel et al. 2014) s'est intéressée à l'expression des transcrits des transporteurs impliqués dans la cholestase, étude rare en comparaison des autres études portant sur l'activité des transporteurs. Le bosentan a montré un effet négligeable sur l'activité FXR mais a inhibé l'expression mRNA de *BSEP* d'environ 50%.

- **Lignées cellulaires**

La lignée cellulaire HepaRG a été moins utilisée pour démontrer l'effet inhibiteur du bosentan sur l'activité des transporteurs hépatiques (Szabo et al. 2013; Susukida et al. 2016). Très récemment en 2016, une équipe a caractérisé *in vitro* la biosynthèse et l'élimination des acides biliaires dans des cellules HepaRG KO en ABCB11 (BSEP). Ils ont montré une accumulation intracellulaire de BAs augmentée dans les cellules HepaRG-KO exposées au bosentan et à la troglitazone, mais pas à la dipyridamole (Qiu et al. 2016) .

b) Autre mécanisme de cholestase

A l'inverse d'autres molécules cholestatiques, le bosentan n'est pas un inducteur de stress oxydant. En effet, il a même démontré des propriétés anti-oxydantes sur des cellules cardiaques et pulmonaires de rats (Gupta et al. 2005; Rafikova et al. 2013). De plus, son action anti-inflammatoire a également été étudiée : (Serafim et al. 2015) ont montré qu'un traitement par le bosentan sur un modèle de souris en situation inflammatoire a réduit l'inflammation par inhibition de l'anion superoxyde. L'ET-1 peut également agir par un mécanisme autocrine/paracrine via les récepteurs ET_A sur les cellules chémosensorielles et immunitaires en entraînant une réponse inflammatoire. Le traitement par le bosentan sur des carotides de rats a démontré cette théorie en bloquant l'hypoxie induite par un mécanisme inflammatoire (Xuemei Liu et al. 2012). A l'heure actuelle, peut-être en raison du peu d'études sur son potentiel cholestatique, il apparaît que le bosentan exerce son effet cholestatique seulement par son action inhibitrice des transporteurs hépatiques et majoritairement BSEP. En revanche, nous démontrerons dans cette thèse qu'il est possible

de mettre en évidence le potentiel cholestatique du bosentan par une autre méthode basée sur la fonctionnalité des canalicules biliaires.

3. Idiosyncrasie

Comme vu précédemment, les lésions hépatiques idiosyncrasiques (iDILI) conduisent le plus souvent au retrait du médicament ou à des avertissements (Watkins and Seeff 2006). On présume que ceci est dû au fait que le foie est le site principal du métabolisme des médicaments, ce qui conduit souvent à la formation de métabolites réactifs. Les deux types les plus courants d'iDILI sont hépatocellulaires et cholestatiques.

Les iDILI sont considérées comme indépendantes de la dose; cependant, la plupart des cas se produisent à dose thérapeutique chez un individu en dépit d'une habituelle bonne tolérance. Cependant, dans les essais précliniques, l'hépatotoxicité est souvent prédite après une exposition médicamenteuse à des doses élevées conduisant au stress hépatocytaire. Toutefois, le concept classique de l'indépendance de la dose est contestée (Senior 2008). Uetrecht a tout d'abord suggéré que les iDILI étaient rarement observées avec des médicaments administrés à des doses quotidiennes de ≤ 10 mg (Knowles, Uetrecht, and Shear 2000; Stepan et al. 2011) et de nombreux médicaments retirés du marché ou avec avertissement comme le bosentan avaient été prescrits à des doses quotidiennes ≥ 50 ou 100 mg (Walgren, Mitchell, and Thompson 2005).

De plus, les médicaments et/ou métabolites ayant la capacité à inhiber BSEP *in vitro* ont le potentiel de causer des DILI comme cela a été montré par (Morgan et al. 2010) à l'aide de vésicules BSEP inversées. Bien que cette approche permettant de tester des médicaments au stade préclinique a révélé que certains comme le bosentan, ont un puissant pouvoir sur l'inhibition de BSEP et ont été soit retirés du marché (troglitazone) soit ont reçu des avertissements (imatinib) pour hépatotoxicité, d'autres ont un faible potentiel de risque DILI. Par conséquent, l'utilisation de l'inhibition de BSEP seul est insuffisante pour déterminer le risque DILI et d'autres facteurs doivent être pris en considération dans les mécanismes de la cholestase induite par le bosentan.

Récemment, (Aleo et al. 2014) ont démontré que les médicaments qui ont un risque de DILI plus important, influencent à la fois l'activité de BSEP et les activités mitochondriales. Le dysfonctionnement mitochondrial altérerait la production d'ATP, et en conjonction avec

l'inhibition de la BSEP, pourrait expliquer le lien synergique entre les mitochondries et les transporteurs dépendant de l'ATP tels que BSEP dans les DILI. (Woodhead et al. 2014) ont ainsi émis l'hypothèse que la toxicité du bosentan serait vraisemblablement due à un mécanisme de toxicité combiné : mitochondrie /acide biliaire.

Au niveau du polymorphisme génétique, une équipe chinoise a criblé l'activité enzymatique de 38 variants du CYP2C9 dans le métabolisme du bosentan. Bien que les fréquences alléliques de ces allèles soient rares dans la population chinoise (0,1-1,8%), l'obtention de données relativement précises sur cette distribution semble être précieuse dans la pratique clinique puisque plus de 1,3 milliard de personnes vivent maintenant dans la partie continentale de la Chine. Des microsomes d'insectes exprimant les 38 allèles de CYP2C9 ont été incubés avec 10 à 625 μ M de la molécule. Le bosentan et son principal métabolite, ont été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Trente-huit allèles défectueux ont été classés en trois catégories en fonction de leur valeur par rapport au type sauvage : neuf allèles présentaient une augmentation significative dans les valeurs de clairance intrinsèque (V_{max}/K_m) par rapport au type sauvage (1,5 fois \sim 4.9 fois par rapport au contrôle); neuf allèles présentaient une réduction dans les valeurs de clairance intrinsèque par rapport au type sauvage (0,6 à 28,9% de la clairance relative). Enfin, les 20 allèles restants ne présentaient pas de différence significative par rapport au type sauvage. Ces données ont non seulement fourni de nouvelles informations sur les polymorphismes génétiques du CYP2C9 et sur leurs impacts biologiques mais montrent encore une fois que le mécanisme d'hépatotoxicité idiosyncratique du bosentan peut également mettre en jeu le polymorphisme génétique lié au cytochrome P450 (Mengchun Chen et al. 2014).

En se basant sur tout ce qui précède, nous pouvons déduire que le bosentan peut induire une toxicité hépatique idiosyncratique de type cholestase par des mécanismes qui ne sont pas encore bien connus. Bien qu'un lien ait été établi entre la dose utilisée de bosentan pendant le traitement et les réactions de type idiosyncrasique observées (Kenyon and Nappi 2003), ceci ne semble pas être la seule preuve.

d. Autres membres de la famille des ERAs

i. Introduction

Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline aujourd'hui sur le marché sont au nombre de 4, grâce notamment à une optimisation chimique ou pharmacologique des molécules permettant un gain d'efficacité ou une atténuation des effets indésirables. Outre, le bosentan, un autre inhibiteur est actuellement sur le marché aux USA et en Europe ; il s'agit de l'ambrisentan (2007). Un autre agent, le sitaxentan a été approuvé en 2006 en Europe mais pas aux USA ; il a été retiré du marché en 2010 à cause de problèmes d'hépatotoxicité. Finalement en 2013, un nouveau traitement de l'HTAP par voie orale est arrivé sous le nom de macitentan. Les 4 molécules diffèrent par plusieurs paramètres qui seront décrits par la suite mais le point important à noter est leur différence dans les affinités aux récepteurs A et B à l'endothéline. (Davenport and Battistini 2002; Hynynen and Khalil 2006). Plus intéressant, cette famille a été associée à un taux non négligeable d'élévation d'enzymes hépatiques sériques pendant le traitement. A l'inverse de l'ambrisentan qui ne semble pas montrer d'hépatotoxicité avec un traitement à long terme, (Ben-Yehuda et al. 2012), le macitentan qui a une structure similaire au bosentan ne semble pas inhiber BSEP chez l'homme (Alexander Treiber et al. 2014; Raja 2010; Bolli et al. 2012) mais possède la capacité d'inhiber les transporteurs hépatiques *in vitro* (Hartman et al. 2010; Lepist et al. 2014; Gillies et al. 2012).

ii. Comparaison des différents ERA

1. Formule chimique

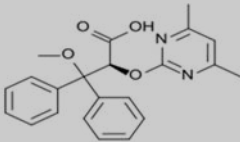
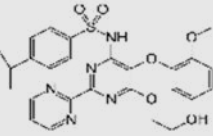
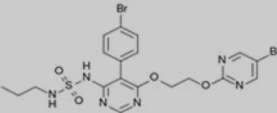
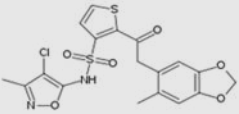
Ambrisentan	
Bosentan	
Macitentan	
Sitaxentan	

Tableau 10 : Structures chimiques des différents ERA. D'après (Chaumais et al. 2015; Erve et al. 2013)

Contrairement aux deux autres ERAs, l'ambrisentan et le sitaxentan, qui présentent des structures chimiques différentes et spécifiques pour les récepteurs ET_A, le macitentan et le bosentan partagent une structure chimique similaire et la même réactivité avec les deux récepteurs ET_A et ET_B. En effet, les structures du macitentan et du bosentan ne diffèrent que par l'addition d'un groupe alkyle-sulfamide sur la structure principale (Chaumais et al. 2015).

2. Données pharmacologiques, pharmacodynamiques et pharmacocinétiques

Médicaments	Indication thérapeutique	Affinité	Demi-vie (t _{1/2})	Doses	C _{max} (μM)	Métabolisme	Références
Ambrisentan	Traitement de l'HTAP chez les patients adultes en classes fonctionnelles II et III (OMS)	- Sélectif pour ET _A (K _i 0,016 nM)	15h	5 mg ou 10 mg quotidien	2-3.2	- UGT (UGT1A9S, UGT2B7S et UGT1A3S) sous forme de glucuroconjugué d'ambrisentan (13 %) - Substrat pour OATP - CYP3A4, et dans une moindre mesure par le CYP3A5 et le CYP2C19 forme un métabolite non actif	RCP (Ben-Yehuda et al. 2012) (Takatsuki et al. 2013) (Chaumais et al. 2015)
Bosentan	Traitement de l'HTAP dans le but d'améliorer la tolérance à l'effort et les symptômes chez les patients en classe fonctionnelle OMS III. Traitement des ulcères digitaux chez les patients souffrant de sclérodémie systémique et d'ulcères digitaux évolutifs	- Double antagoniste - 50xET _A (non sélectif)	5h	62.5 mg puis 125 mg deux fois par jour	6.75	-Inducteur CYP2C9 et CYP3A4. -Métabolisé par CYP2C9 et CYP3A4 -Éliminé par excrétion biliaire. -3 métabolites dont un seul actif	RCP (Fattinger et al. 2001) (Mano, Usui, and Kamimura 2007) (A. Treiber et al. 2007) Livertox (Dhillon and Keating 2009) (Chaumais et al. 2015)
Macitentan	Traitement au long cours des patients adultes atteints d'HTAP en classe fonctionnelle OMS II ou III.	- Double antagoniste - 100xET _A (non sélectif)	16h	10 mg quotidien	0.13-0.75	- CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9 et CYP2C19 - Formation d'un métabolite réactif - Excrétion urinaire	RCP. (Lepist et al. 2014) Livertox ; (Kholdani, Fares, and Trow 2014) (Chaumais et al. 2015)
Sitaxentan	Traitement de l'HTAP dans le but d'améliorer la capacité à l'exercice chez les patients en classe fonctionnelle III	- Sélectif pour ET _A (6500xET _A) K _i = 0.43nM	10h	100 mg quotidien	22	- CYP2C9 et CYP3A4/5 - Effet inhibiteur sur le CYP2C9 et, dans une moindre mesure, sur les CYP2C19, CYP3A4/5 et CYP2C8 - Formation d'un métabolite réactif - 50-60 % de la dose administrée par voie orale est excrétée dans les urines	(Stavros, Kramer, and Wilkins 2010) (Dhaun et al. 2007)

Tableau 11 : Données pharmacologiques, pharmacodynamiques, pharmacocinétiques des différents ERAs

L'ambrisentan et le sitaxentan sont tous deux des antagonistes sélectifs de l'ET_A à l'inverse du macitentan et du bosentan qui eux sont des doubles antagonistes des récepteurs ET_A et ET_B. Hormis l'ambrisentan qui semble être métabolisé principalement par les UGTs, les trois autres molécules sont cytochromes-dépendantes et capables d'être métabolisées en un ou plusieurs métabolites réactifs participant à l'hépatotoxicité de type idiosyncratique. Enfin, l'ambrisentan qui semble être moins toxique possède la dose administrable la moins élevée à l'inverse du sitaxentan qui présente la dose la plus élevée.

3. Effets indésirables et hépatotoxicité *in vivo* et *in vitro*

Médicaments	Effets indésirables	Hépatotoxicité <i>In vivo</i>	Hépatotoxicité <i>In vitro</i>	Références
Ambrisentan	Fréquents: Résultats anormaux des analyses de sang destinées à contrôler la fonction hépatique Peu fréquents: atteinte du foie, hépatite auto-immune	Bon profil hépatique en comparaison aux autres ERA. Aucune d'évidence d'hépatotoxicité	Pas d'effet inhibiteur sur les transporteurs humains. Pas d'induction de MRP2, PgP ou BSEP dans les hépatocytes de rats	RCP (Ben-Yehuda et al. 2012) (Takatsuki et al. 2013)(Chaumais et al. 2015)
Bosentan	Fréquents : réactions d'hypersensibilité Peu fréquents: Résultats anormaux des analyses de sang destinées à contrôler la fonction hépatique avec des hépatites incluant une possible aggravation d'une hépatite sous-jacente et/ou un ictère	ASAT et ALAT sériques augmentés chez le rat	Inhibition de BSEP, NTCP Substrat pour OATP, NTCP et MRP2	RCP, (Fattinger et al. 2001) (Mano, Usui, and Kamimura 2007) (A. Treiber et al. 2007)Livertox ;(D hillon and Keating 2009) (Chaumais et al. 2015)
Macitentan	Peu fréquents: réactions d'hypersensibilité	Augmentation du poids du foie Hypertrophie centrolobulaire	Inhibition de BSEP et NTCP dans des cellules en culture Pénètre dans le foie par diffusion passive.	RCP. (Lepist et al. 2014) Livertox ; (Kholdani, Fares, and Trow 2014) (Chaumais et al. 2015)
Sitaxentan	Fréquents: Insomnie, étourdissements, congestion nasale, nausée, constipation, douleur épigastrique vomissements, dyspepsie et diarrhée, augmentation des transaminases hépatiques (ALAT et ASAT), augmentation de la bilirubine (associée à l'augmentation des ALAT et des ASAT hépatiques)	Elévation des aminotransférases Augmentation dose-dépendante du poids du foie (hypertrophie centrolobulaire et nécrose)	Inhibition de NTCP dans les hépatocytes humains en culture Diminution du transport via OATP-B	(Stavros, Kramer, and Wilkins 2010) (Dhaun et al. 2007) (Lavelle et al. 2009)

Tableau 12 : Effets indésirables et hépatotoxicité *in vivo* et *in vitro* des différents ERA

Au niveau des effets indésirables de type hépatique, le sitaxentan retiré du marché présente un profil toxique important en comparaison avec les trois autres molécules. Le bosentan lui-même hépatotoxique est également reconnu comme étant un agent cholestatique puissant. Par ailleurs, le macitentan, molécule plus récemment mise sur le marché, semble présenter un potentiel hépatotoxique proche de celui rencontré avec le bosentan mais sans de rares associations avec une cholestase. Enfin l'ambrisentan montre une absence de toxicité dans les conditions de traitement utilisées.

Contexte et cadre du projet

Les DILI représentent non seulement la cause principale d'insuffisance hépatique et de transplantation du foie mais sont un problème majeur de santé publique pour les agences réglementaires comme pour les firmes pharmaceutiques qui souhaitent développer de nouveaux médicaments. Il reste difficile de prédire le potentiel hépatotoxique d'une molécule au cours de la période de R&D, les modèles animaux n'étant pas fiables pour prédire une hépatotoxicité notamment de type idiosyncratique. Il y a donc un besoin urgent de nouveaux tests plus pertinents et reproductibles, qui permettent non seulement de détecter très tôt au cours de leur développement les molécules potentiellement hépatotoxiques mais également de caractériser les mécanismes de toxicité. Des essais chez l'homme n'étant pas possibles, seuls des tests *in vitro* sur cellules hépatiques humaines peuvent être envisagés.

L'objectif de notre travail a été de rechercher une nouvelle méthode de détection des molécules cholestatiques basée sur leurs mécanismes d'action et d'en évaluer la robustesse par rapport aux méthodes existantes en utilisant les cellules HepaRG et à titre de comparaison, les hépatocytes humains en culture primaire, comme modèles expérimentaux.

Notre travail s'est inscrit dans le cadre du programme européen MIP DILI: Mechanism-based integrated systems for the prediction of drug-induced liver injury (2012-2017), co-financé par l'Union Européenne et par les firmes pharmaceutiques, et regroupant des laboratoires académiques, des PME et des laboratoires pharmaceutiques dont les objectifs principaux étaient d'identifier et de valider un panel de tests *in vitro* afin de mieux prédire le risque de DILI chez l'homme et d'explorer et comprendre les mécanismes de toxicité *in vivo*.

Nos résultats sont présentés en 2 chapitres :

Le premier chapitre porte sur la démonstration que l'altération de la dynamique des canalicules biliaires associée à celle de la voie de signalisation ROCK/MLCK est une caractéristique des effets de molécules chimiques/pharmaceutiques reconnues comme pouvant être cholestatiques *in vivo*. Les résultats obtenus ont fait l'objet de 2 publications :

- Ahmad Sharanek*, Audrey Burban*, **Matthew Burbank**, Rémy Le Guevel, Ruoya Li, André Guillouzo, and Christiane Guguen-Guillouzo. 2016. "Rho-Kinase/myosin Light

Chain Kinase Pathway Plays a Key Role in the Impairment of Bile Canaliculi Dynamics Induced by Cholestatic Drugs.” Scientific Reports 6 (May): 24709.

- **Matthew G. Burbank**, Audrey Burban, Ahmad Sharaneq, Richard J. Weaver, Christiane Guguen-Guillouzo, André Guillouzo. 2016. “Early alterations of bile canaliculi dynamics and the ROCK/MLCK pathway are characteristics of drug-induced intrahepatic cholestasis” Drug Metab Dispos. 2016 Aug 18. pii: dmd.116.071373

Le deuxième chapitre porte sur l'étude du potentiel hépatotoxique et cholestatique des antagonistes des récepteurs à l'endothéline. Le bosentan, molécule cholestatique reconnue, est comparé aux 3 autres ERAs. Ce travail fait l'objet d'une publication actuellement en cours de soumission :

- **Matthew G. Burbank**, Ahmad Sharaneq, Audrey Burban, Hervé Mialanne, Hélène Aerts, Christiane Guguen-Guillouzo, Richard J. Weaver, André Guillouzo. 2016. “Differential cytotoxic and cholestatic potential of endothelin receptor antagonists”

Résultats

Chapitre 1

La déformation des canalicules biliaires et la voie ROCK/MLCK : marqueurs fonctionnels de la cholestase intra-hépatique

Une cholestase intra-hépatique d'origine médicamenteuse se développe habituellement après administration chronique d'un médicament et se caractérise par une accumulation intracellulaire et sérique associée généralement à une dilatation des canalicules biliaires (Imanari et al. 1981; Watanabe et al. 1991; Chung et al. 2002). De nombreux auteurs ont démontré la possibilité de contraction des BC *in vitro*. Déjà en 1982, (Phillips et al. 1982) observaient, en culture d'hépatocytes, que les BC se contractaient fréquemment lorsqu'on les observait par la technique de time-lapse cinéphotomicrographique. Un peu plus tard, en 1985, Smith et al. démontraient que des hépatocytes de rat, maintenus en culture primaire après isolement, étaient capables de produire également des contractions de leurs canalicules biliaires reformés. Par ailleurs, dans une étude publiée en 1993, Arias et al. établissaient aussi un lien entre l'ultrastructure, la contraction et la fonction de transport des BC dans les hépatocytes humains. La motilité des BC a été principalement mise en évidence dans des couplets d'hépatocytes isolés (Adelstein et al. 2006) et a été signalée comme ayant un rôle dans le flux de bile dans les hépatocytes de rat à la fois dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Watanabe et al. 2007). Par exemple, il a été démontré que des interférences dans les interactions actine-myosine provoquées par la phalloïdine, la cytochalasine ou encore l'acide lithocholique, diminuaient le taux de contractions spontanées des BC et réduisaient le flux biliaire (Adelstein et al. 2006 ; Arikawa et al. 1990). Dans le modèle HepaRG, la déformation des canalicules biliaires a d'abord été observée après un traitement de 2h par 50 μ M de chlorpromazine. La distribution de la F-actine a révélé un BC rétracté après 30min de traitement en lien avec un stress oxydant (Anthérieux et al. 2013). Le même phénomène a été observé l'année suivante avec 50 μ M de cyclosporine A qui a entraîné une perturbation de la distribution canaliculaire de la F-actine et a causé la constriction des canalicules biliaires après 2h d'exposition (Sharanek et al. 2014). En 2015, Bachour-El Azzi et al. ont été les premiers à étudier la dynamique des BC évaluée par imagerie time-lapse qui permet d'analyser les cellules vivantes directement au fil du temps. Certains BC montraient des mouvements de

contractions et de relaxations dans les cellules HepaRG, ce qui indiquait un état actif permettant d'évacuer périodiquement les produits accumulés.

Dans notre premier article, nous avons d'abord démontré la capacité des cellules HepaRG à évacuer leur contenu intracellulaire grâce à la dynamique des BC. Puis, nous avons montré que ce mouvement dynamique est altéré par des molécules ou médicaments cholestatiques résultant en une constriction ou une dilatation. Enfin, nous avons mis en évidence l'implication de la voie ROCK/MLCK dans cette dynamique canaliculaire.


Dans un deuxième article, nous avons cherché à étudier plus précisément les mécanismes de la cholestase d'origine médicamenteuse à partir d'un nombre plus élevé de médicaments. Un groupe de 18 molécules comprenant 12 médicaments cholestatiques et 6 non cholestatiques, définis d'après les données cliniques, a été analysé en considérant plusieurs paramètres : la dynamique des BC, l'implication de la voie ROCK/MLCK, l'inhibition de l'efflux de taurocholate et l'expression des ARNs des principaux transporteurs hépatiques. Nos résultats ont montré que tous les médicaments cholestatiques étaient capables de provoquer une altération précoce de la dynamique des canalicules biliaires associée à une modulation de la voie ROCK/MLCK et ces changements semblaient être plus spécifiques que l'analyse de l'inhibition de l'efflux seul comme marqueurs non cliniques prédictifs de la cholestase induite par les médicaments.

Article 1

Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway plays a key role in the impairment of bile canaliculi dynamics induced by cholestatic drugs

Ahmad Sharanek*, Audrey Burban*, Matthew Burbank, Rémy Le Guevel, Ruoya Li, André Guillouzo & Christiane Guguen-Guillouzo

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway plays a key role in the impairment of bile canaliculi dynamics induced by cholestatic drugs

Received: 15 October 2015

Accepted: 01 April 2016

Published: 12 May 2016

Ahmad Sharanek^{1,2,*}, Audrey Burban^{1,2,*}, Matthew Burbank^{1,2}, Rémy Le Guevel³, Ruoya Li⁴, André Guillouzo^{1,2} & Christiane Guguen-Guillouzo^{1,2,4}

Intrahepatic cholestasis represents a frequent manifestation of drug-induced liver injury; however, the mechanisms underlying such injuries are poorly understood. In this study of human HepaRG and primary hepatocytes, we found that bile canaliculi (BC) underwent spontaneous contractions, which are essential for bile acid (BA) efflux and require alternations in myosin light chain (MLC2) phosphorylation/dephosphorylation. Short exposure to 6 cholestatic compounds revealed that BC constriction and dilation were associated with disruptions in the ROCK/MLCK/myosin pathway. At the studied concentrations, cyclosporine A and chlorpromazine induced early ROCK activity, resulting in permanent MLC2 phosphorylation and BC constriction. However, fasudil reduced ROCK activity and caused rapid, substantial and permanent MLC2 dephosphorylation, leading to BC dilation. The remaining compounds (1-naphthyl isothiocyanate, deoxycholic acid and bosentan) caused BC dilation without modulating ROCK activity, although they were associated with a steady decrease in MLC2 phosphorylation via MLCK. These changes were associated with a common loss of BC contractions and failure of BA clearance. These results provide the first demonstration that cholestatic drugs alter BC dynamics by targeting the ROCK/MLCK pathway; in addition, they highlight new insights into the mechanisms underlying bile flow failure and can be used to identify new predictive biomarkers of drug-induced cholestasis.

Intrahepatic cholestasis represents a frequent manifestation of drug-induced liver injury (DILI) in humans¹. In several population-based studies of DILI, a cholestatic pattern and a mixed pattern were observed in 20–40% and 12–20% of the patients, respectively. The mortality rate in patients has been estimated as 7.8% in certain studies, although it can be lower (2.5%) in groups of patients with mixed hepatocellular and cholestatic dysfunction². However, the primary problem associated with cholestasis is that accurately predicting its risk is extremely difficult³.

A frequently reported causal mechanism underlying cholestatic disease is hepatobiliary transporter system alterations, in particular alterations to the bile salt export pump (BSEP/ABC11), which is the most physiologically important canalicular bile transporter⁴. Bile acid (BA) transport and secretion can also be impaired by the inhibition of BA uptake and efflux across the sinusoidal membrane. Although many cholestatic drugs are known to inhibit BSEP, several others are ineffective⁵. Therefore, the low prediction rate of the disease suggests that drug-induced cholestasis is linked to prior intracellular events involving one or more signalling pathway(s) that remain to be identified.

Membrane transporter efficiency, intracellular trafficking and efflux dynamics are necessarily interconnected via complex mechanisms that converge in dynamic movements that control bile clearance and involve signalling

¹INSERM U991, Liver Metabolisms and Cancer, Rennes, France. ²Rennes 1 University, Rennes, France. ³ImPACcell platform, Biosit, Rennes 1 University, Rennes, France. ⁴Biopredic International, St Grégoire, France. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.G.-G. (email: christiane.guillouzo@univ-rennes1.fr)

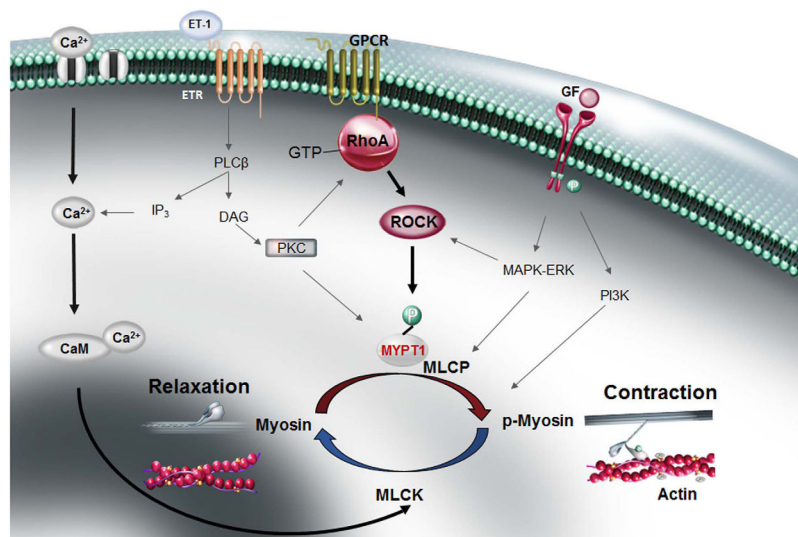


Figure 1. Schematic representation of MLC phosphorylation regulation by Rho-kinase and myosin light chain kinase. ROCK, Rho-kinase; Ca^{2+} , calcium; CaM, calmodulin; MLCK, myosin light chain kinase; MLCP, myosin light chain phosphatase; MYPT-1, myosin phosphatase target subunit 1; MLC, myosin light chain, ET-1, endothelin-1; ETR, endothelin receptor; IP₃, inositol 1,4,5-triphosphate; GPCR, G-protein coupled receptor; PKC, protein kinase C; PLC β , phospholipase C β ; DAG, diacylglycerol; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinases; ERK, extracellular signal-regulated kinases; MAPK, mitogen-activated protein kinases; GF, growth factor.

mechanisms that interfere with acto-myosin interactions. Rho GTPases play a critical role in actin distribution, which affects cytoskeleton organization and cell motility⁶. The RhoA/Rho-kinase (ROCK) pathway plays a major role in vasoconstriction and vascular tone regulation⁷. Activation of the RhoA/ROCK pathway is also essential for the contraction of vascular smooth muscle⁸.

The first step for activating the RhoA/ROCK pathway involves G protein-coupled vasopressor receptors and contractile agonists. These receptors activate the small monomeric GTPase RhoA, which activates ROCK and leads to MYPT1 phosphorylation and myosin light chain phosphatase (MLCP) inhibition, thereby resulting in the enhanced phosphorylation of myosin light chain (MLC). This phosphorylation catalyzes interactions between the myosin head and actin and subsequently allows myosin ATPase to produce a sliding force that results in acto-myosin contraction⁹ (Fig. 1). Myosin II contractile activity in smooth muscle and non-muscle cells is also stimulated through the phosphorylation of MLC by Ca^{2+} /calmodulin (CaM)-dependent myosin light-chain kinase (MLCK)¹⁰.

Signalling pathways have been identified as fundamental mechanisms that control bile canaliculi (BC) formation. Previous studies have shown that the ROCK pathway plays a major role in establishing bile ductular polarity in hepatic cells¹¹, whereas other studies have demonstrated that BAs stimulate canalicular network formation and maintenance via the cAMP-liver kinase-B1 and AMP kinase-dependent pathways by affecting the actin cytoskeleton via phosphorylation of MLC2 and tight junction assembly. This process occurs directly or indirectly through small GTPases, which alter the cellular energy status^{12–14}. ROCK was also found to mediate the regulation of intrahepatic vascular tone in humans with cirrhotic livers and in rats with bile ductular ligation¹⁵. However, a direct contribution of the ROCK/MLCK pathway to intrahepatic BC disorders has not been described.

Polarized hepatocytes are essential for bile flow, and a loss of polarity causes bile secretory failure and cholestasis¹⁶. Primary human hepatocyte cultures, particularly in a collagen sandwich configuration (SCHH), form a multicellular canalicular network as existing *in vivo*¹⁷. The differentiated human HepaRG cell line, which expresses phase 1 and 2 drug metabolizing enzymes and transporters and forms polarized structures with functional BC, was successfully used in the *in vitro* production of BAs that mimicked features of intrahepatic cholestasis induced by chlorpromazine (CPZ) and cyclosporine A (CsA) treatment and the characterization of mechanisms involved in the initiation of lesions^{18–20}.

In this study, 6 compounds with diverse chemical structures were selected, and they all have the ability to induce BC deformations (Supplementary Table 1). These compounds include the cholestatic drugs CPZ, CsA and bosentan; the hepatotoxicant α -naphthyl isothiocyanate (ANIT), which is largely used in rodent models of human intrahepatic cholestasis and biliary function disruption, although the underlying mechanism remains unclear²¹; the Y-27632 ROCK inhibitor analogue fasudil, which is used in combination with bosentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension; and the secondary BA deoxycholate (DCA). A previous study showed that DCA infusion in rats resulted in canalicular membrane structural alterations accompanied by reduced excretory functions in the liver²². Using these cholestatic agents and taking advantage of the well-polarized HepaRG and human hepatocytes, we investigated whether the ROCK/MLCK pathway has a critical role in cytoskeleton rearrangement and the BC deformations that accompany cholestatic insults.

Results

Morphological alterations of BC induced by the tested compounds. Phase-contrast examinations and rhodamine-phalloidin fluorochrome labelling of cytoskeletal F-actin showed that untreated differentiated HepaRG cells as well as conventional cultured human hepatocytes (CCHH) have large biliary pockets (saccular

lumen: S-BC) that branch out to smaller ductules (tubular lumen; T-BC) that usually occur in one extremity. In SCHH, however, most ductules are in a tubular form (T-BC) and form a network of connections. BC integrity was visualized by immunolocalization of the junctional zona occludens-1 protein (ZO-1), which co-localized with pericanalicular F-actin (Fig. 2A). Canalicular transporters, multidrug resistance protein 1 (MDR1/ABCB1) and multidrug-resistance-related protein 2 (MRP2/ABCC2), were correctly distributed on across the canalicular membranes. The accumulation of 5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) into the BC lumen confirmed the integrity as well as the activity up to the canalicular poles (Fig. 2A). Typical BC of different sizes closed by tight junctions were also observed under an electron microscope (Fig. 2B). These characteristics were similar in the three cell models (HepaRG cells, CCHH and SCHH).

A short exposure to the 6 cholestatic compounds was used to investigate the early events that led to BC deformations in the three cell models. The toxicity of the 6 compounds was evaluated in HepaRG cells using the MTT test after a 4 h exposure (Fig. 3A). Non-toxic concentrations (50 μ M each) of CPZ, CsA, fasudil and ANIT; 200 μ M DCA; and 100 μ M bosentan deformed most S-BC structures (Figs 3 and 4). Therefore, these concentrations were selected for further analysis. Phase-contrast imaging showed that exposure to CPZ or CsA resulted in the progressive constriction of S-BC, whereas exposure to the other 4 compounds (i.e., fasudil, ANIT, DCA and bosentan) resulted in spectacular dilation of S-BC in both human HepaRG and primary hepatocytes. S-BC deformations were confirmed by rhodamine-phalloidin staining of pericanalicular F-actin (Figs 3B and 4) and localization of the junctional ZO-1 protein in HepaRG cells (Fig. 3B).

Associated dysfunctions of BC dynamics. Using time-lapse microscopy, the BC of untreated HepaRG hepatocytes revealed spontaneous rhythmic motility characterized by repeated opening and closing spikes every 20–30 min (Fig. 5A; Supplementary video 1). These spikes allowed for the dynamic evacuation of products from the S-BC into the T-BC, which led to reductions in the S-BC lumen size (Fig. 5B). Comparisons with normal CCHH showed similar rhythmic movements (Fig. 5A–C). T-BC underwent contraction/relaxation cycles with no detectable spikes, which may have been related to the tubular nature of BC and the scarcity of S-BC in SCHH (Fig. 5A–D; Supplementary videos 2 and 3).

We further analysed the spike rhythms in the presence of the different compounds. For instance, within 1 h of the HepaRG cell treatment, CPZ induced permanent constriction of the S-BC, whereas fasudil had induced strong dilation (Fig. 6A,B). However, both treatments led to a static state of S-BC that was characterized by the total disappearance of spikes and a loss of connections between the S-BC and T-BC (Fig. 6A–D, Supplementary videos 4 and 5). The ZO-1 protein distribution was used to measure the BC areas. For example, 73% of the S-BC from the cell layers exposed to CPZ had lumen with a size $\leq 50 \mu\text{m}^2$ compared with 41% of the S-BC in untreated cells. However, in the presence of fasudil, up to 46% of the S-BC were $\geq 100 \mu\text{m}^2$ compared with only 13% in untreated cultures (Fig. 6E). These results indicated that alterations occurred in the majority of BC in HepaRG hepatocytes treated with cholestatic drugs.

Alteration of bile flow as a consequence of BC dynamic disorders. To demonstrate that contractile dynamic movements have serious consequences on bile flow activity, we used two labelled BAs, 3α -hydroxy-7- α -itrobenzoxadiazolyl-ursodeoxycholic acid (NBD-UDCA) fluorescent analogue and [^3H]-TA, as well as CDFDA. When the control and treated HepaRG cells were exposed to NBD-UDCA or CDFDA, the effects of the compounds on BA intracellular trafficking and efflux at the canalicular lumen could be detected. After incubation, fluorescent NBD-UDCA and CDF were found in the BC of untreated cells, whereas they were barely detected in the constricted BC of CPZ- and CsA-treated cells or in the large isolated BC cisternae induced by ANIT, DCA and bosentan. However, both fluorescent substrates accumulated in the isolated BC cisternae of fasudil-treated cells, although the clearance of BC was delayed compared with that of untreated cells (Fig. 7A). Indeed, a 2.7-fold higher number of CDF-positive BC were observed within 3 h in the fasudil-treated cells compared with that in the corresponding control cells (Fig. 7A,B). These results indicate a major failure in bile flow that was correlated with an abnormal morphology of BC and a loss of their dynamic movement induced by all of the cholestatic compounds.

All of the tested compounds induced an accumulation of [^3H]-TA in the cell layers. A reduction in BA clearance to 43% ($p < 0.0001$), 13% ($p < 0.0001$), 49% ($p = 0.0002$), 32% ($p < 0.0001$) and 57% ($p = 0.001$) was observed with CPZ, CsA, fasudil, DCA and bosentan, respectively. Importantly, accumulations were not detected after the ANIT treatment (Fig. 7C).

A previous study²³ showed that the addition of TA accelerated the frequency of BC contractions compared with that of untreated cells. Consistent with the increased dynamics of BC, TA loading increased the clearance of [^3H]-TA in a dose-dependent manner to 157% ($p = 0.02$), 207% ($p < 0.0001$) and 216% ($p < 0.0001$) at 10, 50 and 100 μ M, respectively (Fig. 7D). Interestingly, the treatment with 50 μ M CPZ and 50 μ M fasudil lowered the TA-induced increase in [^3H]-TA clearance to 55% ($p = 0.0004$) and 103% ($p = 0.01$), respectively, whereas the 50 μ M TA treatment presented a clearance of 215% (Fig. 7E).

Drug-induced bile flow failure is associated with the modulation of the ROCK pathway. ROCK has pleiotropic functions and primarily regulates cellular contraction, motility, morphology and polarity. We examined potential links between disorders of BC dynamics induced by the tested compounds and the ROCK pathway. Interestingly, BC dilation was observed in the presence of Y-27632 (20 μ M), a specific ROCK inhibitor, indicating a role of ROCK in controlling the morphology of BC (Fig. 8A). Next, we analysed the effects of the tested compounds on ROCK activity after 1 h of treatment. At low concentrations, CPZ and CsA did not significantly modify ROCK activity, whereas both compounds induced up to 2-fold increases of ROCK activity at doses that caused a constriction of BC. However, fasudil inhibited ROCK activity by 50% ($p = 0.01$) and caused a

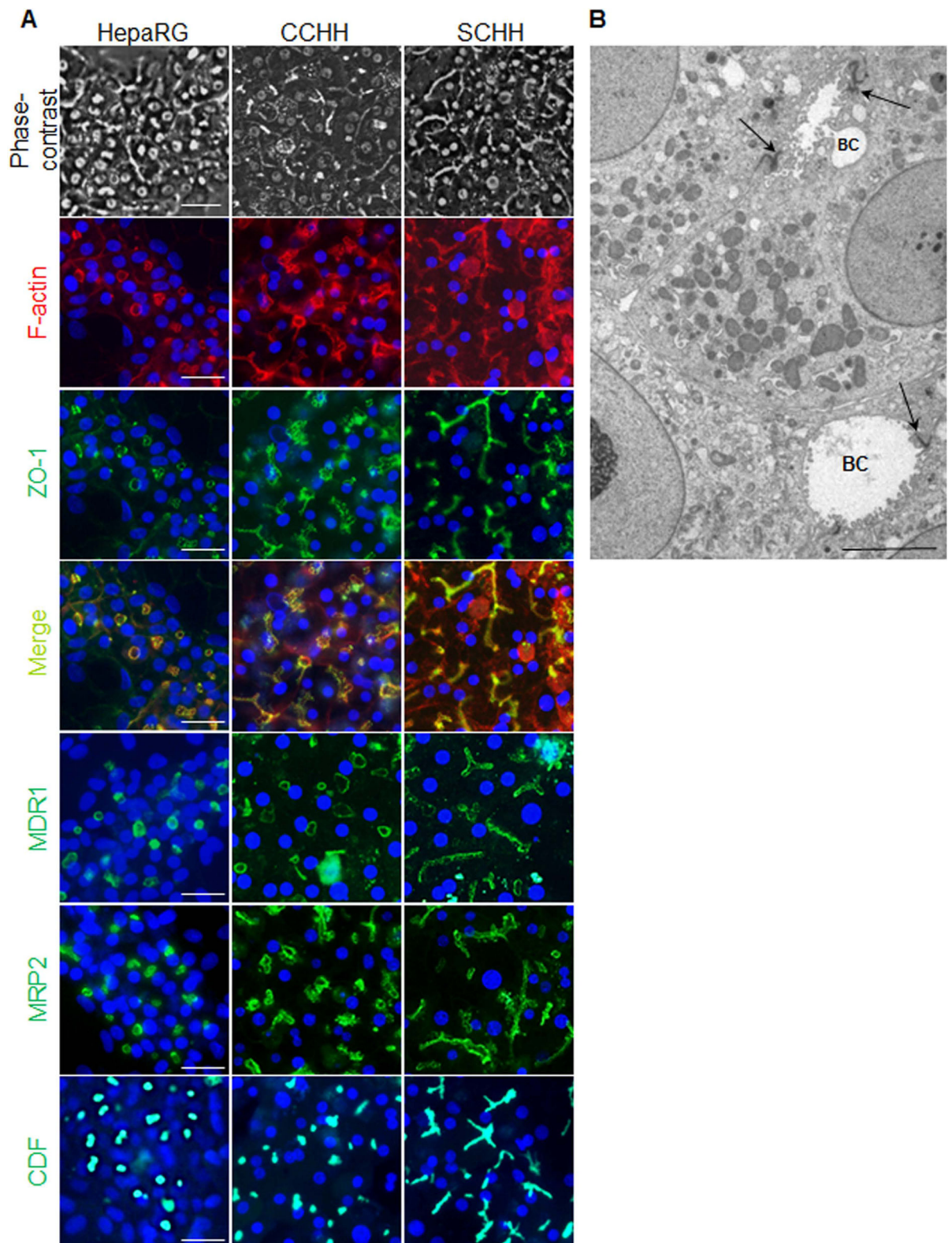


Figure 2. Polarity of human HepaRG and primary hepatocytes. (A) Phase-contrast microscopy examination of the BC in HepaRG hepatocytes, CCHH and SCHH. Rhodamine-phalloidin fluoroprobe staining of pericanalicular F-actin (red); immunolocalization of the junctional ZO-1 protein (green). Merged images showing that the junctional ZO-1 protein (green) co-localizes with the pericanalicular F-actin (red) in HepaRG cells CCHH and SCHH. Immunolocalization of the hepatobiliary transporters MDR1 and MRP2 (green). CDF accumulation in BC (green). Hoechst-labelled nuclei (blue). Fluorescence images were obtained with a Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (bar = 30 μ m). (B) Electron microscopy examination of the tight junctions surrounding BC in HepaRG cells (arrows) (bar = 10 μ m).

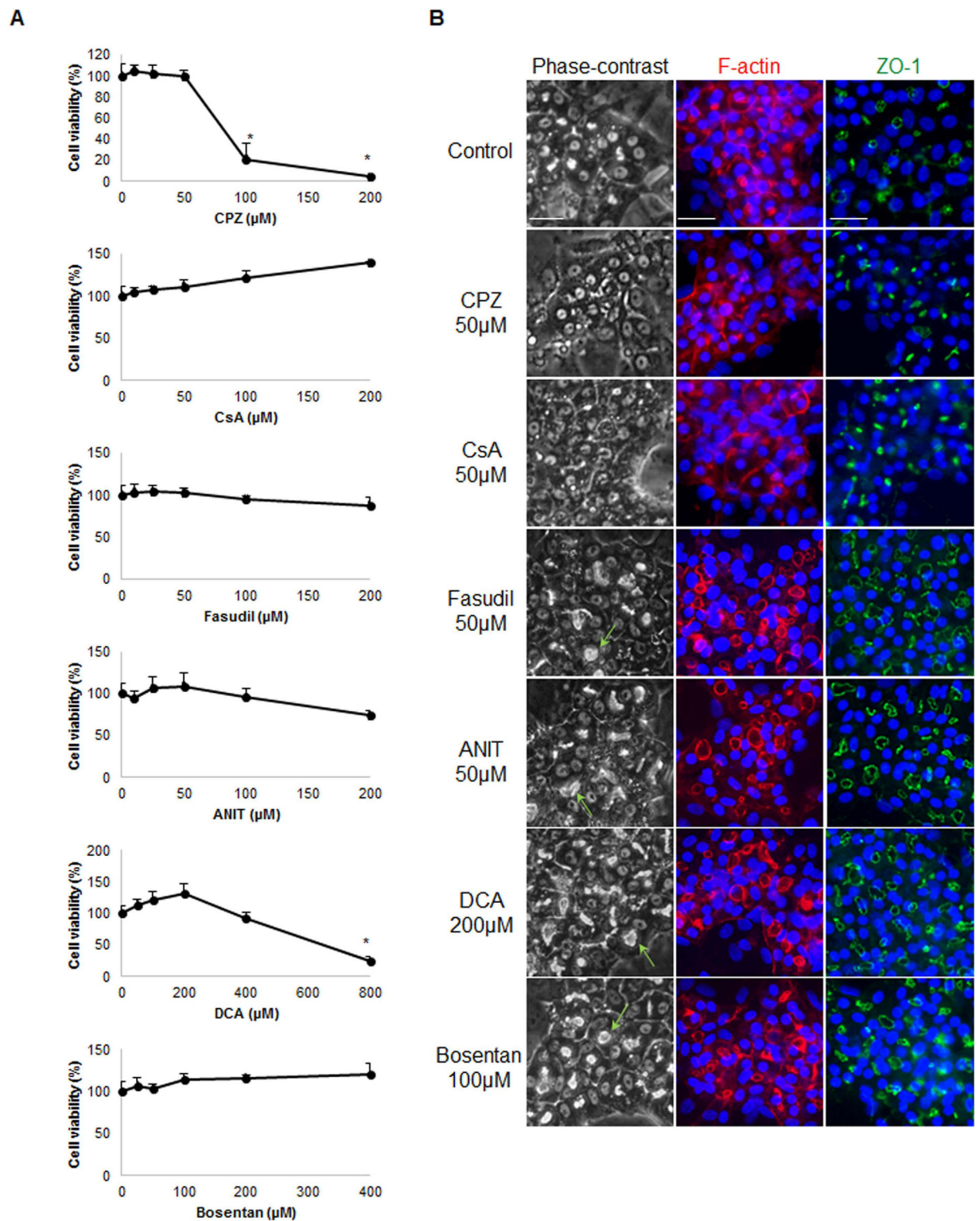


Figure 3. Cytotoxicity evaluation and alteration of the BC morphology by the tested compounds in HepaRG cells. (A) Cells were incubated for 4 h with different concentrations of CPZ (0–200 µM), CsA (0–200 µM), fasudil (0–200 µM), ANIT (0–200 µM), DCA (0–800 µM) and bosentan (0–400 µM). Cytotoxicity was measured by the MTT colorimetric assay. Data were expressed relative to the untreated cells, which were arbitrarily set at a value of 100%. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. (B) Untreated cells and cells treated with 50 µM CPZ, 50 µM CsA, 50 µM fasudil, 50 µM ANIT, 200 µM DCA or 100 µM bosentan. Phase-contrast images were captured after 3 h; BC (arrows); F-actin localized using rhodamine-phalloidin fluoroprobe (red). Immunolabelling of the junctional ZO-1 protein (green) in HepaRG cells treated with the tested compounds compared with that of the control cells. Nuclei stained in blue (Hoechst dye). The images were obtained with a Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (bar = 30 µm).

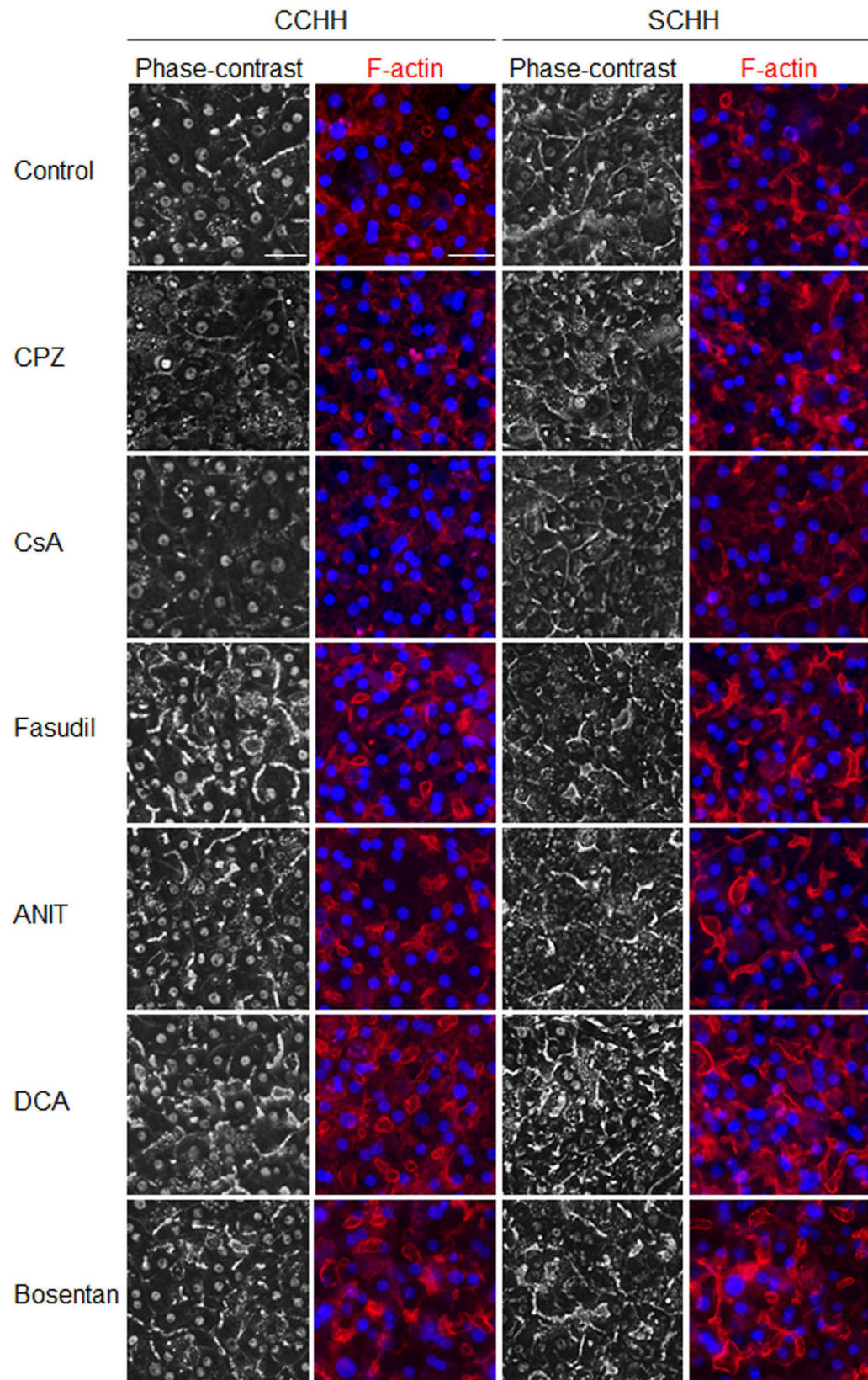


Figure 4. Alteration of the BC morphology by the tested compounds in CCHH and SCHH. Untreated cells and cells treated with 50 μ M CPZ, 50 μ M CsA, 50 μ M fasudil, 50 μ M ANIT, 200 μ M DCA, or 100 μ M bosentan. Phase-contrast images were captured after 3 h. F-actin was localized using a rhodamine-phalloidin fluoroprobe (red). Nuclei stained in blue (Hoechst dye). (bar = 30 μ m).

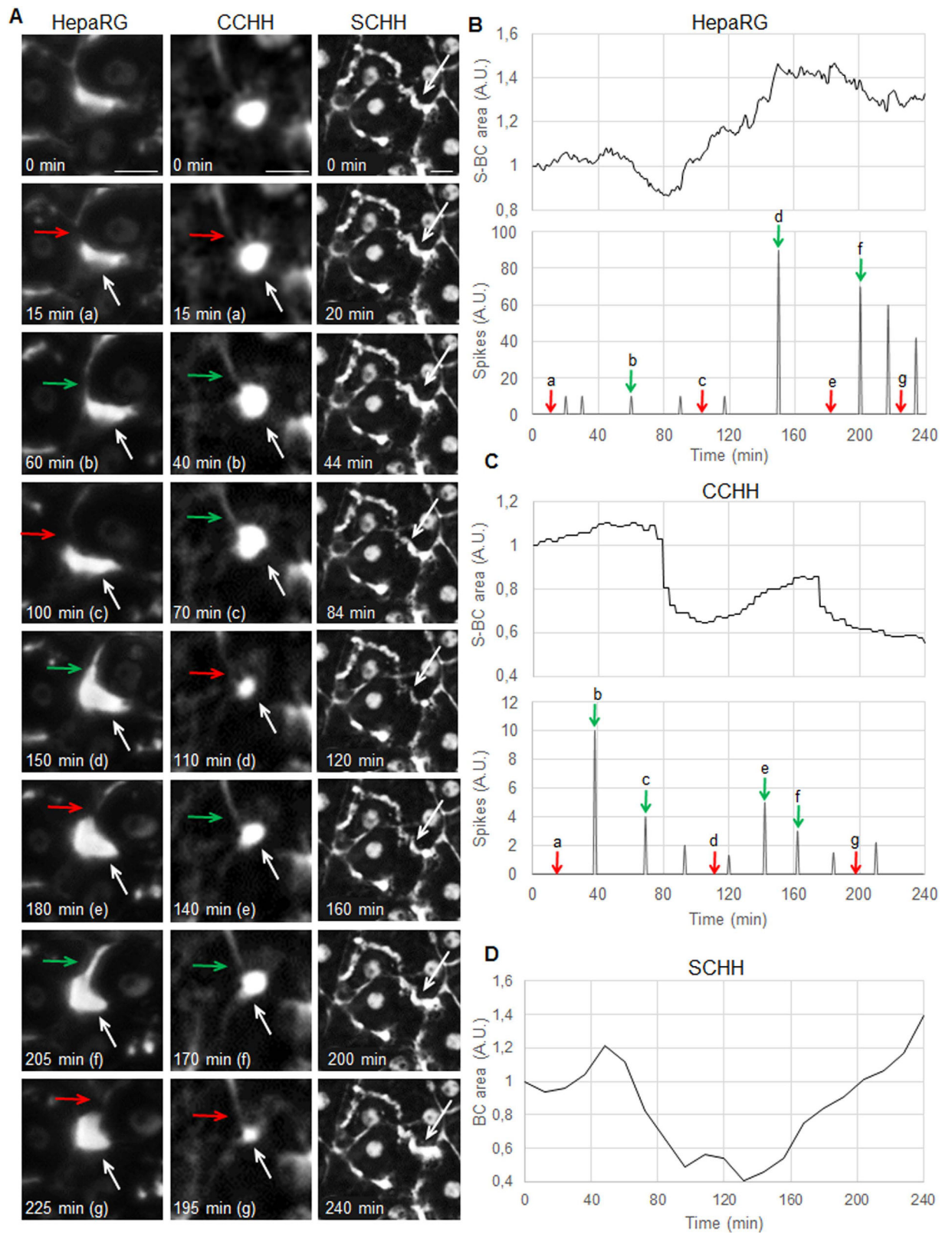


Figure 5. Dynamics of BC in human HepaRG and primary hepatocytes. (A) Time-lapse imaging showing unidirectional rhythmic opening (green arrows) and closing (red arrows) spikes associated with contraction/relaxation of S-BC (white arrows). (B–D) Quantification of S-BC area in arbitrary units (A.U.) and graphic representation of spikes. Imaging was performed using an inverted microscope (bar = 10 μ m), and video analysis was performed using a modelling tool (Tracker 4.87).

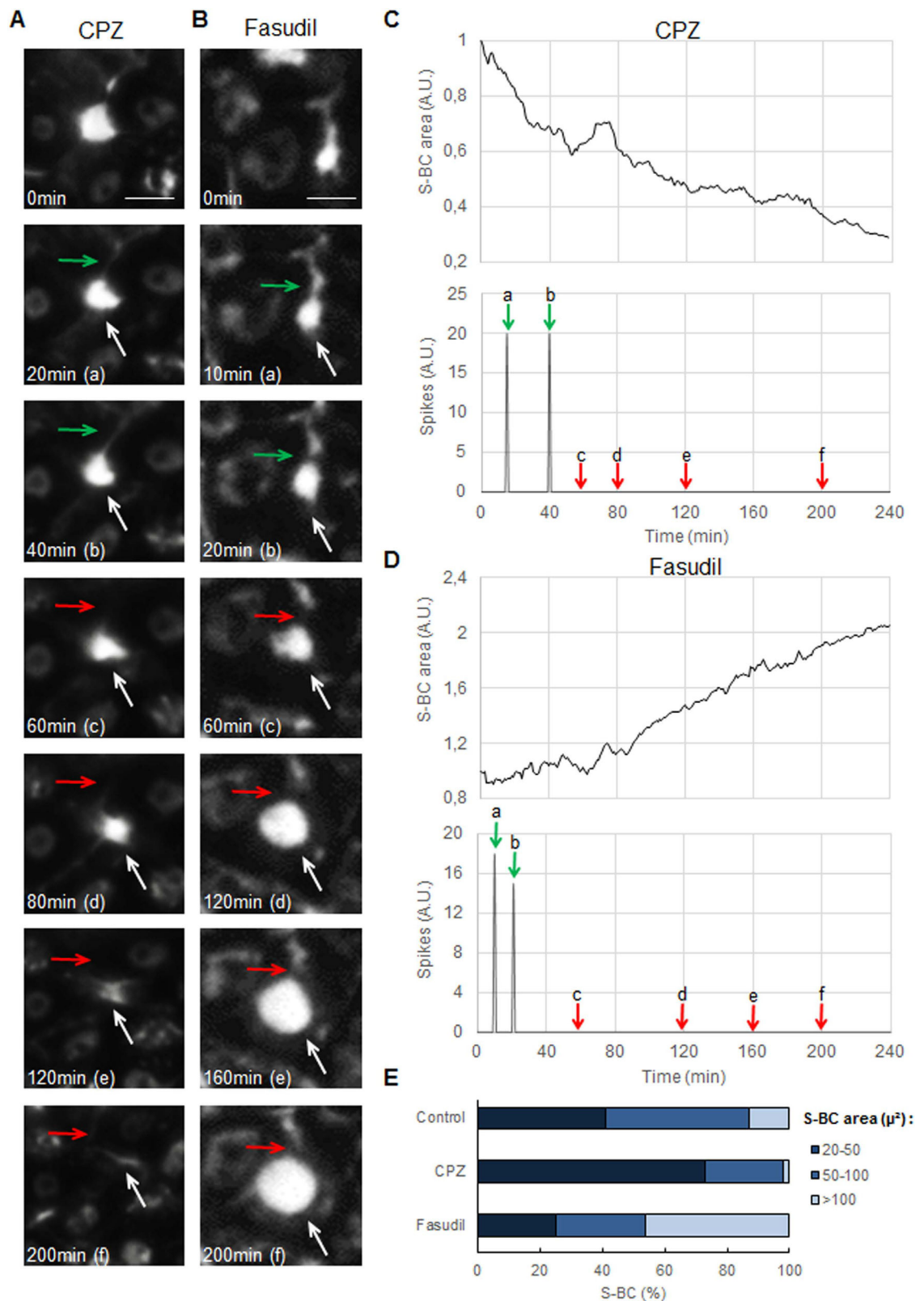


Figure 6. Disruption of BC rhythmic movements in CPZ- and fasudil-treated HepaRG hepatocytes. (A,B) Representative time-lapse imaging of HepaRG cells treated with 50 μ M CPZ or 50 μ M fasudil for 4 h (bar = 10 μ m). (C,D) Quantification of the S-BC area and spikes showing the early disappearance of rhythmic spikes (green/red arrows) with both drugs. Occurrence of permanent constriction of S-BC with CPZ and dilation with fasudil (white arrows). (E) Quantification of the BC area based on ZO-1 protein distribution (as in Fig. 3) using Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader software as described in the Materials and Methods. The BC were grouped into 3 categories according to their area.

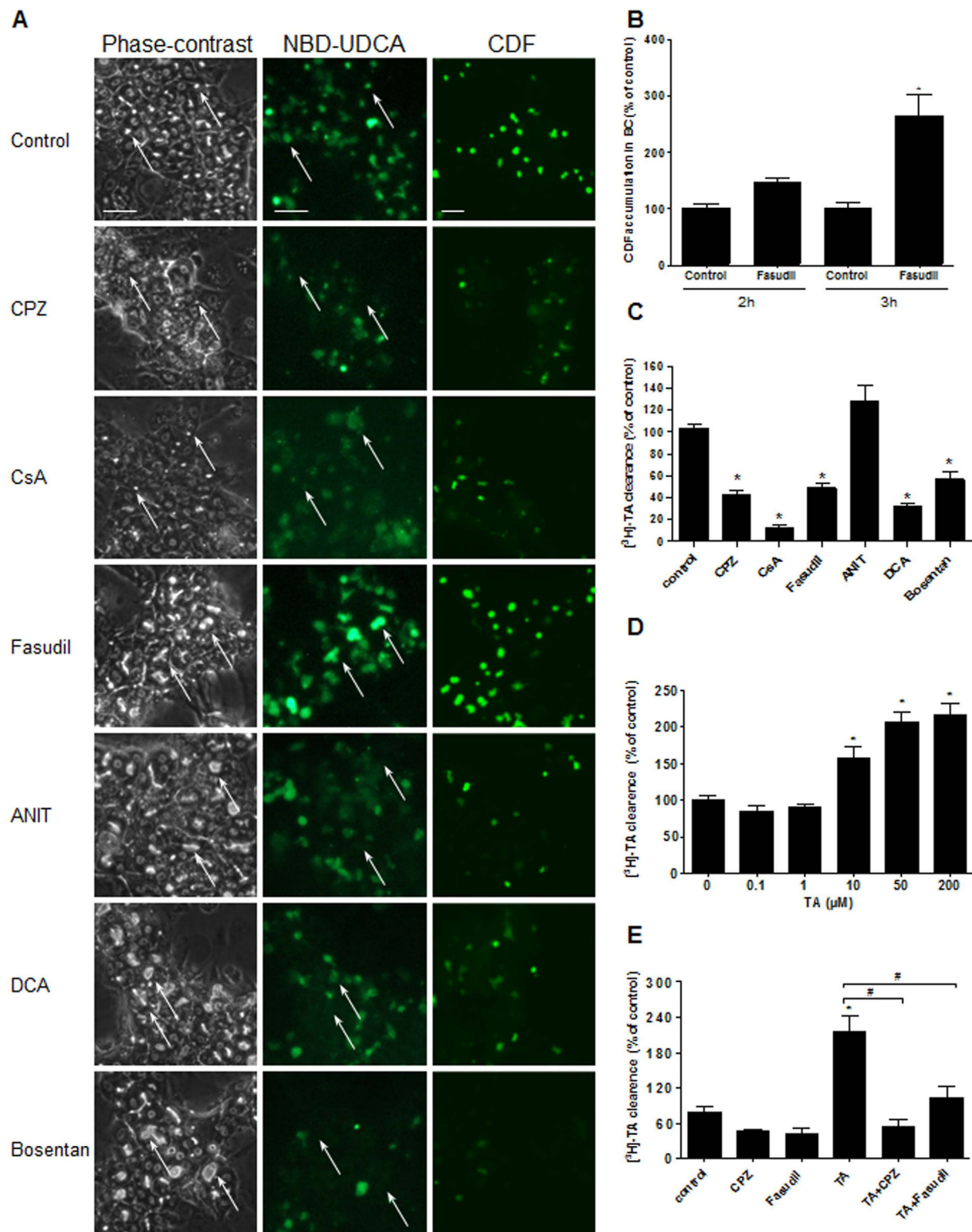


Figure 7. Effects of the tested compounds on BA clearance. (A) NBD-UDCA and CDF efflux. White arrows indicate fluorescence in the BC (bar = 30 μm). **(B)** Quantification of CDF accumulation in the BC after fasudil treatment. **(C,D)** [³H]-TA clearance in the HepaRG cells treated for 2 h with either the tested compounds or different concentrations of unlabelled TA. **(E)** [³H]-TA clearance in the cells treated with either CPZ or fasudil or co-treated with unlabelled TA. The data were expressed relative to that of the untreated cells arbitrarily set at 100%. The data represent the means ± SEM of 3 independent experiments. **p* < 0.05 compared with that of the untreated cells, #*p* < 0.05 compared with that of TA (50 μM) alone.

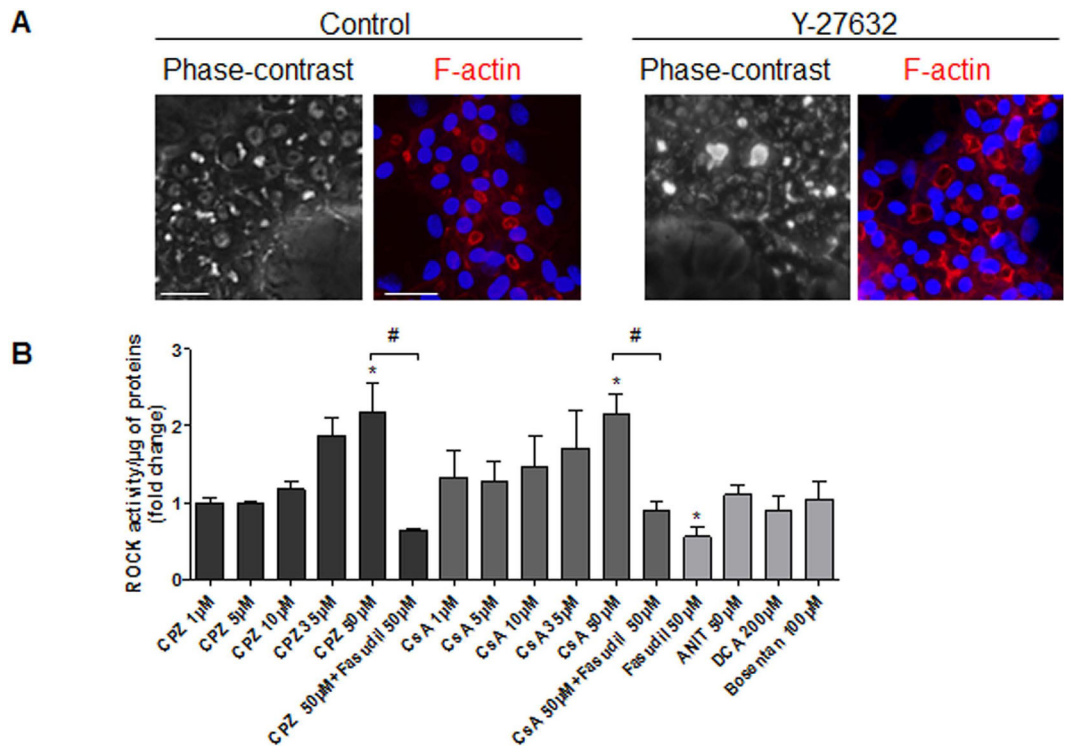


Figure 8. Alteration of ROCK activity by the tested compounds. (A) Untreated and 20 µM Y-27632-treated cells. Phase-contrast images were captured after 3 h. F-actin was localized using a rhodamine-phalloidin fluorophore (red). Hoechst-labelled nuclei are shown in blue (bar = 30 µm). Note the BC dilation in the presence of Y-27632 cells. (B) ROCK activity after a 1-h treatment of HepaRG cells using a ROCK activity assay Kit (Millipore, catalogue CSA001). The data were expressed relative to that of the untreated cells and are represented as the means ± SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ compared with that of the untreated cells, # $p < 0.05$ compared with that of either CPZ (50 µM) or CsA (50 µM) alone.

strong dilation of BC, which was expected. No significant ROCK inhibition was observed with ANIT, DCA and bosentan (Fig. 8B).

Drug-induced bile flow failure is associated with altered myosin II activation. Non-muscle myosin II is an actin-based motor protein that is controlled by ROCK. Phosphorylation of MLC2, the regulatory subunit of myosin II, at serine-19 results in increased myosin ATPase activity and acto-myosin contractility²⁴. We postulated that the dynamic movements of BC could be controlled by pericanalicular myosin activity. First, we used the myosin heavy chain ATPase inhibitor BDM (20 mM) and observed alterations of BC that led to their dilation, which was also observed with fasudil, ANIT, DCA, and bosentan (Fig. 9A). Further analysis of the phosphorylation state of MLC2 in the untreated cells demonstrated alternating regular phases of phosphorylation and dephosphorylation of MLC2 every 30–45 min, which were coordinated with BC spikes, indicating a role for myosin II in controlling BC dynamics (Fig. 9B,C). Treatment with the 6 tested compounds resulted in an important disruption of the MLC2 phosphorylation/dephosphorylation rhythm. Treatment with CPZ and CsA induced permanent MLC2 phosphorylation and led to permanent constriction of the S-BC. However, fasudil drastically and permanently inhibited MLC2 phosphorylation and caused strong dilation of the BC. This phosphorylation/dephosphorylation rhythm was also inhibited (although to a lesser extent) by ANIT, DCA and bosentan (Fig. 9C). A 2-fold increase in the MLC2 phosphorylation/dephosphorylation frequency was observed in the presence of TA, which was correlated with the increased S-BC contraction/relaxation frequency described above (Fig. 9B).

Both ROCK and MLCK are signalling targets of cholestatic compounds. Because MLCK is coupled to ROCK and shares MLC2 as a common substrate, we evaluated whether MLCK also contributed to BC lumen alterations. In the presence of ML-9 (20 µM), a specific MLCK inhibitor, S-BC dilation was observed (Fig. 10A). Therefore, we hypothesized that although ANIT, DCA and bosentan do not have an effect on ROCK activity, they could act through MLCK inhibition. ANIT, DCA and bosentan alone increased the BC mean area by 1.9 ($p < 0.0001$), 1.56 ($p = 0.0001$) and 1.48 fold ($p = 0.002$) after 3 h of exposure, respectively. Co-treatment with calmodulin (CaM), a primary MLCK activator, counteracted the BC dilation induced by the 3 compounds, and CaM completely prevented the inhibition of [³H]-TA clearance induced by bosentan and DCA (Fig. 10D). Moreover, co-treatment with bosentan and ML-9 did not present an additive effect on BC dilation, indicating that the two compounds exerted their effect via the same MLCK enzyme target. However, CaM did not exert a protective effect against fasudil-induced dilation, indicating that fasudil did not act via MLCK, whereas bosentan combined with fasudil had an additive effect on BC dilation and resulted in a 1.89-fold ($p = 0.01$) increase in the

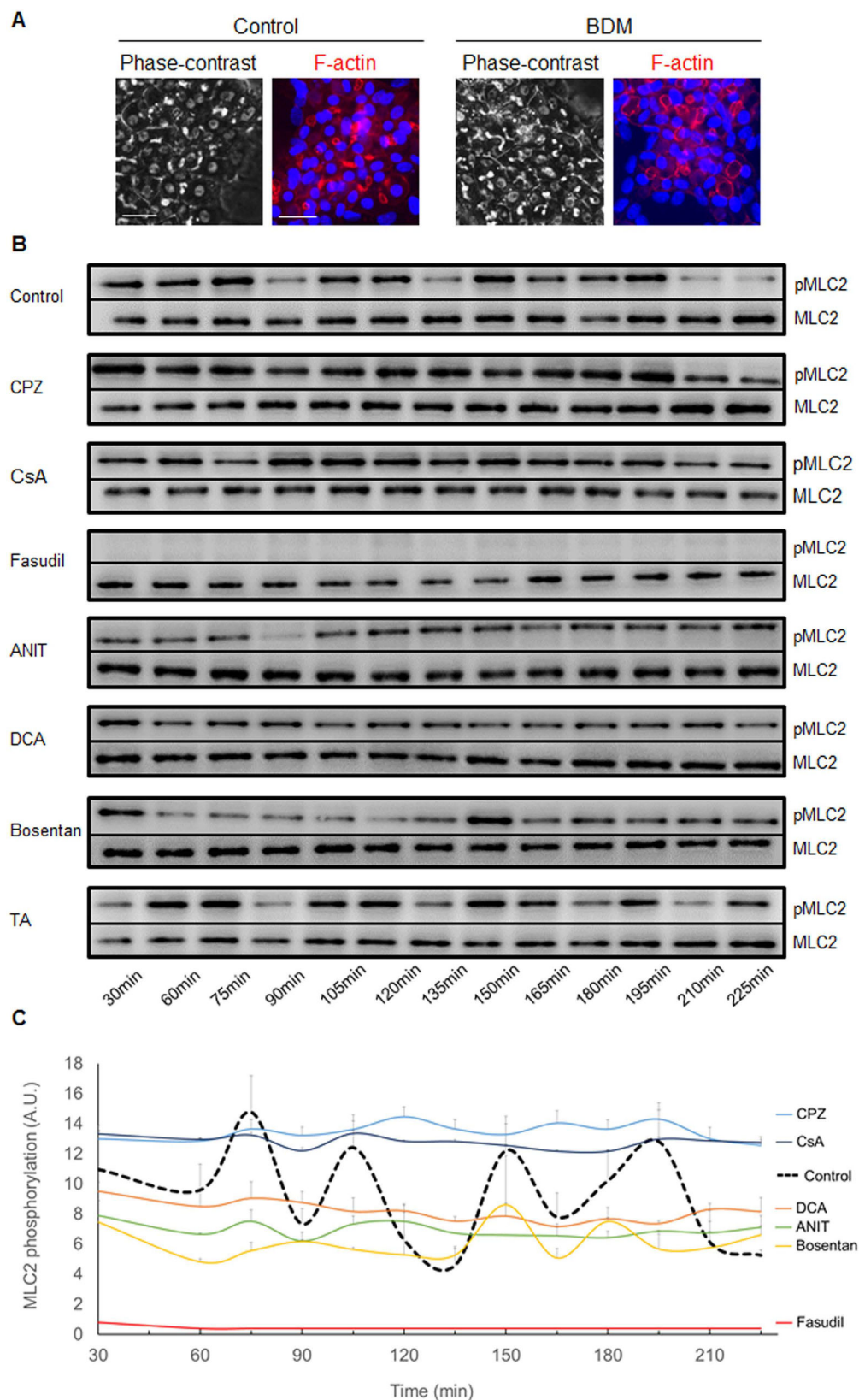


Figure 9. Alteration of MLC2 phosphorylation/dephosphorylation rhythms by the tested compounds. (A) Untreated and 20 mM BDM-treated HepaRG cells. Phase-contrast images were captured after 3 h. F-actin was localized using a rhodamine-phalloidin fluoroprobe (red). Hoechst-labelled nuclei are shown in blue (bar = 30 μ m). (B) Representative western blots of the p-MLC2/total MLC2 forms at various time points. (C) Graphic representation of MLC2 phosphorylation/dephosphorylation quantified using ImageJ 1.48 software. The data were expressed in arbitrary units (A.U.) and represented as the means \pm SEM of 3 independent experiments.

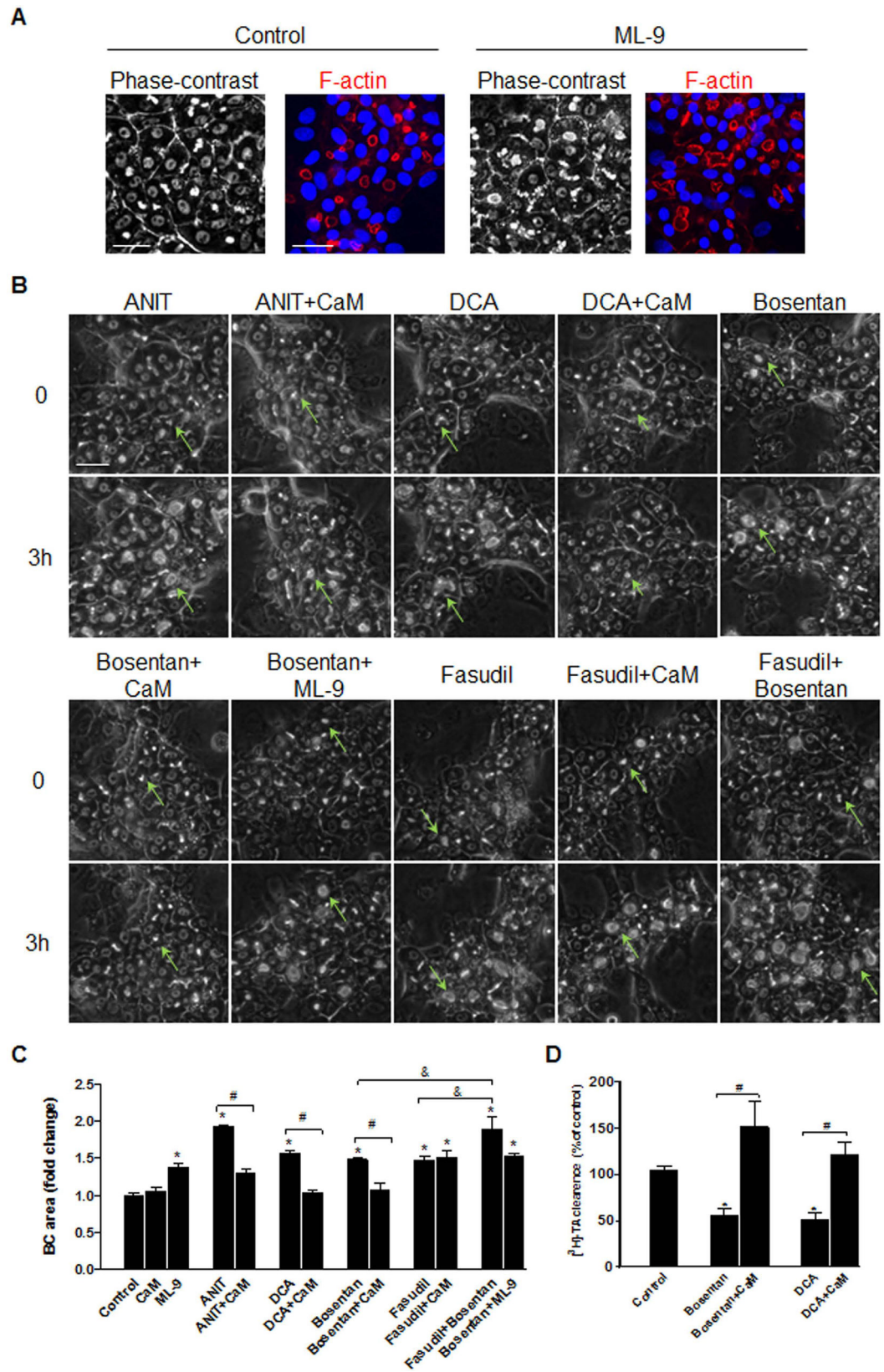


Figure 10. Alteration of the MLCK pathway with the tested compounds. (A) HepaRG cells exposed to 20 μ M ML-9 for 3 h and the controls: phase-contrast microscopy and F-actin localization (bar = 30 μ m). Note the BC dilation in the presence of ML-9 cells. (B) Time-lapse imaging of HepaRG cells treated with ANIT, DCA, fasudil or bosentan alone, co-treated with 5 μ M CaM; or treated with bosentan + ML-9 or fasudil (bar = 30 μ m); BC: green arrows. (C) Quantification of the BC area using ImageJ 1.48 software as described in the Materials and Methods. The data were expressed as the fold change in the BC mean area after 3 h relative to the mean area at

T0 (means \pm SEM of 3 independent experiments). * $p < 0.05$ compared with that of the untreated cells, # $p < 0.05$ compared with that of the cultures treated with either ANIT, DCA or bosentan alone. &#p < 0.05 compared with that of the cultures treated with both bosentan and fasudil. (D) [^3H]-TA clearance in HepaRG cells treated with bosentan and DCA alone or co-treated with CaM for 2 h. The data were expressed relative to that of the untreated cells arbitrarily set at 100% and are presented as the means \pm SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ compared with that of the untreated cells, # $p < 0.05$ compared with that of the cultures treated with either bosentan or DCA alone.

mean area compared with the 1.48-fold and 1.47-fold increases with bosentan and fasudil alone, respectively. These results indicate that these compounds acted via distinct MLCK and ROCK enzymatic targets (Fig. 10B,C).

Discussion

Cholestasis is a complex multifactorial disease with distinct characteristics. However, its main feature is its frequent association with abnormal BA elimination. Many authors have attempted to predict drug-induced cholestasis based on direct inhibition of the major canalicular BA transporters. Unfortunately, this approach is poorly predictive because many cholestatic drugs do not directly interfere with BA canalicular efflux transporters^{25–28}. In the current work, we took advantage of metabolically competent human HepaRG and primary hepatocyte cells to demonstrate that drug-induced cholestasis was strongly associated with the deformation and motility failure of BC. In addition, we provided the first demonstration that the ROCK/MLCK pathway plays a critical role in disrupting BC dynamic movements via cholestatic agents.

As observed in the liver *in vivo*²⁹, we found that the biliary saccular lumen and tubular canaliculi structures were reformed in normal cultured hepatocyte monolayers, with biliary saccular lumen primarily occurring at bifurcations in the bile canalicular structures of HepaRG cells and CCHH and tubular BC occurring more frequently in the primary hepatocytes maintained in a sandwich configuration. Moreover, the accumulation of F-actin fibres and specific localization of transporters and junctional proteins contributed to qualifying these characteristically polarized BC in both *in vitro* liver cell models^{30,31}.

Biliary secretion is a complex process involving several steps, which include translocating BA across the basolateral membrane and then trafficking through the cytoplasm, transporting across the canalicular membrane, and effluxing out of the canalicular lumen. The motility of BC was mainly demonstrated in isolated hepatocyte couples³² and has been reported to play a role in bile flow in rat hepatocytes both *in vitro* and *in vivo*³³. For instance, it has been shown that interference in acto-myosin interactions by phalloidin, cytochalasin or lithocholic acid decreases the rate of spontaneous contractions of BC and reduces the flow of bile^{34–36}. Herein, time-lapse microscopy was used to study human HepaRG and primary hepatocytes, and we observed contractions of BC characterized by repeated opening and closing processes as well as the unidirectional expulsion of what appeared to be bile products from the S-BC to a proximal small T-BC. Importantly, the contractions appeared to be essential for the clearance of BAs. TA loading resulted in an increased frequency of BC contractions accompanied by the increased efflux activity of TA, which is a strong evidence that these contractions have a role in bile flow²³. The electron microscopy observations of neighbouring BC with different sizes also supported the occurrence of BC contractions.

One important observation of the present work was that BC motile activity was rapidly inhibited by exposure to various cholestatic compounds. By performing a comparative analysis of the 6 compounds, our study showed that BC could be deformed early depending on the tested compounds. Thus, for the first time, two main classes of cholestatic drugs could be distinguished, one that includes CPZ and CsA and induces canalicular lumen constriction and another that includes fasudil, ANIT, DCA and bosentan and induces canalicular lumen dilation. Interestingly, both classes of cholestatic drugs were associated with strong impairments of contractile movements. Under similar experimental conditions, the two non-cholestatic hepatotoxic drugs paracetamol and amiodarone did not cause obvious BC alterations (not shown). Noticeably, BC constriction as observed with CPZ and CsA might represent severe effects related to the induction of oxidative and endoplasmic reticulum stress at high drug concentrations, which ultimately lead to cell death as previously reported^{18,19}. Further investigations of a large series of cholestatic and non-cholestatic drugs are needed to identify the mechanisms underlying these irreversible effects.

A failure of bile secretion fundamentally defines cholestatic disease and is associated with morphological and contractile disorders. Three main observations support the occurrence of bile secretion failure. i) Abnormal intracellular accumulation of [^3H]-TA in the presence of CPZ and CsA as well as with fasudil, DCA and bosentan. This accumulation was dose-dependent regardless of whether these drugs constricted or dilated the canalicular lumen, and similar results have been reported with CPZ and CsA^{18–20}, while this is the first description of the adverse outcome induced by the widely-used drug fasudil. ii) Concomitant markedly diminishment of BA clearance as indicated by the efflux of fluorescent NBD-UDCA in the presence of CPZ and fasudil. However, these deformed BC (constricted or dilated) appeared as inert cisternae without the ability to undergo dynamic contractions and opening in a rhythmic manner to discharge their contents, which was observed in the control BC. This result supports the hypothesis that impaired contractile movements of canalicular lumens are critical for clearance deficiencies. iii) Impairment of the compensatory feedback control of BA clearance in the presence of cholestatic drugs, which was shown with TA loading.

Because the functional basis of BC contraction/relaxation dynamics is mediated by actin filaments, cholestatic drugs would be expected to alter contractile movements, and this led us to identify the molecular mechanisms controlling myosin ATPase activity, which is a key step in the development of acto-myosin-based contractile forces. Motor myosin II activity is mainly controlled by phosphorylation of its light chain. Therefore, we investigated the two classes of enzymes, MLC kinases and Rho-kinases, which are known to be the major kinases that

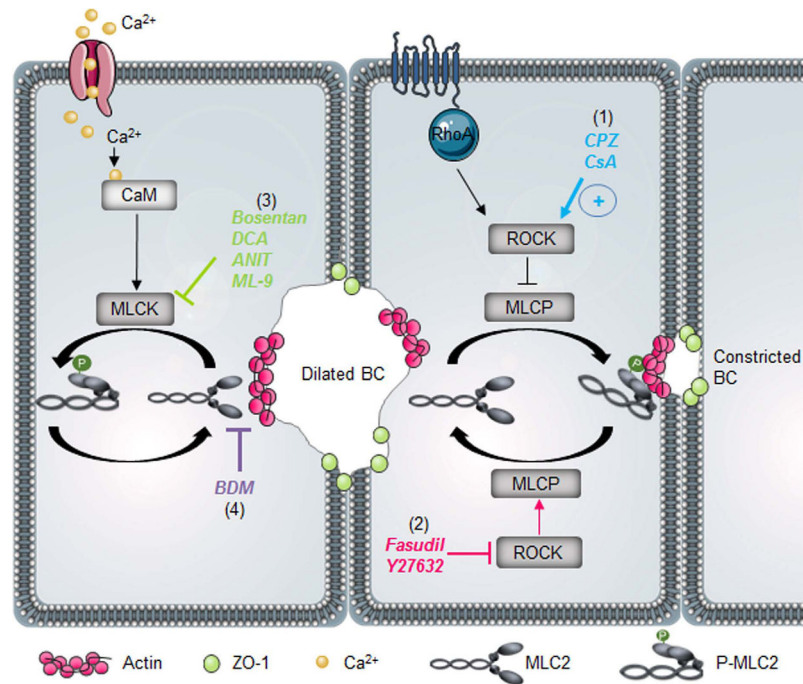


Figure 11. Schematic representation of the main molecular targets of the tested cholestatic compounds in the ROCK/MLCK pathway. (1) CsA and CPZ induced the activation of ROCK activity and maintained abnormally high MLC2, thereby leading to BC constriction. However, (2) fasudil and Y-27632 inhibited ROCK activity and caused MLC2 dephosphorylation, thereby leading to BC dilation. (3) DCA, ANIT, bosentan and ML-9 inhibited Ca^{2+} /CaM-dependent MLCK instead of ROCK and led to BC dilation. (4) BDM inhibited myosin II heavy chain ATPase activity and disrupted acto-myosin interaction causing BC dilation. ROCK, Rho-kinase; Ca^{2+} , calcium; CaM, calmodulin; MLCK, myosin light chain kinase; MLCP, myosin light chain phosphatase; MLC, myosin light chain; BC, bile canaliculi.

phosphorylate MLC *in vitro* and *in vivo*^{37,38}. This work provides the first evidence that the ROCK/MLCK pathway and its associated enzymes are major targets of the cholestatic compounds that lead to deformation of the apical lumen and impairment of contractile movements. This conclusion is supported by the following evidence: (i) time-dependent alternations of MLC2 phosphorylation/dephosphorylation states in untreated cells were coordinated with the contraction frequency of BC; (ii) TA treatment increased the frequency of BC contractions and MLC2 phosphorylation/dephosphorylation and also increased the clearance of radiolabelled [^3H]-TA; (iii) activation of ROCK activity was observed as early as 1 h after exposure to either CsA or CPZ and maintained an abnormally high MLC2 phosphorylation level; (iv) prevention of CsA- and CPZ-induced activation of ROCK by fasudil; (v) rapid, drastic and permanent MLC2 dephosphorylation leading to BC dilation by the stable and potent ROCK inhibitor fasudil; (vi) reduction of MLC2 phosphorylation by DCA, ANIT and bosentan, which was similar to that of fasudil although to a lower extent, and abrogation of the phosphorylation/dephosphorylation dynamics by targeting Ca^{2+} /CaM-dependent MLCK instead of ROCK; and (vii) regulation of BC by actin via a contribution of the myosin II heavy chain ATPase as indicated by the effect of BDM, an inhibitor of this enzyme, which clearly mimicked MLCK and ROCK inhibitors by inducing BC dilation, thereby making this enzyme another potential signalling target for cholestatic compounds.

In summary, our work demonstrates that spontaneous rhythmic contractions of BC are essential for bile flow. These contractions are correlated with the rhythm of MLC2 phosphorylation/dephosphorylation. By targeting distinct regulators of the ROCK/MLCK/myosin pathway, cholestatic compounds with diverse chemical structures and therapeutic properties can induce alterations in the contractile movements of BC and impairments in the secretion of BA (Fig. 11). This study highlights new insights into the mechanisms underlying the disruption of BA secretion and identifies new potential predictive biomarkers for drug-induced cholestasis.

Materials and Methods

Reagents. Cyclosporine A (CsA), chlorpromazine (CPZ), deoxycholic acid (DCA), 2,3-butanedione monoxime (BDM), 1 α -naphthyl isothiocyanate (ANIT), methylthiazolotetrazolium (MTT), 4-(1-Aminoethyl)-N-(4-Pyridyl) cyclohexanecarboxamide dihydrochloride (Y-27632), 1-(5-Chloronaphthalene-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine hydrochloride (ML-9), taurocholic acid (TA) and 5 (and 6)-carboxy-2,7-dichlorofluorescein diacetate (CDFDA) were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Rho-associated kinase (ROCK) activity assay Kit was from Merck Millipore (Fontenay sous Bois, France). 3 α -hydroxy-7-nitrobenzoxadiazolyl-ursodeoxycholic acid (NBD-UDCA) fluorescent analogue was a gift from Pr A. F. Hoffmann (San Diego, USA). Fasudil (HA-1077) was purchased from BPS Bioscience (Le Perray En Yvelines, France). Bosentan was obtained from Sequoia Research Products (Pangbourne, U.K.). Calmodulin

(CaM) was from Merck Chemicals (Fontenay sous Bois, France). Phalloidin fluoprobe was purchased from Interchim (Montluçon, France). [³H]-Taurocholic acid ([³H]-TA) was from Perkin Elmer (Boston, MA, USA). Specific antibodies against Phospho-Myosin Light Chain 2 (Ser19) (diluted 1:1000, catalog 3675), total MLC2 (diluted 1:1000, catalog 8505) were purchased from Cell Signalling Technology (Schuttersveld, Netherlands). Anti-multidrug-resistance-protein 1 (MDR1) (diluted 1:50, catalog 517310) was obtained from Calbiochem (Saint Aubin, France). Anti-zona occludens protein 1 (ZO-1) (diluted 1:500, catalog 610966) antibody was obtained from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Anti-MRP2 (1:200, catalog 3373) antibody was from Abcam (Cambridge, UK). Secondary antibodies (diluted 1:500) were purchased from Invitrogen (Saint Aubin, France). Hoechst dye was from Promega (Madison, WI, USA). Other chemicals were of reagent grade.

Cell cultures. HepaRG cells were seeded at a density of 2.6×10^4 cells/cm² in Williams' E medium supplemented with 2 mM glutamax, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10% HyClone foetal calf serum, 5 µg/mL insulin, and 50 µM hydrocortisone hemisuccinate. At confluence (after 2 weeks), the HepaRG cells were shifted to the same medium supplemented with 1.7% dimethyl sulfoxide for 2 additional weeks to obtain confluent differentiated cultures containing equal proportions of hepatocyte-like and progenitor/primitive biliary-like cells^{39,40}. These differentiated hepatic cell cultures were used for the analytical assays.

Human hepatocytes were obtained from Biopredic International (St Gregoire, France), who holds all permits required for the acquisition and transformation of human biological materials to be used in research (AC-2007-43/law CSP L1245-2/IE-2011-566). Informed consents were obtained from all subjects (Center of Biological Resources, Rennes, France, BB-0033-00,056). Research protocols were performed in accordance with French legal guidelines (French Ministry of Health). All the experimental protocols with human hepatocytes were approved by the local institutional committee (Pontchaillou Hospital, Rennes, France). The hepatocytes were isolated by collagenase perfusion of histologically normal liver fragments from 4 adult donors undergoing resection for primary and secondary tumours. The primary cultures were obtained by hepatocyte seeding at a density of 1.5×10^5 cells/cm² onto collagen-precoated plates in Williams' E medium supplemented as detailed above except for the addition of 10% foetal calf serum and 1 µg/ml bovine serum albumin. The medium was discarded 12 h after cell seeding, and the cultures were then maintained in the same medium as for the HepaRG cells and designated as conventional cultured HH (CCHH), or maintained for 24 to 48 h and then washed with cold medium and overlaid with matrigel at a concentration of 0.25 mg/mL in ice-cold Williams' E medium for the preparation of sandwich cultured HH (SCHH). The medium of both the CCHH and SCHH preparations was renewed daily. The CCHH and SCHH were prepared from the same donors and analysed in parallel. The SCHH cultures were used after at least a 3 day-matrigel overlay.

Immunolabelling. The cells were washed with warm phosphate buffered saline (PBS), fixed with either methanol for 15 min at -20°C or with 4% paraformaldehyde for 20 min, and then washed three times with cold PBS. After paraformaldehyde fixation, the cells were permeabilized for 20 min with 0.3% Triton X-100 in PBS followed by a 1 h incubation in PBS containing 1% bovine serum albumin and 5% normal donkey serum. The cells were then incubated overnight with primary antibodies directed against MDR1, MRP2 and ZO-1 and diluted in PBS containing 1% bovine serum albumin and 5% normal donkey serum. After washing with cold PBS, the cells were incubated for 2 h with mouse or rabbit Cy[®]5-labelled secondary antibodies (excitation/emission: 649/670 nm). Finally, the cells were again washed with cold PBS and incubated with a rhodamine-phalloidin fluoroprobe SR101 (200 U/ml) (excitation/emission: 540/565 nm) diluted at 1/100 for F-actin labelling for 20 min⁴¹. The nuclei were labelled with 5 ng/ml Hoechst dye (excitation/emission: 346/460 nm). Immunofluorescence images were captured using a Celloomics ArrayScan VTI HCS Reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

BC area quantification. The BC area quantification was based on ZO-1 protein immunolabelling and phase-contrast images.

ZO-1 immunolabelling. After capturing the ZO-1 protein immunofluorescence images, the BC were quantified using the Cell Health Profiling V4 bio application of the ArrayScan software (Thermo Scientific). Segmentation was performed by adjusting the shape, area and brightness parameters to eliminate non-corresponding objects. Based on their areas (labelled objects), the BC were classified into 3 categories: 20–50, 50–100 and $> 100 \mu\text{m}^2$ (Supplementary Fig. 1). An analysis was performed on 10 images per condition.

Phase-contrast images. The mean BC areas were determined from 3 zones per condition using ImageJ 1.48 software at T0 and after 3 h of compound exposure. Briefly, after capturing the time-lapse images, bright objects corresponding to BC were segmented by adjusting the shape and area parameters to exclude non-corresponding objects. The data are presented as the fold change in the BC mean area after 3 h relative to their mean area at T0.

Electron microscopy. HepaRG cells were fixed by the addition of 2.5% glutaraldehyde for 30 min. After fixation, the specimens were rinsed with 0.2 M Na cacodylate buffer and post-fixed with 2% osmium tetroxide for 30 min. After further rinsing, the samples were dehydrated, infiltrated with a mixture of acetone-eponate (50/50) and embedded in DMP30-Eponate. Ultrathin sections were examined with a JEOL 100CX II electron microscope⁴².

Western blotting analysis of MLC2 phosphorylation. The HepaRG cells were treated with the 6 tested compounds for different time points (0–225 min), washed with cold PBS, and finally suspended in cell lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche, Mannheim, Germany). Aliquots containing an equivalent total protein content as determined by the Bradford procedure with bovine serum albumin as the standard were subjected to sodium dodecyl sulfate/12% polyacrylamide gel electrophoresis, electrotransferred to Immobilon-P membranes, and incubated overnight with primary antibodies directed against p-MLC2 and total MLC2 (dilution: 1/1000). After exposure to a horseradish peroxidase conjugated anti-mouse/rabbit antibody

(dilution: 1/5000) (Dako, Les Ulis, France), the membranes were incubated with a chemiluminescence reagent (Millipore, Billerica, MA, USA) and the bands were then visualized with Fusion-Capt software (Vilber Lourmat, Marne La Vallée, France) and quantified using ImageJ 1.48.

CDF clearance. The cells were washed with warm Williams' E medium without phenol red and incubated in 3 μ M CDFDA for 30 min at 37 °C in the same medium used for passive intracellular accumulation. Upon hydrolysis by the intracellular esterases, CDFDA was converted to fluorescent CDF (excitation/emission: 488/509 nm) and directed towards the biliary pole by membrane transporters, particularly MRP2. Then, after washing, the cells were treated with the 6 compounds for 2 and 3 h and imaging was performed using a Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (Thermo Scientific).

NBD-UDCA clearance. The cells were washed with warm Williams' E medium without phenol red and incubated in 5 μ M NBD-UDCA (excitation/emission: 488/509 nm) for 30 min at 37 °C in Williams' E medium without phenol red. NBD-UDCA is secreted into BC by membrane transporters, mainly BSEP⁴³. Then, after washing, the cells were treated with the 6 compounds for 2 h and imaging was performed using an inverted microscope (Zeiss Axiovert 200M and AxioCam MRm).

Taurocholate acid clearance. To investigate the effect of the compounds on TA clearance from the cell layer, the cells were first exposed to 43.3 nM [³H]-TA for 30 min to induce its intracellular accumulation, washed with standard buffer and then incubated with the tested compounds for 2 h in a standard buffer containing Ca²⁺ and Mg²⁺. After incubation, the cells were washed and scraped in 0.1 N NaOH, and the remaining radiolabelled substrate was measured through scintillation. [³H]-TA clearance was determined based on its accumulation in the cell layers (cells + BC) and calculated relative to the control using the following formula: [³H]-TA clearance = [³H]-TA accumulation in (cells + BC)_{Control} / [³H]-TA accumulation in cell layer_{Tested compound} * 100.

Time-lapse cell imaging. Phase-contrast images of the HepaRG cells, CCHH and SCHH were captured every minute using time-lapse phase-contrast videomicroscopy. An inverted microscope (Zeiss Axiovert 200 M) was equipped with a thermostatic chamber (37 °C and 5% CO₂) to maintain the cells under normal culture conditions. The images were captured with an AxioCam MRm camera.

BC dynamics analysis. Contraction/relaxation activity and the opening/closing rhythm of BC (spikes) were evaluated by time-lapse cell imaging and quantified by a software video analysis and a modelling tool (Tracker 4.87). Briefly, circular frames delimiting S-BC and the connections S-BC/T-BC were manually designed using the free hand selection tool of Tracker 4.87 to track and record brightness variations. These records reflected the area of S-BC and spikes at the connections between S-BC and T-BC (Supplementary Fig. 2).

ROCK activity. ROCK activity was measured with a Rho-associated kinase activity assay Kit (Millipore, catalogue CSA001) according to the manufacturer's protocol with certain modifications. Briefly, HepaRG cells were treated with the tested compounds. After 1 h, the cells were lysed with a lysis buffer supplemented with anti-protease, and then 50 μ L of the lysate was deposited in 96-well multi-strip plates pre-coated with MYPT1 supplied with 10 mM DTT, 2 mM MgCl₂ and 10 mM ATP for 60 min at 30 °C. An anti-phospho-MYPT1 (Thr696) antibody was added for 1 h, and then goat anti-rabbit IgG HRP secondary antibody was added for another 1 h, and chromogenic substrate tetra-methylbenzidine (TMB) was added for 15 min. Absorbance at 450 nm reflected the relative amount of ROCK activity in the sample, which was evaluated relative to the total protein content of each sample.

Cell viability. Cytotoxicity was evaluated by the MTT colorimetric assay. Briefly, the cells were seeded in 96-well plates and treated with various concentrations of the compounds in triplicate for 4 h. After removing the medium, 100 μ l of serum-free medium containing MTT (0.5 mg/ml) was added to each well and incubated for 2 h at 37 °C. The water-insoluble formazan was dissolved in 100 μ l dimethyl sulfoxide, and absorbance was measured at 550 nm.

Statistical analysis. A one-way ANOVA with a multiple comparison test (GraphPad Prism 5.00) was performed to compare the data. Each value corresponded to the mean \pm SEM of three independent experiments. Data were considered significantly different at $p < 0.05$.

References

1. Padda, M. S., Sanchez, M., Akhtar, A. J. & Boyer, J. L. Drug-induced cholestasis. *Hepatology* **53**, 1377–1387 (2011).
2. Bjornsson, E. S. & Jonasson, J. G. Drug-induced cholestasis. *Clin Liver Dis* **17**, 191–209 (2013).
3. Morgan, R. E. *et al.* A multifactorial approach to hepatobiliary transporter assessment enables improved therapeutic compound development. *Toxicol Sci* **136**, 216–241 (2013).
4. Stieger, B. Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis. *Drug Metab Rev* **42**, 437–445 (2010).
5. Welch, M. A., Kock, K., Urban, T. J., Brouwer, K. L. & Swaan, P. W. Toward predicting drug-induced liver injury: parallel computational approaches to identify multidrug resistance protein 4 and bile salt export pump inhibitors. *Drug Metab Dispos* **43**, 725–734 (2015).
6. Wakabayashi, Y., Dutt, P., Lippincott-Schwartz, J. & Arias, I. M. Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 15087–15092 (2005).
7. Nossaman, B. D. & Kadowitz, P. J. The role of the RhoA/rho-kinase pathway in pulmonary hypertension. *Curr Drug Discov Technol* **6**, 59–71 (2009).
8. Lee, D. L., Webb, R. C. & Jin, L. Hypertension and RhoA/Rho-kinase signaling in the vasculature: highlights from the recent literature. *Hypertension* **44**, 796–799 (2004).

9. Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J. & Pittman, R. N. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* **140**, 627–636 (1998).
10. Isotani, E. *et al.* Real-time evaluation of myosin light chain kinase activation in smooth muscle tissues from a transgenic calmodulin-biosensor mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 6279–6284 (2004).
11. Herrema, H. *et al.* Rho kinase, myosin-II, and p42/44 MAPK control extracellular matrix-mediated apical bile canalicular lumen morphogenesis in HepG2 cells. *Mol Biol Cell* **17**, 3291–3303 (2006).
12. Fu, D., Wakabayashi, Y., Lippincott-Schwartz, J. & Arias, I. M. Bile acid stimulates hepatocyte polarization through a cAMP-Epac-MEK-LKB1-AMPK pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 1403–1408 (2011).
13. Homolya, L. *et al.* LKB1/AMPK and PKA control ABCB11 trafficking and polarization in hepatocytes. *Plos One* **9**, e91921 (2014).
14. Fu, D. *et al.* Coordinated elevation of mitochondrial oxidative phosphorylation and autophagy help drive hepatocyte polarization. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 7288–7293 (2013).
15. Zhou, Q. *et al.* Intrahepatic upregulation of RhoA and Rho-kinase signalling contributes to increased hepatic vascular resistance in rats with secondary biliary cirrhosis. *Gut* **55**, 1296–1305 (2006).
16. Arias, I. M. *et al.* The biology of the bile canaliculus, 1993. *Hepatology* **17**, 318–329 (1993).
17. LeCluyse, E. L., Audus, K. L. & Hochman, J. H. Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol* **266**, C1764–1774 (1994).
18. Antherieu, S. *et al.* Oxidative stress plays a major role in chlorpromazine-induced cholestasis in human HepaRG cells. *Hepatology* **57**, 1518–1529 (2013).
19. Sharanek, A. *et al.* Different dose-dependent mechanisms are involved in early cyclosporine a-induced cholestatic effects in hepaRG cells. *Toxicol Sci* **141**, 244–253 (2014).
20. Sharanek, A. *et al.* Cellular Accumulation and Toxic Effects of Bile Acids in Cyclosporine A-Treated HepaRG Hepatocytes. *Toxicol Sci* **147**, 573–587 (2015).
21. Orsler, D. J., Ahmed-Choudhury, J., Chipman, J. K., Hammond, T. & Coleman, R. ANIT-induced disruption of biliary function in rat hepatocyte couplets. *Toxicol Sci* **47**, 203–210 (1999).
22. Barnwell, S. G., Tuchweber, B. & Yousef, I. M. Biliary lipid secretion in the rat during infusion of increasing doses of unconjugated bile acids. *Biochim Biophys Acta* **922**, 221–233 (1987).
23. Miyairi, M. *et al.* Taurocholate accelerates bile canalicular contractions in isolated rat hepatocytes. *Gastroenterology* **87**, 788–792 (1984).
24. Watanabe, T., Hosoya, H. & Yonemura, S. Regulation of myosin II dynamics by phosphorylation and dephosphorylation of its light chain in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **18**, 605–616 (2007).
25. Morgan, R. E. *et al.* Interference with bile salt export pump function is a susceptibility factor for human liver injury in drug development. *Toxicol Sci* **118**, 485–500 (2010).
26. Dawson, S., Stahl, S., Paul, N., Barber, J. & Kenna, J. G. *In vitro* inhibition of the bile salt export pump correlates with risk of cholestatic drug-induced liver injury in humans. *Drug Metab Dispos* **40**, 130–138 (2012).
27. Pedersen, J. M. *et al.* Early identification of clinically relevant drug interactions with the human bile salt export pump (BSEP/ABCB11). *Toxicol Sci* **136**, 328–343 (2013).
28. Rodrigues, A. D. *et al.* Drug-induced perturbations of the bile acid pool, cholestasis, and hepatotoxicity: mechanistic considerations beyond the direct inhibition of the bile salt export pump. *Drug Metab Dispos* **42**, 566–574 (2014).
29. Wood, R. L. An Electron Microscope Study of Developing Bile Canaliculi in the Rat. *Anat Rec* **151**, 507–529 (1965).
30. Fu, D., Wakabayashi, Y., Ido, Y., Lippincott-Schwartz, J. & Arias, I. M. Regulation of bile canalicular network formation and maintenance by AMP-activated protein kinase and LKB1. *J Cell Sci* **123**, 3294–3302 (2010).
31. Bachour-El Azzi, P. *et al.* Comparative Localization and Functional Activity of the Main Hepatobiliary Transporters in HepaRG Cells and Primary Human Hepatocytes. *Toxicol Sci* **145**, 157–168 (2015).
32. Oshio, C. & Phillips, M. J. Contractility of bile canaliculi: implications for liver function. *Science* **212**, 1041–1042 (1981).
33. Watanabe, N., Tsukada, N., Smith, C. R. & Phillips, M. J. Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J Cell Biol* **113**, 1069–1080 (1991).
34. Adelstein, R. S., Pato, M. D., Sellers, J. R., de Lanerolle, P. & Conti, M. A. Regulation of actin-myosin interaction by reversible phosphorylation of myosin and myosin kinase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **46** Pt 2, 921–928 (1982).
35. Watanabe, N. *et al.* Taurolithocholate impairs bile canalicular motility and canalicular bile secretion in isolated rat hepatocyte couplets. *World J Gastroenterol* **12**, 5320–5325 (2006).
36. Arikawa, K., Hicks, J. L. & Williams, D. S. Identification of actin filaments in the rhabdomeral microvilli of *Drosophila* photoreceptors. *J Cell Biol* **110**, 1993–1998 (1990).
37. Kamm, K. E. & Stull, J. T. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* **276**, 4527–4530 (2001).
38. Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* **83**, 1325–1358 (2003).
39. Cerec, V. *et al.* Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* **45**, 957–967 (2007).
40. Gripon, P. *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 15655–15660 (2002).
41. Pernelle, K. *et al.* Automated detection of hepatotoxic compounds in human hepatocytes using HepaRG cells and image-based analysis of mitochondrial dysfunction with JC-1 dye. *Toxicol Appl Pharmacol* **254**, 256–266 (2011).
42. Antherieu, S., Rogue, A., Fromenty, B., Guillouzo, A. & Robin, M. A. Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in HepaRG cells. *Hepatology* **53**, 1895–1905 (2011).
43. Wang, R. *et al.* Defective canalicular transport and toxicity of dietary ursodeoxycholic acid in the *abcb11*^{-/-} mouse: transport and gene expression studies. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **305**, G286–294 (2013).

Acknowledgements

We are grateful to Pr Alan Hoffmann (San Diego, CA) for the gift of NBD-UDCA fluorescent analogue. This work was supported by the European Community [Contract MIP-DILI-115336]. The MIP-DILI project has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking, resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Programme [FP7/20072013] and EFPIA companies' in kind contribution. <http://www.imi.europa.eu/>. Ahmad Sharanek was financially supported from the Lebanese Association for Scientific Research (LASER) and the MIP-DILI project; Audrey Burban by the MIP-DILI project and Matthew Burbank by a CIFRE contract with Servier.

Author Contributions

A.S. and A.B. Experimental design, performing experiments, acquisition, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript and statistical analysis. M.B. Performing experiments, acquisition, analysis and interpretation of data and drafting of the manuscript. R.L.G. Performing experiments, acquisition, analysis and

interpretation of data. R.L. Performing experiments. A.G. and C.G.-G. Experimental design, drafting of the manuscript and study supervision.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: Ruoya Li and Christiane Guguen-Guillouzo are employed by Biopredic International, St Grégoire, France.

How to cite this article: Sharanek, A. *et al.* Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway plays a key role in the impairment of bile canaliculi dynamics induced by cholestatic drugs. *Sci. Rep.* **6**, 24709; doi: 10.1038/srep24709 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary information

Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway plays a key role in the impairment of bile canaliculi dynamics induced by cholestatic drugs

Ahmad Sharanek^{1,2*}, Audrey Burban^{1,2*}, Matthew Burbank^{1,2}, Rémy Le Guevel³, Ruoya Li⁴,
André Guillouzo^{1,2} and Christiane Guguen-Guillouzo^{1,2,4†}

¹INSERM U991, Liver Metabolisms and Cancer, Rennes, France,

²Rennes 1 University, France,

³ImPACcell platform, Biosit, Rennes 1 University, France

⁴Biopredic International, St Grégoire, France.

*** Both authors contributed equally to this work**

†Correspondence should be addressed at INSERM UMR 991, Université de Rennes 1,

Faculté de Pharmacie, F-35043 Rennes cedex, France. Tel.: (33).2.23.23.53.51;

christiane.guillouzo@univ-rennes1.fr (C. Guguen-Guillouzo).

Supplementary Table 1. Characteristics of the 6 tested compounds

	Molecules	Therapeutic use	Cmax (µM)	<i>In vivo</i> hepatotoxicity	<i>In vitro</i> hepatotoxicity	References
Drugs	Chlorpromazine (CPZ)	Antipsychotic	0.1–0.2	<ul style="list-style-type: none"> • Intrahepatic cholestasis • Bile duct vanishing syndrome • Hepatocellular Necrosis • Phospholipidosis 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxidative stress • Bile flow inhibition • Alteration of mitochondrial membrane potential • Bile canaliculi constriction 	1-3
	Cyclosporine A (CsA)	Immunosuppressant	1.15	<ul style="list-style-type: none"> • Cholestatic jaundice • hyperbilirubinemia • Elevated transaminases 	<ul style="list-style-type: none"> • Oxidative stress • BSEP, MRP2, MDR1 inhibition • Inhibition of bile secretion • Bile canaliculi constriction 	4-9
	Bosentan	Antipulmonary artery hypertension	6.75	<ul style="list-style-type: none"> • Elevated ASAT/ALAT (3 x/20x) • Increased serum bile acids 	<ul style="list-style-type: none"> • BSEP inhibition 	10
	Fasudil	Antipulmonary artery hypertension	0.820	-	-	-
Other compounds	ANIT (Alpha-naphthylisothio cyanate)	Cholestatic model compound	-	<ul style="list-style-type: none"> • Cholestasis • Hyperbilirubinemia • Necrosis of bile duct epithelial cells • Cholangiolitic hepatitis 	<ul style="list-style-type: none"> • Increased serum bilirubin, ASAT and ALAT 	11-14
	Deoxycholic acid (DCA)	Secondary bile acid	3-7	<ul style="list-style-type: none"> • Increased serum transaminases activities • Increased total bile acids and bilirubin concentrations in serum 	<ul style="list-style-type: none"> • Cell lysis • Intracellular ROS generation increase • Mitochondrial instability in hepatocytes 	15-20

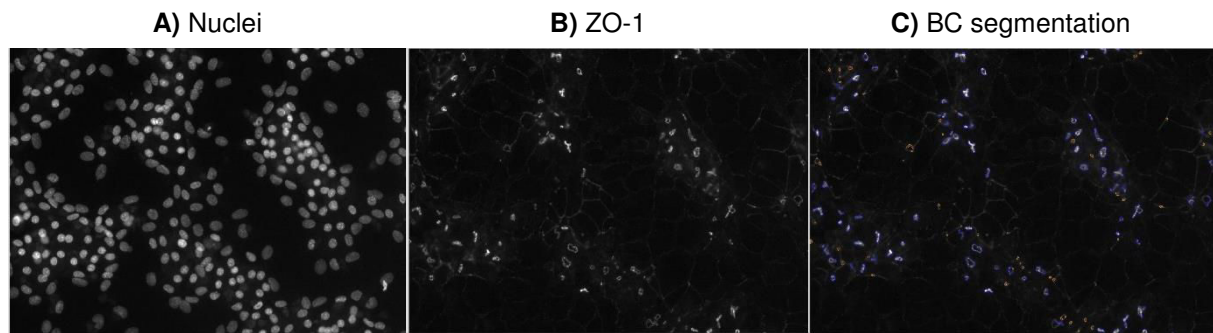
Therapeutic use, Cmax, and known hepatotoxicity of the tested compounds.

References to Table 1

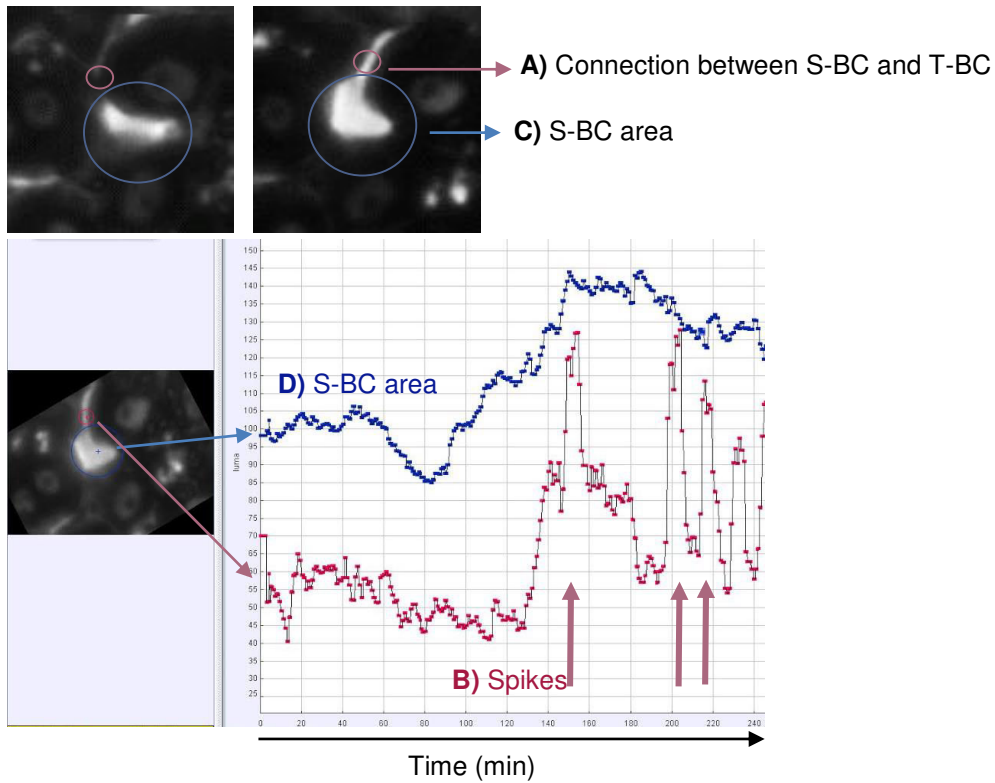
- 1 Antherieu, S. *et al.* Oxidative stress plays a major role in chlorpromazine-induced cholestasis in human HepaRG cells. *Hepatology* **57**, 1518-1529, (2013).
- 2 Velayudham, L. S. & Farrell, G. C. Drug-induced cholestasis. *Expert Opin Drug Saf* **2**, 287-304, (2003).
- 3 Padda, M. S., Sanchez, M., Akhtar, A. J. & Boyer, J. L. Drug-induced cholestasis. *Hepatology* **53**, 1377-1387, (2011).

- 4 Hagar, H. H. The protective effect of taurine against cyclosporine A-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *Toxicol Lett* **151**, 335-343, (2004).
- 5 Sharanek, A. *et al.* Different dose-dependent mechanisms are involved in early cyclosporine a-induced cholestatic effects in hepaRG cells. *Toxicol Sci* **141**, 244-253, (2014).
- 6 Roman, I. D. & Coleman, R. Disruption of canalicular function in isolated rat hepatocyte couplets caused by cyclosporin A. *Biochem Pharmacol* **48**, 2181-2188, (1994).
- 7 Princen, H. M., Meijer, P., Wolthers, B. G., Vonk, R. J. & Kuipers, F. Cyclosporin A blocks bile acid synthesis in cultured hepatocytes by specific inhibition of chenodeoxycholic acid synthesis. *Biochem J* **275 (Pt 2)**, 501-505, (1991).
- 8 Mizuta, K. *et al.* Cyclosporine inhibits transport of bile acid in rats: comparison of bile acid composition between liver and bile. *Transplant Proc* **31**, 2755-2756, (1999).
- 9 Whiting, P. H., Thomson, K. J., Saunders, N. J. & Simpson, J. G. Cyclosporin A nephrotoxicity in streptozotocin-diabetic rats. *Transplant Proc* **21**, 946-947, (1989).
- 10 Fattinger, K. *et al.* The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther* **69**, 223-231, (2001).
- 11 Hill, D. A., Jean, P. A. & Roth, R. A. Bile duct epithelial cells exposed to alpha-naphthylisothiocyanate produce a factor that causes neutrophil-dependent hepatocellular injury in vitro. *Toxicol Sci* **47**, 118-125, (1999).
- 12 Roos, F., Terrell, T. G., Godowski, P. J., Chamow, S. M. & Schwall, R. H. Reduction of alpha-naphthylisothiocyanate-induced hepatotoxicity by recombinant human hepatocyte growth factor. *Endocrinology* **131**, 2540-2544, (1992).
- 13 Dahm, L. J., Bailie, M. B. & Roth, R. A. Relationship between alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury and elevations in hepatic non-protein sulfhydryl content. *Biochem Pharmacol* **42**, 1189-1194, (1991).
- 14 Orsler, D. J., Ahmed-Choudhury, J., Chipman, J. K., Hammond, T. & Coleman, R. ANIT-induced disruption of biliary function in rat hepatocyte couplets. *Toxicol Sci* **47**, 203-210, (1999).

- 15 Song, P., Zhang, Y. & Klaassen, C. D. Dose-response of five bile acids on serum and liver bile Acid concentrations and hepatotoxicity in mice. *Toxicol Sci* **123**, 359-367, (2011).
- 16 Delzenne, N. M., Calderon, P. B., Taper, H. S. & Roberfroid, M. B. Comparative hepatotoxicity of cholic acid, deoxycholic acid and lithocholic acid in the rat: in vivo and in vitro studies. *Toxicol Lett* **61**, 291-304, (1992).
- 17 Sokol, R. J., Winklhofer-Roob, B. M., Devereaux, M. W. & McKim, J. M., Jr. Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids. *Gastroenterology* **109**, 1249-1256, (1995).
- 18 Rodrigues, C. M., Fan, G., Wong, P. Y., Kren, B. T. & Steer, C. J. Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol Med* **4**, 165-178, (1998).
- 19 Qiao, L. *et al.* Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis. *Mol Biol Cell* **12**, 2629-2645, (2001).
- 20 Zucchini-Pascal, N., de Sousa, G., Pizzol, J. & Rahmani, R. Pregnane X receptor activation protects rat hepatocytes against deoxycholic acid-induced apoptosis. *Liver Int* **30**, 284-297, (2010).



Supplementary Fig. 1. BC area quantification. The BC area quantification was based on ZO-1 protein immunolabelling using the Cell Health Profiling V4 bio application of the ArrayScan software (Thermo Scientific). **A)** Hoechst-labelled nuclei. **B)** ZO-1 protein immunofluorescence images. **C)** Segmentation was performed by adjusting the shape, area and brightness parameters to eliminate non-corresponding objects. An analysis was performed on 10 images per condition.



Supplementary Fig. 2. BC dynamics analysis. Contraction/relaxation activity and the opening/closing rhythm of BC (spikes) were evaluated by time-lapse cell imaging and quantified by a software video analysis and a modelling tool (Tracker 4.87). **A, B**) Circular frames (red) delimiting the connections between S-BC and T-BC to track brightness variations and record the rhythm of spikes (red graph). **C, D**) Circular frames (blue) delimiting S-BC to record changes in the area of S-BC (blue graph).

Supplementary Video legends

Supplementary Video 1. Rhythmic dynamic movements of BC in HepaRG cells. Images were captured each minute during 4 h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂) to maintain the cells under physiological conditions. Video is accelerated 600x.

Supplementary Video 2. Rhythmic dynamic movements of BC in CCHH. Images were captured each minute during 4 h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂) to maintain the cells under physiological conditions. Video is accelerated 600x.

Supplementary Video 3. Rhythmic dynamic movements of BC in SCHH. Images were captured each minute during 4 h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂) to maintain the cells under physiological conditions. Video is accelerated 600x.

Supplementary Video 4. Constriction of BC and loss of their rhythmic dynamics in CPZ-treated HepaRG cells. Images of 50µM CPZ-treated cells were captured each minute during 4 h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂). Video is accelerated 600x.

Supplementary Video 5. Dilation of BC and loss of their rhythmic dynamics in fasudil-treated HepaRG cells. Images of 50µM fasudil-treated cells were captured each minute during 4 h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂). Video is accelerated 600x.

Article 2

Early Alterations of Bile Canaliculi Dynamics and the Rho Kinase/Myosin Light Chain Kinase Pathway Are Characteristics of Drug-Induced Intrahepatic Cholestasis

Matthew G. Burbank, Audrey Burban, Ahmad Sharanek, Richard J. Weaver, Christiane Guguen-Guillouzo, and André Guillouzo

Early Alterations of Bile Canaliculi Dynamics and the Rho Kinase/Myosin Light Chain Kinase Pathway Are Characteristics of Drug-Induced Intrahepatic Cholestasis[§]

Matthew G. Burbank, Audrey Burban, Ahmad Sharanek, Richard J. Weaver, Christiane Guguen-Guillouzo, and André Guillouzo

INSERM UMR991, Foie, Métabolismes et Cancer, Rennes, France (M.G.B., A.B., A.S., C.G.-G., A.G.); Université Rennes 1, Rennes, France (M.G.B., A.B., A.S., C.G.-G., A.G.); Biologie Servier, Gidy, France (M.G.B.); Institut de Recherches Internationales Servier, Suresnes, France (R.J.W.); and Biopredic International, St. Grégoire, Rennes, France (C.G.-G.)

Received May 4, 2016; accepted August 11, 2016

ABSTRACT

Intrahepatic cholestasis represents 20%–40% of drug-induced injuries from which a large proportion remains unpredictable. We aimed to investigate mechanisms underlying drug-induced cholestasis and improve its early detection using human HepaRG cells and a set of 12 cholestatic drugs and six noncholestatic drugs. In this study, we analyzed bile canaliculi dynamics, Rho kinase (ROCK)/myosin light chain kinase (MLCK) pathway implication, efflux inhibition of taurocholate [a predominant bile salt export pump (BSEP) substrate], and expression of the major canalicular and basolateral bile acid transporters. We demonstrated that 12 cholestatic drugs classified on the basis of reported clinical findings caused disturbances of both bile canaliculi dynamics, characterized by either dilatation or constriction, and alteration of the ROCK/MLCK signaling pathway, whereas noncholestatic compounds, by contrast, had no effect. Cotreatment with ROCK inhibitor Y-27632 [4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl) cyclohexanecarboxamide dihydrochloride] and MLCK activator calmodulin

reduced bile canaliculi constriction and dilatation, respectively, confirming the role of these pathways in drug-induced intrahepatic cholestasis. By contrast, inhibition of taurocholate efflux and/or human BSEP overexpressed in membrane vesicles was not observed with all cholestatic drugs; moreover, examples of noncholestatic compounds were reportedly found to inhibit BSEP. Transcripts levels of major bile acid transporters were determined after 24-hour treatment. BSEP, Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide, and organic anion transporting polypeptide B were downregulated with most cholestatic and some noncholestatic drugs, whereas deregulation of multidrug resistance-associated proteins was more variable, probably mainly reflecting secondary effects. Together, our results show that cholestatic drugs consistently cause an early alteration of bile canaliculi dynamics associated with modulation of ROCK/MLCK and these changes are more specific than efflux inhibition measurements alone as predictive nonclinical markers of drug-induced cholestasis.

Introduction

Many drugs have been reported to induce liver injury in a dose-dependent or dose-independent manner in humans. During the last decades, many drugs have been removed from the market or received a

black box warning as a result of their hepatotoxicity and idiosyncrasy. A frequent manifestation of drug-induced liver injury (DILI) is represented by intrahepatic cholestasis, which is characterized by impaired hepatocellular secretion of bile, resulting in accumulation of bile acids (BAs), bilirubin, and cholesterol (Padda et al., 2011). In several population-based studies on DILI, a cholestatic pattern has been found in 20%–40% and a mixed cholestatic and hepatocellular injury pattern was seen in 12%–20% of patients (Lee, 2003), with a large proportion of the drug-induced cholestatic cases reportedly unpredictable.

Early detection of DILI (particularly, cholestasis) remains a challenge for pharmaceutical industries and regulatory agencies. According to the International Transporter Consortium and guidelines on the investigation of drug interactions from the European Medicines Agency (Zamek-Gliszczynski et al., 2012), inhibition of the bile salt export pump (BSEP), which plays a major role in BA canalicular transport (Jansen et al., 1999; Stieger, 2010), should be evaluated during drug development

This research was supported by the European Union Mechanism-Based Integrated Systems for the Prediction of Drug Induced Liver Injury (MIP-DILI) project [Contract MIP-DILI-115336]. The MIP-DILI project has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking, resources of which are composed of financial contributions from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) and in-kind contributions from members of the European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations. M.G.B. was financially supported by a CIFRE (Convention Industrielle de Formation par la Recherche) PhD contract with Servier. A.B. and A.S. were supported by the MIP-DILI project.

dx.doi.org/10.1124/dmd.116.071373.

[§]This article has supplemental material available at dmd.aspetjournals.org.

ABBREVIATIONS: ALB, albumin; ALDOB, aldolase B; AMI, amiodarone; APAP, acetaminophen; BA, bile acid; BOS, bosentan; BSEP, bile salt export pump; BUS, buspirone; CaM, calmodulin; CIM, cimetidine; CPZ, chlorpromazine; CsA, cyclosporine A; DIC, diclofenac; DILI, drug-induced liver injury; DMSO, dimethylsulfoxide; ENT, entacapone; FIA, fialuridine; HSC 70, Heat Shock 70kDa Protein; MET, metformin; MLC, myosin light chain; MLCK, myosin light chain kinase; MRP, multidrug resistance-associated protein; MTT, methylthiazole tetrazolium; NEF, nefazodone; NTCP, Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide; OATP, organic anion transporting polypeptide; PER, perhexiline; PHH, primary human hepatocyte; PIO, pioglitazone; ROCK, Rho kinase; SCHH, sandwich-cultured human hepatocyte; SOD, superoxide dismutase; TAC, tacrolimus; TCA, taurocholic acid; TOL, tolcapone; TRO, troglitazone; XIM, ximelagatran; Y-27632, 4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl) cyclohexanecarboxamide dihydrochloride.

when evidence of cholestatic liver injury has been observed in nonclinical safety studies or in human clinical trials (Kenna, 2014). Indeed, many drugs reported to cause DILI have been identified as efflux transporter inhibitors (Morgan et al., 2010; Stieger, 2010; Dawson et al., 2012; Pedersen et al., 2013), but a significant number of false positives has been found (Pedersen et al., 2013). Moreover, compounds known to interfere with BSEP function are often not associated with significant liver cell injury in preclinical animal models although they have been related to liver damage when administered to humans (Morgan et al., 2010; Dawson et al., 2012), and many cholestatic drugs are not BSEP inhibitors (Pedersen et al., 2013).

Currently, various *in vivo* and *in vitro* biologic approaches are used for studying BA transporters. Detection of cholestatic drugs can depend on the choice of method and/or the model and its species origin. Animal models including knockout models, mutant models, and whole tissues can be employed but *in vitro* systems are more frequently used, based on membrane and cell assays (Brouwer et al., 2013). Inverted vesicles derived from various nontransfected or transfected cell lines are widely used to analyze interactions between substrates and inhibitors with target transporters. However, a number of probe substrates and inhibitors are recommended for evaluation of human ATP-dependent transport into membrane vesicles. Polarized cells are standard models for evaluating drug transport. Primary hepatocytes appear to be the most appropriate cell model to mimic hepatic uptake and efflux functions. However, freshly isolated and cryopreserved hepatocytes are not polarized, and they rapidly lose their functional activities and functional bile canaliculi in standard culture conditions (Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010). Rat hepatocyte couplets (Graf et al., 1984; Thibault et al. 1992) and primary rat and human hepatocytes in a sandwich configuration (Swift et al., 2010; Ellis et al., 2014) have been the most widely used *in vitro* cell models to analyze hepatic transport processes. Sandwich-cultured human hepatocytes (SCHHs) recapitulate the polarized architecture but they frequently exhibit large interdonor and *in vitro* time-dependent functional variations. An alternative to SCHHs is the human HepaRG cell line, which expresses features characteristic of mature hepatocytes, exhibits typical functional bile canaliculi and correctly polarized distribution of transport proteins, and produces BAs at levels comparable to those measured in primary human hepatocyte (PHH) cultures (Guguen-Guillouzo and Guillouzo, 2010; Bachour-El Azzi et al., 2015; Sharanek et al., 2015).

The mechanisms underlying drug-induced intrahepatic cholestasis remain poorly understood. Besides the role of hepatobiliary transporter changes, other mechanisms (e.g., altered cell polarity, disruption of cell-to-cell junctions, and cytoskeletal modifications), are believed to participate to the development of intrahepatic cholestasis. In normal hepatocytes, bile canaliculi undergo spontaneous contractions, which are essential for BA efflux (Arias et al., 1993) and alternations in myosin light chain (MLC) subunit 2 phosphorylation and dephosphorylation are required for these contractions (Sharanek et al., 2016). We recently reported that cholestatic drugs can cause *in vitro* early constriction or dilatation of bile canaliculi associated with deregulation of the Rho kinase (ROCK)/myosin light chain kinase (MLCK) pathway (Sharanek et al., 2016).

In this study, we aimed to determine whether changes in bile canaliculi dynamics and the ROCK/MLCK pathway are more representative targets of cholestatic drugs than efflux transporter inhibition and whether these alterations could better discriminate cholestatic from noncholestatic compounds using human differentiated HepaRG cells. Our results showed that the 12 tested cholestatic drugs could cause bile canaliculi constriction and dilatation associated with different disturbances of the ROCK/MLCK pathway.

Materials and Methods

Reagents. Cyclosporine A (CsA), chlorpromazine (CPZ), nefazodone (NEF), tolcapone (TOL), diclofenac (DIC), perhexiline (PER), troglitazone (TRO), tacrolimus (TAC) or amiodarone (AMI), acetaminophen (APAP), ximelagatran (XIM), metformin

(MET), entacapone (ENT), buspirone (BUS), pioglitazone (PIO), cimetidine (CIM), Y-27632 [4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl) cyclohexanecarboxamide dihydrochloride], insulin, and methylthiazolotetrazolium (MTT) were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Fialuridine (FIA) was supplied by Carbosynth (Compton, UK). Bosentan (BOS) was obtained from Sequoia Research Products (Pangbourne, UK). Calmodulin (CaM) was provided by Merck Chemicals (Fontenay sous Bois, France). [³H]-Taurocholic acid (TCA) was supplied by PerkinElmer (Boston, MA). Specific antibodies against phospho-MLC2 (Ser19) and HSC70 (Heat Shock 70 kDa Protein) were provided by Cell Signaling Technology (Schuttersveld, The Netherlands). Secondary antibodies were obtained from Invitrogen (Saint Aubin, France). GlutaMAX, Hyclone bovine fetal calf serum, penicillin, streptomycin and Williams' E medium were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Hydrocortisone hemisuccinate was purchased from Serb Laboratoires (Paris, France). Other chemicals were of the highest reagent grade.

Cell Cultures and Treatments. HepaRG cells were seeded at a density of 2.6×10^4 cells/cm² in Williams' E medium supplemented with 2 mM GlutaMAX, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 10% HyClone bovine fetal calf serum, 5 μg/ml insulin, and 50 μM hydrocortisone hemisuccinate. At confluence after a 2-week cell proliferation phase, HepaRG cells were shifted to the same medium supplemented with 1.7% dimethylsulfoxide (DMSO) for 2 additional weeks to obtain confluent differentiated cultures containing equal proportions of hepatocyte-like and progenitors/primitive biliary-like cells (Cerec et al., 2007). These differentiated hepatic cell cultures were used for analytical assays.

PHHs were obtained from Biopredic International (St. Grégoire, France). They were isolated by collagenase perfusion of histologically normal liver fragments from three adult donors undergoing resection for primary and secondary tumors (Guguen-Guillouzo et al., 1982). Donors 1, 2, and 3 were Caucasian men aged 74, 65, and 71 years, respectively. Primary cultures were obtained by seeding 1.5×10^5 hepatocytes/cm² onto plates in Williams' E medium supplemented with 10% HyClone bovine fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 1 μg/ml insulin, and 2 mM glutamine. The medium was discarded 12 hours after cell seeding, and cultures were maintained thereafter in serum-free medium. PHH cultures were used 3 to 4 days after cell seeding. For drug treatments, differentiated HepaRG cells and PHHs were incubated in a medium containing 2% serum and 1% DMSO. Table 1 provides a list and characteristics of the tested drugs. The drugs were divided into three groups according to their clinical effects: well recognized as cholestatic (group 1), rarely cholestatic (group 2), and noncholestatic (group 3). The compounds were dissolved in DMSO or water and the final concentration of the solvent did not exceed 1%.

Cell Viability. Cytotoxicity of the tested drugs was evaluated using the MTT colorimetric assay. Briefly, cells were seeded in 96- or 24-well plates and exposed to various concentrations of each compound in triplicate for 24 hours. After medium removal, 100 μl serum- and DMSO-free medium containing MTT (0.5 mg/ml) was added to each well and incubated for 2 hours at 37°C. Water-insoluble formazan was dissolved in 100 μl DMSO and absorbance was measured at 550 nm (Aninat et al., 2006). IC₂₀ values (the concentrations causing 20% cytotoxicity) were calculated from the concentration-response curves.

Time-Lapse Cell Imaging. Phase-contrast images of HepaRG cells and PHHs were captured every 10 minutes using time-lapse, phase-contrast videomicroscopy. The Zeiss Axiovert 200M inverted microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) was equipped with a thermostatic chamber (37°C and 5% CO₂) to maintain the cells under normal culture conditions and with an AxioCam MRm camera with a ×10 objective.

Determination of Canalicular Lumen Surfaces. Canalicular lumen surfaces appeared bright (white) and the hepatocytes/biliary cells were denser (black) using a Zeiss Axiovert 200M phase-contrast microscope. Brightness parameters were adjusted to better distinguish between white and black densities and analysis was performed on at least four images per condition per well. The white canalicular lumen was then quantified using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) every 10 minutes for 24 hours. Data obtained during the first 4 hours with all tested compounds are presented and bile canaliculi quantification is expressed as the percent of the control (Supplemental Fig. 1).

MLCK and ROCK Modulation. MLCK and ROCK implication in bile canaliculi deformations was determined by the use of CaM and Y-27632, two specific modulators. HepaRG cells were treated with CaM, a MLCK-specific activator, and Y-27632, a ROCK-selective inhibitor, in the presence or absence of dilators and constrictors, respectively (Sharanek et al., 2016). Bile canaliculi

TABLE 1

Characteristics of the 18 tested drugs

These compounds include the 14 training compounds of the MIP-DILI project plus CPZ, CsA, TAC, and CIM. Compounds were classified into three groups based on their reported clinical cholestatic potential. The list of compounds, their therapeutic use, clinical hepatic effects, and some results obtained in vitro with either vesicles overexpressing human BA transporters or liver cells are displayed.

Drug	Therapeutic Use	Clinical Hepatic Effects	In Vitro Hepatic Effects	Main References
Group 1: drugs involved in clinical cholestasis				
BOS	Antihypertensive	Aminotransferase elevation; increase in serum BAS	BSEP inhibition ^a ; substrate for OATP, NTCP, and MRP2 ^b	Fattinger et al. (2001), Mano et al. (2007), Treiber et al. (2007), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/)
CPZ	Antipsychotic	Intrahepatic cholestasis; hepatocellular necrosis; phospholipidosis	Oxidative stress; mitochondrial membrane potential loss; pericanalicular F-actin disorganization	Velayudham and Farrell (2003), Padda et al. (2011), Anthérieu et al. (2013), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/)
CsA	Immunosuppressant	Cholestasis; hyperbilirubinemia; aminotransferase elevation	Oxidative stress; BSEP, MRP2, and MDR1 inhibition ^b ; BA transport alteration; pericanalicular F-actin disorganization	Mihatsch et al. (1998), Sharanek et al. (2015)
NEF	Antidepressant	Cholestasis hepatitis; hepatocellular necrosis	Inhibition of mitochondrial respiration; BSEP inhibition ^a	Spigset et al. (2003), Kostrubsky et al. (2006), Dykens et al. (2008), Morgan et al. (2010), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/)
TRO	Antidiabetic	Serious idiosyncratic liver injury; hepatocyte necrosis; cholestatic hepatitis	BA transporter inhibition; mitochondrial dysfunction; BSEP inhibition ^a	Watkins and Whitcomb (1998), Morgan et al. (2010), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/)
Group 2: drugs involved in rare cases of clinical cholestasis				
CIM	Histamine 2-receptor antagonist	Hepatocellular/cholestatic injury	BSEP inhibition ^a	Mohi-ud-din and Lewis (2004), Pedersen et al. (2013), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/)
DIC	NSAID	Cholestasis; aminotransferase elevation	BSEP inhibition ^a ; BSEP and MRP2 inhibition ^b	Banks et al. (1995), Pedersen et al. (2013), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/), P. Krajcsi (unpublished data)
ENT	Antiparkinsonian	Mild jaundice and cholestatic pattern; aminotransferase elevation	BSEP and NTCP inhibition ^a ; mitochondrial dysfunction	Fisher et al. (2002), Longo et al. (2016), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/), P. Krajcsi (unpublished data)
MET	Antidiabetic	Cholestatic hepatitis; mixed hepatocellular and cholestatic injury	BA accumulation; liver mitochondria injury; BSEP inhibition ^a	Nammour et al. (2003), Saadi et al. (2013), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/), P. Krajcsi (unpublished data)
PER	Prophylactic antianginal	Steatohepatitis; rare cases of cholestasis	ROS formation; lipid peroxidation; BSEP and NTCP inhibition ^a	Feuer and Di Fonzo (1992), P. Krajcsi (unpublished data)
TAC	Immunosuppressant	Cholestasis after transplantation (Infant); moderate aminotransferase elevation	BSEP inhibition ^a ; BSEP and NTCP inhibition ^b ; BSEP internalization ^b	Mihatsch et al. (1998), Sharanek et al. (2014), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/)
TOL	Antiparkinsonian	Aminotransferase elevation; intrahepatic cholestasis	ROS formation; mitochondrial toxicity; NTCP, BSEP, MRP2, MRP3, and MRP4 inhibition ^a ; reactive metabolite	Smith et al. (2003), Morgan et al. (2013), Longo et al. (2016), P. Krajcsi (unpublished data)
Group 3: drugs not involved in clinical cholestasis				
AMI	Antiarrhythmic	Steatosis; phospholipidosis; aminotransferase elevation	Phospholipidosis; steatosis	Fromenty and Pessayre (1995), Anthérieu et al. (2011)
APAP	Analgesic and antipyretic	Acute liver failure; aminotransferase elevation	Lactate dehydrogenase increase; mitochondrial damage	McGill et al. (2012), Toyoda et al. (2012)
BUS	Hypnotic	Rare aminotransferase elevation with no link to clinically apparent liver injury	No inhibition of mitochondrial respiration	Kostrubsky et al. (2006), Dykens et al. (2008), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/)
FIA	Antiviral	Liver failure associated with lactic acidosis; mitochondrial toxicity	Mitochondrial and cellular toxicity	Tujos and Fontana (2011)
PIO	Antidiabetic (PPAR- γ agonist)	No aminotransferase elevation	MRP2 stimulation; BSEP and MRP4 inhibition ^a	Morgan et al. (2010), LiverTox website (http://livertox.nih.gov/)
XIM	Anticoagulant	Immune toxicity; aminotransferase elevation	No formation of reactive metabolites	Kenne et al. (2008), Keisu and Andersson (2010)

NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; MDR, multidrug resistance; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; ROS, reactive oxygen species.

^aVesicles overexpressing human BA transporters.

^bLiver cells.

alterations after cotreatment were quantified and compared with treatment with the modulator alone as described above.

TCA Clearance. Cells were first exposed to 43.3 nM [³H]-TCA for 30 minutes to induce its intracellular accumulation and were then washed with standard buffer and incubated with the tested compounds for 2 hours in a standard buffer with Ca²⁺ and Mg²⁺. After the incubation time, cells were washed and scraped in 0.5 N NaOH and the remaining radiolabeled substrate was measured through scintillation counting to determine [³H]-TCA clearance. [³H]-TCA clearance was determined based on its accumulation in the cell layers (cells + bile canaliculi) and was calculated relative to the control using the following formula: [³H]-TCA clearance = ([³H]-TCA accumulation in (cells + bile canaliculi)_{Control} × 100)/([³H]-TCA accumulation in cell layers_{Tested compound}) (Sharaneck et al., 2016).

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis. Total RNA was extracted from 10⁶ HepaRG cells with the SV Total RNA Isolation System (Promega). RNAs were reverse transcribed into cDNA and real-time quantitative polymerase chain reaction was performed using a SYBR Green mix. Primer pair sequences were as follows: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) (ID 2597; forward: 50-ttcaccaccatggagaagcc-30; reverse: 50-ggcatggactgtgctcatga-30), *BSEP* (ID 8647; forward: 50-tgatcctgatcaagggaggg-30; reverse: 50-tgttctctgggaacaattc-30), Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (*NTCP*) (ID 6554; forward: 50-gggacatgaacctcagatt-30; reverse: 50-cgttgattgaggacgat-30), organic anion transporting polypeptide (*OATP*)-B (ID 6579; forward: 50-tgattggtatggggctctac-30; reverse: 50-catatcctaggctgtgt-30), multidrug resistance-associated protein (*MRP2*) (ID 1244; forward: 50-tgagcaagttgaaacgcacat-30; reverse: 50-agctctctctcctcctctct-30), (*MRP3*) (ID 8714; forward: 50-tgccgcagatggactgat-30; reverse: 50-tcaccacttggggatcatt-30), (*MRP4*) (ID 10257; forward: 50-gctcaggtgctatgtct-30; reverse: 50-cggttacaattctctcca-30), albumin (*ALB*) (ID 213; forward: 50-gctgtcatctctgtggcgt-30; reverse: 50-actcatgggagctgctgttc-30), aldolase B (*ALDOB*) (ID 229; forward: 50-tgcgccctacaagaaggcaggtt-30; reverse: 50-ctcaagatctcggcagcgt-30), *CYP3A4* (ID 1576; forward: 50-tcagcctgtgctctctatcat-30; reverse: 50-tccagggccacacctgct-30), and superoxide dismutase (*SOD2*) (ID 6648; forward: 50-acaggcctattcactgct-30; reverse: 50-cagcataacgatcgtgtt-30).

Western Blotting Analysis of p-MLC2. HepaRG cells were treated with the tested compounds for 1, 2, and 3 hours at a concentration causing bile canaliculi alteration, then washed with cold phosphate-buffered saline, and finally resuspended in cell lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche, Mannheim, Germany). Aliquots containing equivalent total protein content, as determined by the Bradford procedure with bovine serum albumin as the standard, were subjected to SDS/12% PAGE, electrotransferred to Immobilon-P membranes, and incubated overnight with primary antibodies directed against p-MLC2 and HSC70 (Heat Shock 70 kDa Protein). After incubation with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse/rabbit antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), membranes were incubated with a chemiluminescence reagent (Millipore, Billerica, MA) and bands were visualized and quantified by densitometry with fusion-CAPT software (Vilber Lourmat, Collégien, France).

Statistical Analysis. One-way analysis of variance with a multiple-comparisons test (GraphPad Prism software, version 6.00; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) was performed to compare time-dependent MLC2 phosphorylation in different samples. Data were considered significantly different when $P < 0.05$. The t test was applied to compare values of bile canaliculi quantification between treated and corresponding cotreated cultures (with CaM or Y-27632). Data were considered significantly different when $P < 0.001$. The t test was also applied to compare values of BA clearance and mRNA levels between treated and corresponding control cultures. Data were considered significantly different when $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$. Each value corresponded to the mean \pm S.E.M. of three independent experiments.

Results

Cytotoxicity Determination. Experiments were performed to first calculate IC₂₀ values for each compound after 24-hour treatment of HepaRG cells using the MTT assay (Table 2). Three concentrations were then tested for further experiments, the highest corresponding to the IC₂₀ value. IC₁₀ or IC₂₀ values are commonly selected for use in early in vitro toxicology studies (Liguori et al., 2008; Pomponio et al., 2015). When IC₂₀ values could not be determined because of absence of toxicity,

higher concentrations were tested. Table 2 displays the IC₂₀ values and/or final selected maximum concentrations tested.

Bile Canaliculi Dynamics. Bile canaliculi contractions are essential for clearance of BAs; they are characterized by repeated opening and closing processes (Sharaneck et al., 2016). We examined bile canaliculi dynamics in living cells by time-lapse imaging during at least 12 hours after the addition of the tested compounds. Depending on the drug, bile canaliculi showed constriction, dilatation, or no change. The five compounds from group 1 caused early alterations of bile canaliculi, usually starting after 1-hour exposure of HepaRG cells (Fig. 1). As previously reported (Sharaneck et al., 2016), CPZ (50 μ M) and CsA (50 μ M) induced constriction, whereas BOS (100 μ M) caused dilatation of bile canaliculi. The two other cholestatic compounds from group 1 (NEF and TRO) and four rarely cholestatic compounds from group 2 (DIC, ENT, PER, and TAC) also caused morphologic alterations of bile canaliculi at the same range of concentrations, either constriction with NEF (75 μ M), PER (20 μ M), and TRO (50 μ M) (Supplemental Video 1) or dilatation with ENT (100 μ M) (Supplemental Video 2), DIC (200 μ M), and TAC (50 μ M) (Fig. 1, A and B). Two other compounds from group 2 (MET and CIM) also caused alterations of bile canaliculi dynamics but at much higher although noncytotoxic concentrations (i.e., constriction and dilatation at 3 and 4 mM, respectively) (Fig. 1B).

To note, differential time- or concentration-dependent bile canaliculi alterations were evident with some cholestatic compounds. Thus, among the five constrictors from group 1, only CsA caused dilatation of bile canaliculi at low concentrations (10 μ M) (Fig. 1C). Interestingly, one group 2 compound (100 μ M TOL) showed dilatation during the first hour followed by constriction of bile canaliculi during the following hours of treatment (Fig. 1D). By contrast, ENT, a dilator from the same therapeutic family as TOL, caused strong dilatation starting within the

TABLE 2

C_{max} values, IC₂₀ values, and maximum tested concentrations of the 18 tested drugs

C_{max} values are from the literature and refer to the maximum serum concentration of the drug (Regenthal et al., 1999; Chu et al., 2007; Xu et al., 2008; Dhillon and Keating, 2009; Keisu and Andersson, 2010; Dawson et al., 2012; Sharaneck et al., 2014; Schadt et al., 2015). Cells were incubated for 24 hours with different concentrations of each drug. For cytotoxicity testing, the cells were treated with varying concentrations of each drug for 24 hours and then assayed with the MTT colorimetric test and IC₂₀ values were calculated.

Drug	C _{max}	IC ₂₀ (24 h)	Maximum In Vitro Concentration Tested
μ M			
Group 1: drugs involved in clinical cholestasis			
BOS	7.4	120	100
CPZ	0.2	50	50
CsA	1.15	>300	50
NEF	4.26	50	75
TRO	6.39	65	50
Group 2: drugs involved in rare cases of clinical cholestasis			
CIM	4.9	4000	4000
DIC	8	375	200
ENT	3.9	250	100
MET	7.74	3000	3000
PER	2	25	20
TAC	0.09	60	50
TOL	23	70	100
Group 3: drugs not involved in clinical cholestasis			
AMI	0.8	20	20
APAP	139	20,000	25,000
BUS	0.01	>300	100
FIA	0.64	>300	100
PIO	4.2	200	100
XIM	0.3	>300	100

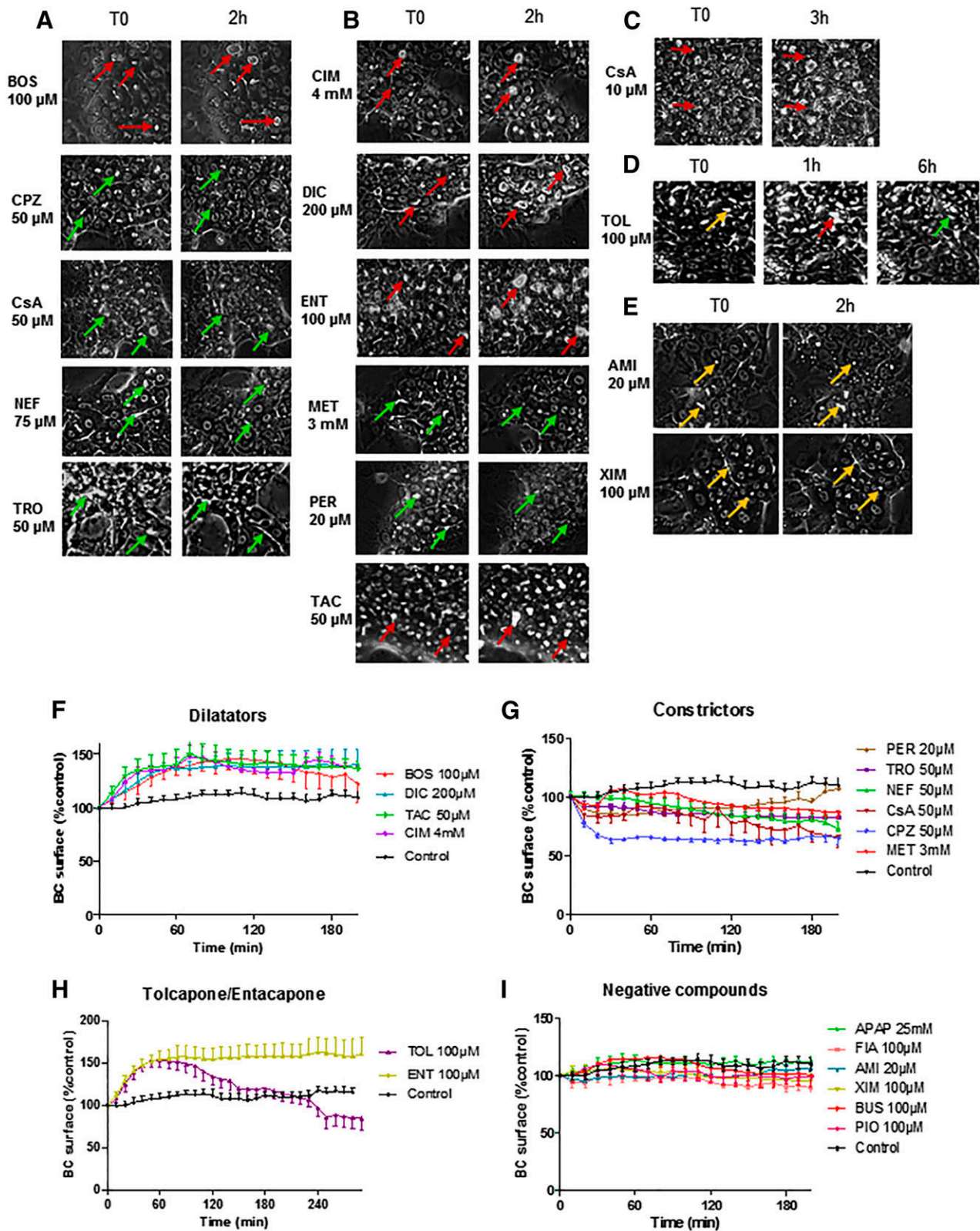


Fig. 1. Effects of cholestatic and noncholestatic drugs on bile canaliculi (BC) dynamics in HepaRG cells. (A and B) Phase-contrast images after 2-hour treatment showing dilatation (red arrows), constriction (green arrows), or no change (yellow arrows). (C) Effects of 10 μ M CsA after 3 hours. (D) Effects of TOL after 1 and 6 hours. (E) Effects of negative compounds (XIM and AMI) after 2 hours. (F–I) BC surfaces of HepaRG cells exposed to dilators (F), constrictors (G), TOL/ENT (H), and control compounds (I) were quantified. Briefly, BC surface quantification was based on brightness parameters that were adjusted to eliminate noncorresponding objects and analysis was performed on at least three different experiments. The white canalicular lumen was then quantified using ImageJ software every 10 minutes for 24 hours. Splices seen on some photographs are due to the software used for time-lapse imaging analysis. Data are expressed relative to untreated cells, arbitrarily set at a value of 100%. Data represent the means \pm S.E.M. of three independent experiments. All dilators showed at least transiently enlarged BC $>$ 125%. Bar, 50 μ m.

first hour without any constriction during the following hours (Fig. 1B). All other tested compounds—namely, XIM, AMI, APAP, FIA, BUS, and PIO (group 3)—did not alter bile canalculi dynamics at non-cytotoxic concentrations (Fig. 1E; Supplemental Video 3).

Morphologic canalicular alterations induced by the tested compounds were quantified by measuring the canalicular surface using ImageJ software every 10 minutes for 24 hours. Data obtained during the first 3 hours with all tested compounds are displayed in Fig. 1, F–I. When observed, several altered bile canalculi were detected in each selected culture area as with each cholestatic drug. Interestingly, the results were comparable to those previously obtained using the canalicular distribution of zona occludens-1 protein to measure bile canalculi areas (Sharanek et al., 2016); for example, BOS caused a 1.5-fold increase in bile canalculi surfaces using either method.

Interestingly, constrictions appeared to be irreversible, whereas dilatations were only transient, as seen with TOL. Noticeably, AMI showed an unspecific increase in bile canalculi surface quantification

starting after 1 hour due to the appearance of intracytoplasmic vesicles corresponding to the induction of phospholipidosis (Fig. 1E). Drug effects on bile canalculi structures are summarized in Supplemental Table 1.

ROCK and MLCK Alterations with Cholestatic Drugs. MLC2 (the regulatory subunit of myosin 2, which is predominantly distributed in the pericanalicular region of hepatocytes) is known as a target of ROCK; its phosphorylation/dephosphorylation reflects the dynamic rhythm of bile canalculi and was found to be impaired by CPZ, CsA, and BOS (Sharanek et al., 2016). On the basis of our previous study, we analyzed the 18 compounds at three critical time points (1, 2, and 3 hours) by Western blotting. However, we first verified with six compounds that similar alterations of MLC2 phosphorylation occurred after 30 minutes whatever the tested compound (Supplemental Fig. 2). Western blot analysis of MLC2 showed an increased phosphorylation tendency between 1 and 3 hours with constrictors (CPZ, CsA, PER, NEF, TRO, and MET) and inversely dephosphorylation tendency with

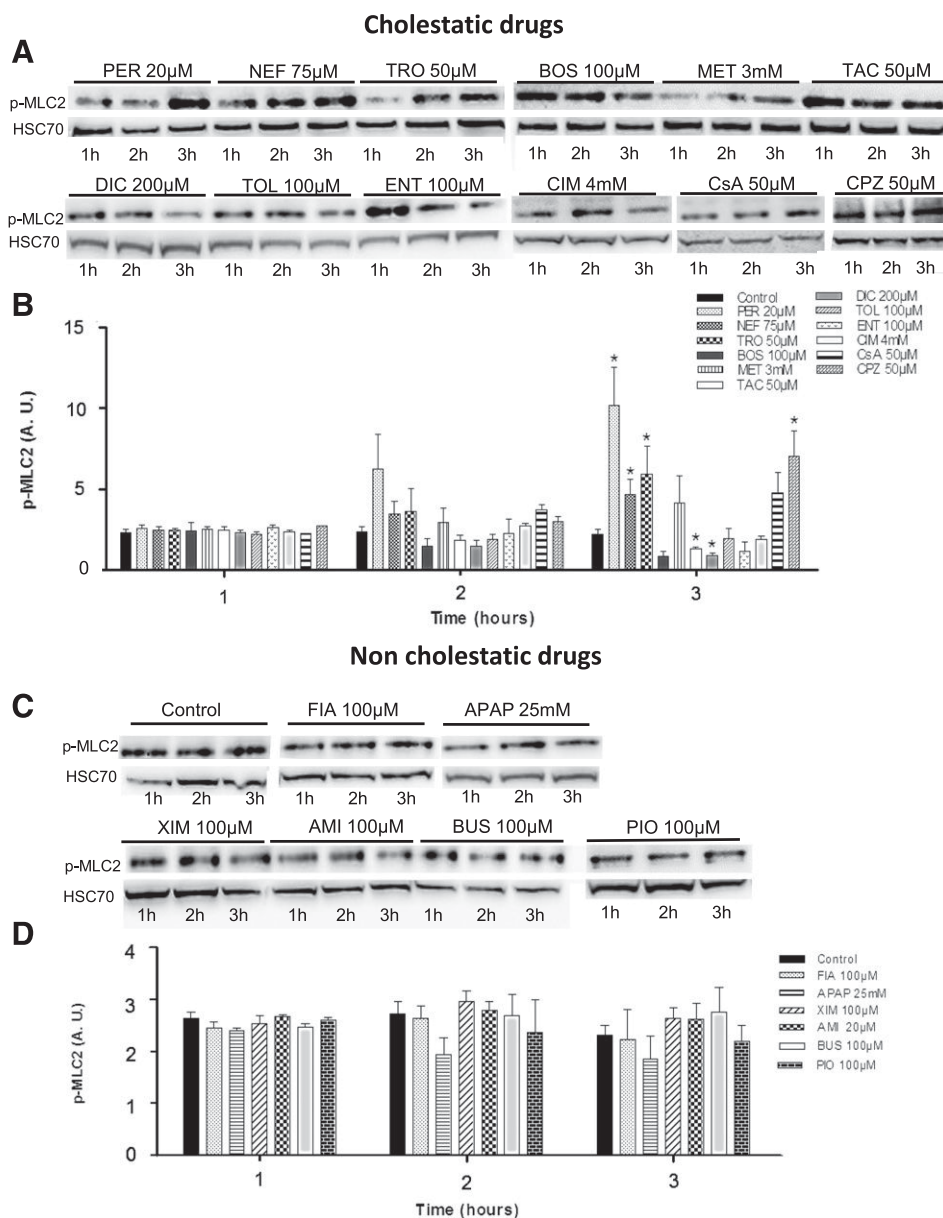


Fig. 2. Alterations of MLC2 phosphorylation/dephosphorylation by cholestatic drugs in HepaRG cells. (A) Representative Western blots of p-MLC2 compared with HSC70 (Heat Shock 70 kDa Protein), a loading control, using anti-S19 phospho-MLC2 and anti-HSC70 antibodies at various time points (1, 2, and 3 hours) in cells treated with group 1 and group 2 cholestatic drugs. (B and D) Graphical representation of MLC2 phosphorylation/dephosphorylation quantified using fusion-CAPT software. (C) Western blots of p-MLC2 obtained with group 3 molecules. Data are expressed in arbitrary units (A.U.) and represent means \pm S.E.M. of three independent experiments. One-hour treatment was arbitrarily set at a fixed value of 2.5 for all of the drugs. * $P < 0.05$.

dilatators (TAC, BOS, CIM, and DIC) (Fig. 2A). Depending on the compound, either a constrictor or a dilatator, large individual quantitative differences were observed in their effects on bile canaliculi measurements of dilatation and constriction (Fig. 2B). The potent constrictors (PER, TRO, and NEF) showed a much higher rate of phosphorylation than MET after 3-hour treatment (Fig. 2, A and B). Interestingly, ENT showed a decrease in MLC2 phosphorylation during bile canaliculi dilatation, whereas TOL did not show any significant change, likely due to rapid morphologic changes of bile canaliculi from dilatation to constriction after 1-hour treatment (Fig. 2B). All noncholestatic drugs did not significantly affect MLC2 phosphorylation/dephosphorylation (Fig. 2, C and D).

To further analyze alterations of bile canaliculi dynamics by cholestatic compounds, involvement of ROCK and MLCK was investigated using Y-27632, a ROCK-specific inhibitor, and CaM, a MLCK-specific activator. Y-27632 (10 μ M) caused bile canaliculi dilatation, whereas CaM (5 μ M) alone caused no bile canaliculi alteration (Fig. 3A). Alteration of bile canaliculi size after cotreatment with a drug and CaM or Y-27632 was quantified and compared with the drug treatment alone. As expected, cotreatment with CaM reduced bile canaliculi dilatation induced by the dilatators (BOS, DIC, CIM, and TAC) (Fig. 3, B and F). By contrast, cotreatment with Y-27632 partly counteracted the early phase of constriction induced by the constrictors (TRO, NEF, PER, and MET) (Fig. 3, C and D). TOL showed a lower dilatation during the first hour when cotreated with CaM and less constriction after 1 hour when cotreated with Y-27632, whereas ENT showed a much lower dilatation in the presence of CaM (Fig. 3E). Interestingly, cotreatment with BOS and Y-27632 showed an increase in the extent of dilatation compared with BOS or Y-27632 alone (Fig. 3G).

TCA Clearance. The influence of all of the tested drugs on the efflux of [3 H]-TCA, a predominant BSEP substrate, was assessed in HepaRG cells maintained in a standard buffer. Cells were first incubated with [3 H]-TCA for 30 minutes and then treated for 2 hours with all drugs at three different concentrations, the highest causing bile canaliculi alterations. [3 H]-TCA clearance, reflecting BA accumulation in HepaRG hepatocytes and thus the cholestatic potential, was determined by quantification of the intracellular accumulation of radiolabeled TCA. The results are displayed in Fig. 4. Two categories of compounds could be distinguished. The first was composed of eight compounds that caused a dose-dependent decrease in TCA clearance after 2-hour treatment and included the five group 1 cholestatic drugs (NEF, TRO, BOS, CPZ, and CsA) as well as three group 2 drugs (PER, TOL, and TAC). The second category was composed of the other 10 drugs that did not inhibit TCA efflux at the concentrations used and included four group 2 drugs (DIC, ENT, MET, and CIM) and the six drugs that are classified as noncholestatic *in vivo* (XIM, AMI, APAP, FIA, BUS, and PIO). Noticeably, DIC caused a concentration-dependent increase in TCA clearance, reaching 4-fold at 200 μ M.

Modulation of BA Transporter Expression. Genes encoding the major BA transporters can also be deregulated by cholestatic drugs (Pauli-Magnus and Meier, 2006) and the deregulation of their mRNA expression is usually linked to their activity (Bramow et al., 2001). Six major genes encoding either efflux (*BSEP*, *MRP2*, *MRP3*, and *MRP4*) or uptake (*NTCP* and *OATP-B*) transporters were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction after a 24-hour treatment with three concentrations of each tested drug. Different patterns, depending on the compound and the tested concentration, were evident and are shown in Table 3 and Supplemental Figs. 3–8. Both *BSEP* and *NTCP* were strongly repressed by all group 1 cholestatic compounds. In addition, *OATP-B* was repressed by CsA, BOS, and NEF, whereas *MRP2*, *MRP3*, and *MRP4* were overexpressed only by CsA. Most compounds in group 2 (TOL, DIC, PER, MET, CIM, and TAC) also

repressed *BSEP*, *NTCP*, and *OATP-B*. Moreover, *MRP2*, *MRP3*, and *MRP4* were upregulated by TAC. In addition, *MRP2* was upregulated by DIC and *MRP3* was downregulated by PER. Noticeably, none of the tested transporters was significantly deregulated by ENT. Some BA transporters were also deregulated by noncholestatic compounds. Thus, BUS downregulated *BSEP* and *NTCP*, whereas PIO and AMI inhibited *BSEP* and *NTCP* expression. In addition, transcripts of four other genes (*ALB*, *ALDOB*, *CYP3A4*, and *SOD2*) were also measured (Supplemental Table 2). A slight or significant decrease in expression of the liver-specific genes (*ALB* and *ALDOB*) was also observed with most drugs, which likely reflected cell adaptation or some cytotoxicity after a 24-hour treatment and not a direct drug-induced cholestatic effect. Induction of *CYP3A4* mRNAs with CPZ and their inhibition by CsA, TAC, and BOS were in agreement with previous reports. *SOD2* mRNA expression was increased with CsA and CPZ and was not altered with control compounds.

Comparative Analysis of Bile Canaliculi Dynamics in PHHs.

Hepatocytes from three different donors were analyzed by phase-contrast cell imaging. Similar results as those described with HepaRG hepatocytes were obtained within the first hours of drug exposure (i.e., bile canaliculi constriction with CPZ, CsA, NEF, and TRO; Fig. 5A) as well as with TOL after 2 hours, and bile canaliculi dilatation with TOL (between 1 and 2 hours), ENT, DIC, and BOS (Fig. 5B); however, these effects were not observed in cells from all donors with DIC, ENT, and TAC. Moreover, the rarely cholestatic drug PER that caused bile canaliculi constriction in HepaRG cells did not alter bile canaliculi structures in any of the three PHH populations (Fig. 5C). As expected, the noncholestatic drug FIA was ineffective. The time course of appearance of bile canaliculi alterations was approximately the same for all of the cholestatic compounds but the extent of dilatation appeared to be reduced compared with that observed in HepaRG cells.

Discussion

Both bile canaliculi dynamics and ROCK/MLCK activities can be impaired by cholestatic drugs (Sharanek et al., 2016). In this study, we demonstrated by using a set of 18 cholestatic and noncholestatic compounds that the 12 drugs that were classified cholestatic on the basis of reported clinical findings caused disturbances in both bile canaliculi dynamics and the ROCK/MLCK pathway. By contrast, noncholestatic compounds exhibited no effect on these pathways. Comparison of these data with TCA efflux showed that some cholestatic drugs were ineffective or enhanced TCA clearance, whereas some noncholestatic drugs exerted an inhibitory effect.

Drug-induced impairment of bile canaliculi dynamics can result in either early constriction or dilatation of the canalicular lumen. These morphologic changes were observed with the two groups of cholestatic drugs (i.e., well recognized as either causing clinical cholestasis or being responsible for rare cases of clinical cholestasis) (Table 1). Bile canaliculi constriction was irreversible, representing a terminal step leading to cell death; however, dilatation could be reversible and did not impede (at least within 24 hours) cell survival. Interestingly, the two types of bile canaliculi alterations could be observed with some drugs, showing either time or concentration dependence. TOL first caused dilatation and later constriction, whereas CsA caused dilatation at low concentrations and constriction at high concentrations. However, other bile canaliculi constrictors (CPZ, NEF, PER, and TRO) did not show clear evidence of dilatation prior to constriction or differences in the effects on bile canaliculi dynamics at lower concentrations or shorter times. Since a cholestatic liver usually develops after chronic drug administration in patients and is characterized by dilated bile canaliculi (Imanari et al., 1981; Watanabe et al., 1991; Chung et al., 2002),

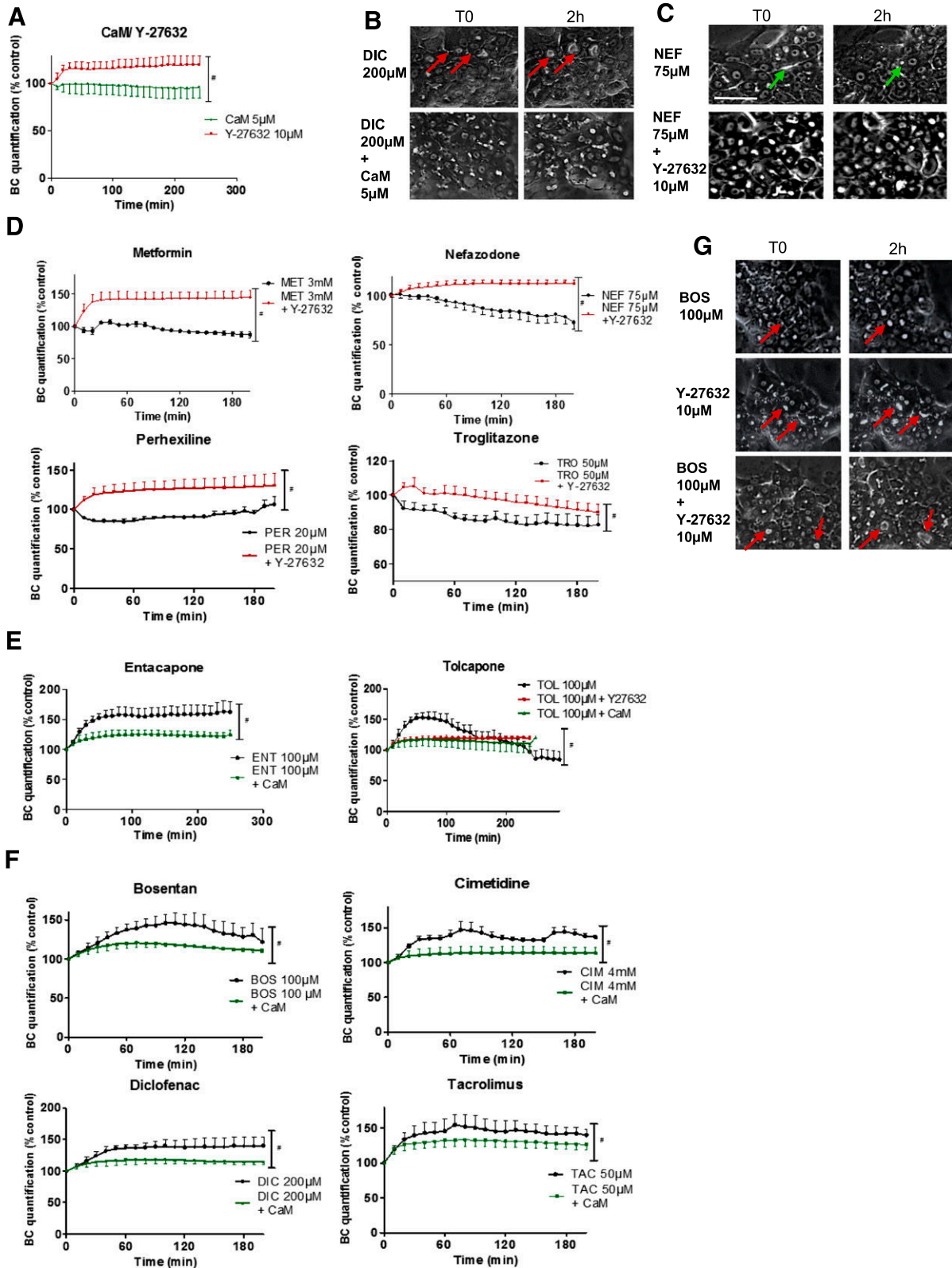


Fig. 3. Alterations of the ROCK/MLCK pathway by cholestatic drugs in HepaRG cells. (A) Bile canaliculi (BC) surface quantification after Y-27632 (10 μ M) and CaM (5 μ M) treatments for 4 hours. (B) Phase-contrast images of cells treated with 200 μ M DIC with or without the MLCK activator CaM (5 μ M) for 2 hours. (C) Phase-contrast images of cells treated with 75 μ M NEF with or without the ROCK inhibitor Y-27632 (10 μ M) for 2 hours. (D–F) BC surface quantification with constrictors as described above (D), TOL and ENT (E), and dilators (F). (G) Phase-contrast images of cells treated with 100 μ M BOS with or without Y-27632 (10 μ M) or with Y-27632 (10 μ M) alone for 2 hours. Data are expressed relative to untreated cells, arbitrarily set at a value of 100%. Data represent the means \pm S.E.M. of three independent experiments. [#] $P < 0.001$. Bar, 50 μ m.

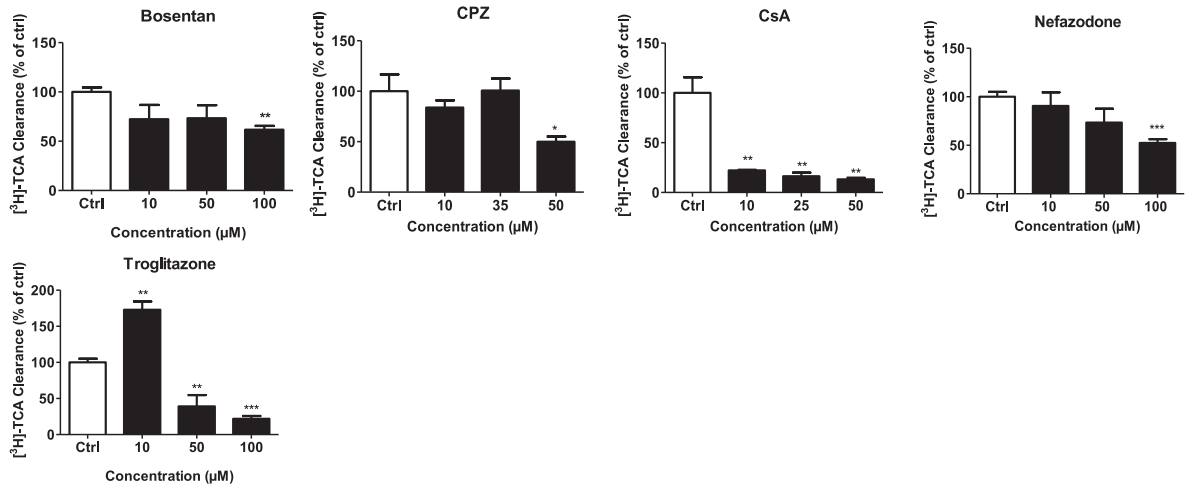
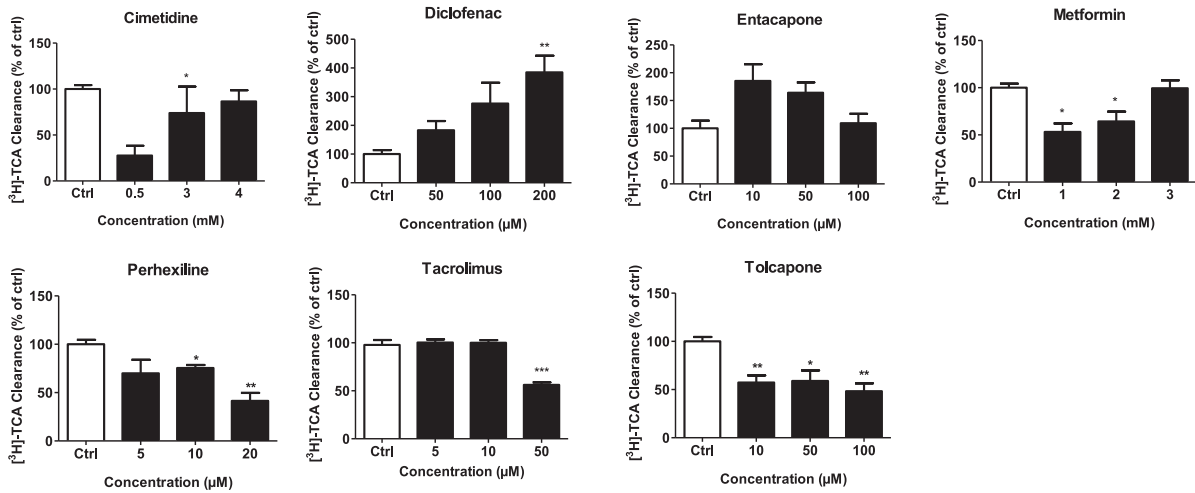
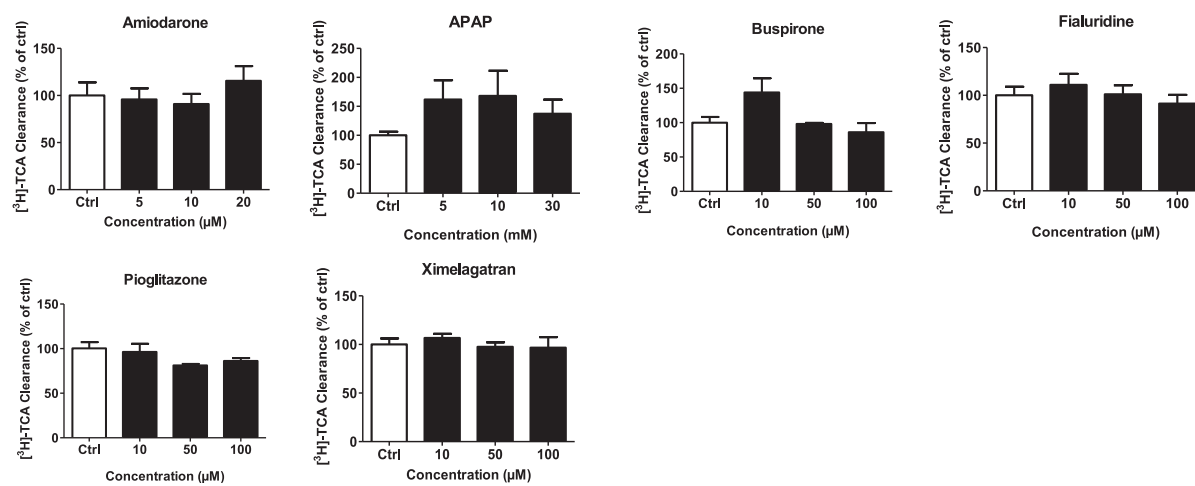
A**B****C**

Fig. 4. Effects of tested drugs on BA clearance activity in HepaRG cells. (A–C) [³H]-TCA clearance in HepaRG cells treated with group 1 (A), group 2 (B), and group 3 (C) drugs for 2 hours. [³H]-TCA clearance was determined based on its accumulation in cell layers (Ctrl indicates control). Data are expressed relative to the levels found in untreated cells, arbitrarily set at a value of 100%. Data represent the means ± S.E.M. of three independent experiments. **P*<0.05; ***P*<0.01; ****P*<0.001 (compared with untreated cells).

experiments are ongoing to determine whether dilatation of bile canaliculi could occur after prolonged repeated treatments with constricting drugs at lower concentrations. No alteration in bile

canaliculi was observed with the six noncholestatic drugs. Noticeably, additional noncholestatic drugs have been tested, including ambrisentan (a member of the same endothelin receptor antagonist family as BOS)

TABLE 3

Effects of tested drugs on transcript levels of different hepatic transporters.

HepaRG cells were exposed to the three groups of compounds at the indicated concentration for 24 hours. mRNA levels were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells, arbitrarily set at a value of 1.

Drug	BA Transporters					
	BSEP	NTCP	OATB-B	MRP2	MRP3	MRP4
Group 1: drugs involved in clinical cholestasis						
BOS (100 μ M)	0.10 \pm 0.01***	0.23 \pm 0.06***	0.40 \pm 0.02*	0.99 \pm 0.16	0.62 \pm 0.08	1.08 \pm 0.16
CPZ (50 μ M)	0.5 \pm 0.2*	0.5 \pm 0.1*	1.1 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2	1.7 \pm 0.2*
CsA (50 μ M)	0.54 \pm 0.15**	0.05 \pm 0.01***	0.17 \pm 0.02***	1.8 \pm 0.15***	1.79 \pm 0.08***	2.68 \pm 0.12***
NEF (75 μ M)	0.28 \pm 0.08*	0.16 \pm 0.06***	0.32 \pm 0.07***	1.00 \pm 0.1	0.90 \pm 0.12	1.40 \pm 0.2
TRO (50 μ M)	0.58 \pm 0.11*	0.51 \pm 0.06*	0.89 \pm 0.14	0.88 \pm 0.08	1.11 \pm 0.10	0.86 \pm 0.09
Group 2: drugs involved in rare cases of clinical cholestasis						
CIM (4 mM)	0.33 \pm 0.04***	0.21 \pm 0.05**	0.63 \pm 0.09	1.00 \pm 0.31	0.89 \pm 0.07	0.99 \pm 0.26
DIC (200 μ M)	0.66 \pm 0.1*	0.56 \pm 0.1**	0.7 \pm 0.06**	1.67 \pm 0.09***	0.75 \pm 0.06	0.74 \pm 0.02**
ENT (100 μ M)	0.83 \pm 0.18	1.48 \pm 0.12	1.13 \pm 0.18	0.93 \pm 0.11	0.98 \pm 0.18	1.28 \pm 0.08
MET (3 mM)	0.30 \pm 0.06***	0.15 \pm 0.04**	0.37 \pm 0.14*	1.11 \pm 0.16	1.00 \pm 0.15	1.05 \pm 0.26
PER (20 μ M)	0.45 \pm 0.09*	0.38 \pm 0.07***	0.63 \pm 0.11	0.96 \pm 0.13	0.52 \pm 0.06**	1.43 \pm 0.15
TAC (50 μ M)	0.44 \pm 0.11**	0.23 \pm 0.08***	0.43 \pm 0.19*	2.04 \pm 0.41*	1.64 \pm 0.32*	2.60 \pm 0.51*
TOL (100 μ M)	0.20 \pm 0.04***	0.25 \pm 0.11***	0.27 \pm 0.13***	0.56 \pm 0.06**	0.48 \pm 0.05*	1.19 \pm 0.28
Group 3: drugs not involved in clinical cholestasis						
AMI (20 μ M)	1.34 \pm 0.19	0.44 \pm 0.09*	0.82 \pm 0.05	0.90 \pm 0.07	0.66 \pm 0.07	1.35 \pm 0.24
APAP (25 mM)	0.63 \pm 0.14	0.53 \pm 0.17	0.73 \pm 0.03	0.69 \pm 0.32	0.82 \pm 0.20	1.31 \pm 0.27
BUS (100 μ M)	0.32 \pm 0.03**	0.35 \pm 0.12*	0.52 \pm 0.15	1.20 \pm 0.07	1.02 \pm 0.06	1.67 \pm 0.33
FIA (100 μ M)	0.66 \pm 0.08	0.86 \pm 0.1	0.97 \pm 0.11	1.00 \pm 0.06	0.97 \pm 0.09	0.94 \pm 0.07
PIO (100 μ M)	0.66 \pm 0.08*	0.31 \pm 0.12*	0.59 \pm 0.24	1.27 \pm 0.29	1.03 \pm 0.09	1.03 \pm 0.10
XIM (100 μ M)	1.19 \pm 0.16	1.21 \pm 0.20	1.14 \pm 0.28	0.72 \pm 0.09	0.92 \pm 0.14	0.76 \pm 0.10

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (compared with untreated cells).

and ibuprofen, and were found to be similarly ineffective on the dilatation and constriction of bile canaliculi (data not shown).

Noteworthy, bile canaliculi constriction and dilatation was associated with different alterations of the ROCK/MLCK pathway. Activation of the ROCK pathway and inhibition of the MLCK pathway associated with increased phosphorylation and dephosphorylation of MLC2 were observed with constrictors and dilators, respectively (Fig. 6). Importantly, differential quantitative effects were observed, supporting the conclusion that cholestatic drugs can act by different mechanisms, involving different targets on the ROCK/MLCK pathway (Sharanek et al., 2016). The involvement of MLC2 in the occurrence of bile canaliculi constriction or dilatation was also demonstrated by using Y-27632, a ROCK-specific inhibitor, and CaM, a MLCK-specific activator, which caused inhibition of bile canaliculi constriction and dilatation respectively, giving support to the conclusion that disturbances of the ROCK/MLCK pathway preceded alterations of bile canaliculi dynamics. Interestingly, BOS combined with Y-27632 had an additive effect on bile canaliculi dilatation, showing that both drugs acted via distinct MLCK and ROCK enzymatic targets (Fig. 3G).

Drug inhibition studies of BSEP have mostly been performed using membrane vesicles overexpressing BSEP (Morgan et al., 2010). Although PHHs represent a more relevant physiologic in vitro model, they have been only rarely used (Kostrubsky et al., 2006; Swift et al., 2010; Pedersen et al., 2013). A large proportion of cholestatic drugs have been identified as BSEP inhibitors (Morgan et al., 2010; Stieger, 2010; Dawson et al., 2012; Pedersen et al., 2013), but a significant number of false positives has been found, using either vesicle assays or SCHHs (Pedersen et al., 2013). Using the TCA clearance assay, we also found that not all cholestatic drugs are inhibitors of TCA clearance. Indeed, compared with deformation of bile canaliculi associated with disruption of the ROCK/MLCK pathway induced by the 12 cholestatic drugs and not by the six noncholestatic drugs, alteration of TCA clearance was observed only with four of seven drugs known to rarely cause cholestasis

in patients (DIC, ENT, MET, and CIM). Noticeably, if DIC and ENT inhibit BSEP using transfected vesicles, MET and CIM are not classified or only weakly shown to be inhibitors of BSEP (Morgan et al., 2010). Moreover, the potent cholestatic drug CPZ was not detected as a BSEP inhibitor using transfected vesicles (Pedersen et al., 2013), whereas it appeared as a bile canaliculi constrictor and an inhibitor of TCA efflux in this study. This discrepancy could be attributed to CPZ-induced generation of reactive oxygen species that cannot be observed with transfected vesicles (Anthérieu et al., 2013). Two additional major differences were evident between transfected cells and TCA clearance assays: we observed inhibition of TCA clearance and bile canaliculi deformation with TOL and no change with PIO, whereas opposite data were reported with transfected vesicles (Morgan et al., 2010; Pedersen et al., 2013). Noticeably, PIO has been classified as either rarely cholestatic (May et al., 2002) or noncholestatic (Pedersen et al., 2013) and as a potent BSEP inhibitor (Morgan et al., 2010; Dawson et al., 2012) or not (Kaimal et al., 2009; Pedersen et al., 2013) using transfected vesicles. However, in the study by Pedersen et al. (2013), PIO at 50 μ M did not significantly inhibit TCA efflux in SCHHs. Our results were in agreement with this finding; at 100 μ M, PIO had no effect on TCA efflux or bile canaliculi dynamics. Together, these data clearly emphasize the importance of both cell model-based systems and assays to estimate BSEP inhibition. In our experimental whole-cell system, TCA efflux could not be considered as reflecting only BSEP activity. Indeed, TCA clearance was reduced by CsA to approximately 20% of control values. This strong inhibition could be due not only to an inhibition of canalicular efflux but also to an inhibition of basolateral efflux. By contrast, a dose-dependent increase in TCA efflux was obtained with DIC, likely reflecting an enhanced basolateral efflux and/or a reduced influx activity. Moreover, with some drugs (whether cholestatic or not, such as BUS), only a slight increase in TCA efflux was observed at low concentrations, whereas efflux levels at higher concentrations were comparable to those measured in control HepaRG

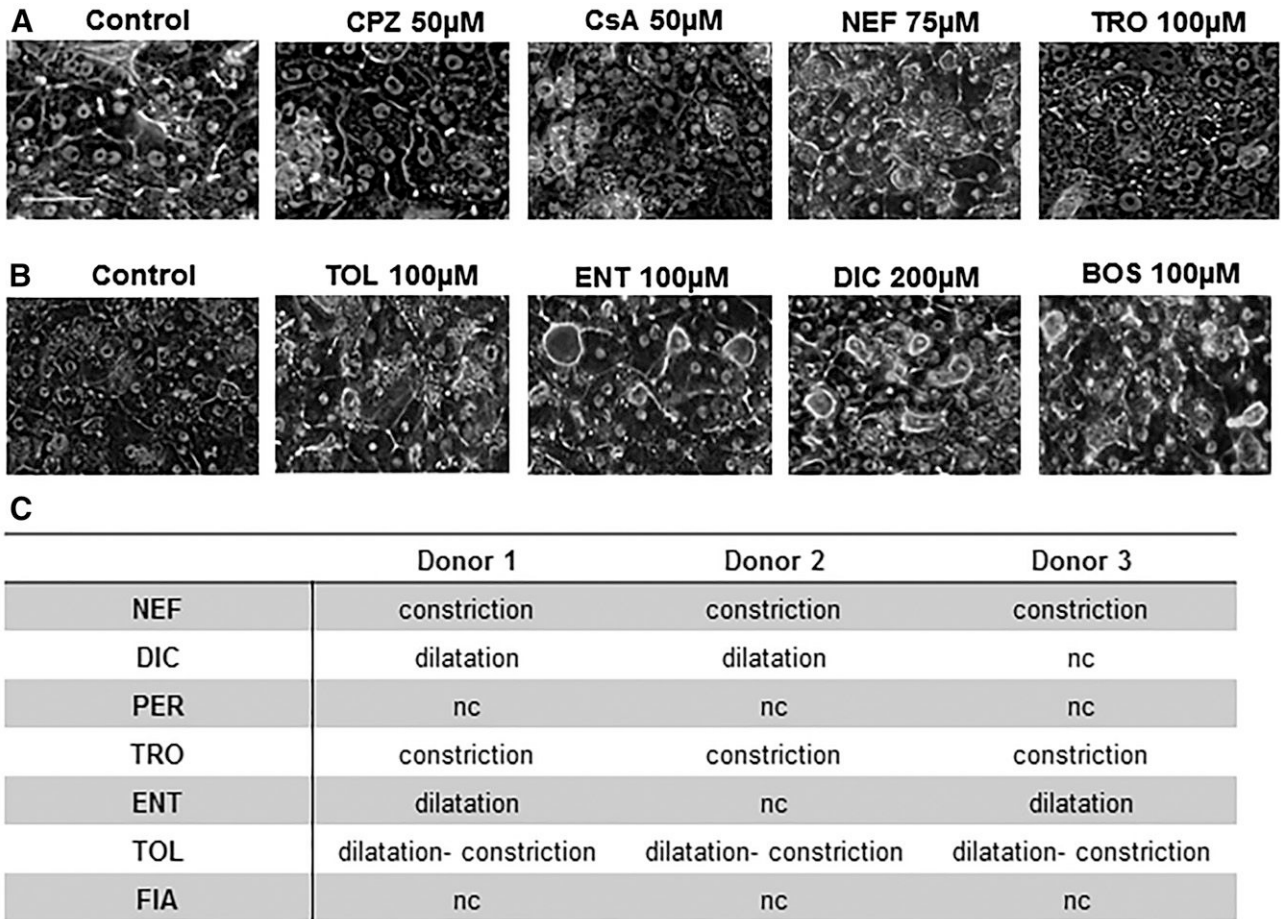


Fig. 5. Disruption of bile canaliculi (BC) rhythmic movements in 4-day PHH cultures. (A and B) Phase-contrast images after 2-hour treatment showing untreated cells (control) and cells treated with constrictors (50 μ M CPZ, 50 μ M CsA, 75 μ M NEF, and 100 μ M TRO), with 100 μ M TOL, or with dilators (100 μ M ENT, 200 μ M DIC, and 100 μ M BOS). (C) Results obtained with hepatocytes from the three donors treated with different drugs. nc indicates no change. Bar, 50 μ m.

cell cultures, confirming previously reported concentration-dependent effects of drugs on TCA efflux using SCHHs (Kostrubsky et al., 2006). With the two compounds MET and CIM, high noncytotoxic

concentrations were required to observe changes in bile canaliculi dynamics, whereas TCA efflux levels were comparable to those measured in controls but significantly decreased with low drug

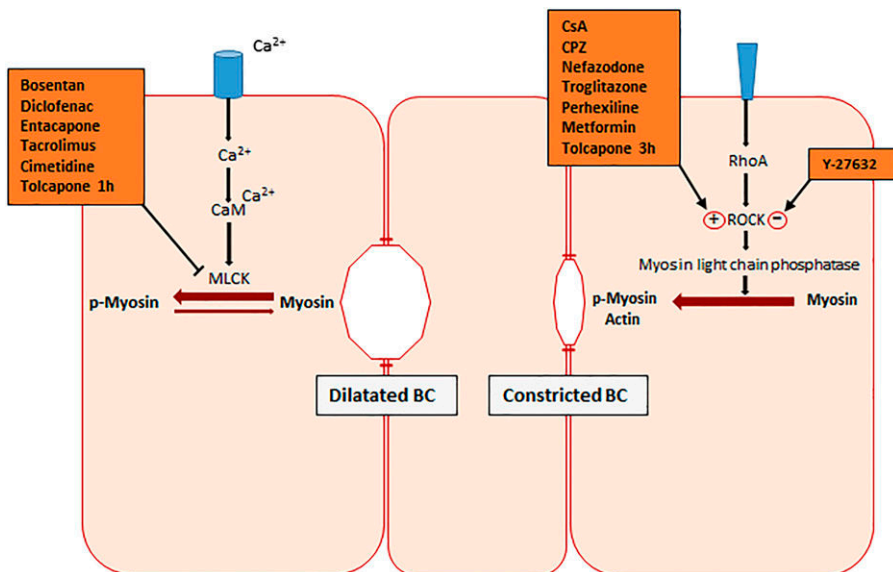


Fig. 6. Schematic representation of the molecular targets of cholestatic drugs. Dilators and TOL (within the first hour) inhibit Ca²⁺/CaM-dependent MLCK leading to dilatation. Constrictors and TOL (after 1 hour) activate ROCK activity and maintain abnormal high MLC2 phosphorylation, thereby leading to bile canaliculi (BC) constriction (Actin - Myosin interaction). Y-27632 inhibits ROCK activity and causes MLC2 dephosphorylation, thereby leading to BC dilatation.

TABLE 4

Summary of the results on the 18 tested drugs

Bile canaliculi deformation (i.e., constriction or dilatation), BSEP inhibition from the literature (vesicles), [³H]-TCA clearance (control = 100%), BSEP mRNA expression (control = 1), MLC2 phosphorylation state, and MLCK/ROCK implication are summarized. Human BSEP inhibition levels in transfected vesicles are taken from the literature and expressed as high, medium, and low or absent.

Drug	Bile Canaliculi Deformation	BSEP Inhibition, Vesicles	[³ H]-TCA Clearance (Control = 100%)	BSEP mRNA Expression (Control = 1)	MLC2 Phosphorylation State	MLCK/ROCK Implication
Group 1: drugs involved in clinical cholestasis						
BOS	Dilatation	++ ^{a,b,c,d}	64.24 ± 4.13**	0.10 ± 0.01***	Dephosphorylation	MLCK
CPZ	Constriction	+ ^{a,c,d}	49.96 ± 5.14*	0.5 ± 0.2*	Phosphorylation	ROCK
CsA	Constriction	++ ^{a,b,c,d}	13.16 ± 1.48**	0.54 ± 0.15**	Phosphorylation	ROCK
NEF	Constriction	++ ^{a,b,c,d}	52.46 ± 3.87***	0.28 ± 0.08*	Phosphorylation	ROCK
TRO	Constriction	++ ^{a,b,c,d}	21.97 ± 3.72***	0.58 ± 0.11*	Phosphorylation	ROCK
Group 2: drugs involved in rare cases of clinical cholestasis						
CIM	Dilatation	+ ^a	86.25 ± 12.12	0.33 ± 0.04***	Dephosphorylation	MLCK
DIC	Dilatation	+ ^{a,d}	384.8 ± 57.96**	0.66 ± 0.1*	Dephosphorylation	MLCK
ENT	Dilatation	- ^{b,d}	109.2 ± 16.94	0.83 ± 0.18	Dephosphorylation	MLCK
MET	Constriction	- ^{a,d}	99.41 ± 8.45	0.30 ± 0.06***	Phosphorylation	ROCK
PER	Constriction	- ^d	41.43 ± 8.22**	0.45 ± 0.09*	Phosphorylation	ROCK
TAC	Dilatation	- ^b	56.14 ± 2.71***	0.44 ± 0.11**	Dephosphorylation	MLCK
TOL	Dilatation then constriction	+ ^{b,c,d}	48.36 ± 8.14**	0.20 ± 0.04***	No change	MLCK - ROCK
Group 3: drugs not involved in clinical cholestasis						
AMI	No change	+ ^{a,b,d}	115.6 ± 15.62	1.34 ± 0.19	No change	—
APAP	No change	- ^{c,d}	137.2 ± 24.33	0.63 ± 0.14	No change	—
BUS	No change	- ^{a,c,d}	86.07 ± 13.39	0.32 ± 0.03**	No change	—
FIA	No change	- ^d	91.34 ± 9.14	0.66 ± 0.08	No change	—
PIO	No change	+ ^{a,b,c,d}	86.15 ± 3.34	0.66 ± 0.08	No change	—
XIM	No change	- ^d	96.71 ± 10.91	1.19 ± 0.16	No change	—

^aPedersen et al. (2013).

^bMorgan et al. (2010).

^cDawson et al. (2012).

^dP. Krajcsi (unpublished data).

P* < 0.01; *P* < 0.05; ****P* < 0.001.

—, no implication for the six drugs.

concentrations. By contrast, ENT did not inhibit TCA efflux at any of the concentrations tested. Together, these data support the conclusion that not all cholestatic drugs induce accumulation of TCA in HepaRG cells and that its clearance can be modulated by different mechanisms other than direct alteration of BSEP activity.

Most studies have focused on interactions between drugs and BSEP without considering perturbation of expression of this transporter. Recently, one group (Garzel et al., 2014) analyzed 30 drugs for their ability to perturb BSEP expression in PHH cultures after 24-hour treatment and classified them into three categories according to their capacity to strongly (>60%), moderately (20%–60%), or not repress the transporter. In this study, we analyzed four of these compounds. Similarly, we found a strong repression of BSEP expression with TRO and BOS, which were tested at comparable concentrations, but we demonstrated a strong repression with NEF and CsA, which were tested at higher concentrations. As shown here, the effects of cholestatic and noncholestatic drugs on BA transporter expression depended on the drug concentration and the transporter tested (Supplemental Fig. 3A). To note, most cholestatic drugs repressed BSEP, NTCP, and OATP-B at concentrations that caused bile canaliculi deformations, suggesting that in vitro experimental conditions (drug concentrations, in vitro models, etc.) are critical for obtaining correct results. The three BA transporters were also repressed by some noncholestatic drugs. Interestingly, it has been found that downregulation of transporters also occurs at the mRNA level in the human cholestatic liver, as observed for BSEP, NTCP, and OATP (Zollner et al., 2001). More variable results were obtained with MRPs (Table 3). The most important changes were induction of MRP2–MRP4 with CsA and TAC and of MRP2 with DIC. MRP3

upregulation has been described as a compensatory mechanism to BA accumulation in the cholestatic rat liver (Donner and Keppler 2001). Since transcript levels were measured 24 hours after drug addition, their changes more likely reflected secondary effects rather than direct and specific drug effects.

Interestingly, different responses were obtained with drugs of the same family as observed with TOL and ENT (as described above) as well as CsA and TAC, which caused bile canaliculi constriction and dilatation, respectively. TAC has been reported to cause rare cases of cholestasis in infants. Accordingly, TAC induced dilatation at only 50 μM in this study. Since TAC is used at 10- to 100-fold lower therapeutic doses than CsA, the absence of hepatotoxic and cholestatic effects at concentrations up to 25 μM was in full agreement with reports of its clinical safety (Mihatsch et al., 1998). Accordingly, considering the C_{max} values measured in patients (1.15 and 0.09 μM for CsA and TAC, respectively), cholestatic concentrations are expected to be reached normally only in patients treated with CsA. However, considering the 12 tested cholestatic drugs, no direct correlation could be established between C_{max} values (Table 2) and their in vitro concentrations inducing bile canaliculi deformation, confirming data reported with BSEP inhibition assays on a large set of compounds (Dawson et al., 2012; Köck et al., 2014).

Bile canaliculi deformation was also investigated in PHH cultures from three donors treated with some of the tested compounds. If bile canaliculi constriction and dilatation was induced by all cholestatic drugs except PER, donor–donor differences were observed. Only four of eight tested cholestatic compounds were found to cause alterations or no changes of bile canaliculi structures in the three hepatocyte populations.

Among the factors that could explain donor differences were variations in drug metabolism and detoxification capacity and/or BA transporter levels. Nevertheless, these data with PHHs confirm those obtained with HepaRG cells and support the suitability of this model as a reproducible, easy-to-use liver cell model for screening and mechanistic studies for the identification of drug-induced cholestasis.

In summary, early bile canaliculi deformations resulting in constriction or dilatation of the canalicular lumen associated with alterations of the ROCK/MLCK pathway were observed with all tested cholestatic drugs, including those that are not BSEP inhibitors (Table 4). Together, our results favor the conclusion that alterations of bile canaliculi dynamics with the involvement of the ROCK/MLCK pathway are more specific predictive markers than TCA clearance and direct BSEP inhibition to screen the cholestatic potential of new chemical entities.

Acknowledgments

The authors thank R. Le Guevel (ImpPACcell Platform, BIOSIT, Université Rennes 1, Rennes, France) for imaging analysis.

Authorship Contributions

Participated in research design: Burbank, Burban, Sharanek, Guillouzo.

Conducted experiments: Burbank.

Performed data analysis: Burbank, Weaver, Guguen-Guillouzo, Guillouzo.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Burbank, Weaver, Guillouzo.

References

- Aninat C, Piton A, Glaire D, Le Charpentier T, Langouët S, Morel F, Guguen-Guillouzo C, and Guillouzo A (2006) Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* **34**:75–83.
- Anthérieu S, Bachour-El Azzi P, Dumont J, Abdel-Razzak Z, Guguen-Guillouzo C, Fromenty B, Robin MA, and Guillouzo A (2013) Oxidative stress plays a major role in chlorpromazine-induced cholestasis in human HepaRG cells. *Hepatology* **57**:1518–1529.
- Anthérieu S, Rogue A, Fromenty B, Guillouzo A, and Robin MA (2011) Induction of vesicular steatosis by amiodarone and tetracycline is associated with up-regulation of lipogenic genes in HepaRG cells. *Hepatology* **53**:1895–1905.
- Arias IM, Che M, Gatmaitan Z, Leveille C, Nishida T, and St Pierre M (1993) The biology of the bile canaliculus, 1993. *Hepatology* **17**:318–329.
- Bachour-El Azzi P, Sharanek A, Burban A, Li R, Guével RL, Abdel-Razzak Z, Stieger B, Guguen-Guillouzo C, and Guillouzo A (2015) Comparative localization and functional activity of the main hepatobiliary transporters in HepaRG cells and primary human hepatocytes. *Toxicol Sci* **145**:157–168.
- Banks AT, Zimmerman HJ, Ishak KG, and Harter JG (1995) Diclofenac-associated hepatotoxicity: analysis of 180 cases reported to the Food and Drug Administration as adverse reactions. *Hepatology* **22**:820–827.
- Bramow S, Ott P, Thomsen Nielsen F, Bangert K, Tygstrup N, and Dalhoff K (2001) Cholestasis and regulation of genes related to drug metabolism and biliary transport in rat liver following treatment with cyclosporine A and sirolimus (Rapamycin). *Pharmacol Toxicol* **89**:133–139.
- Brouwer KLR, Keppler D, Hoffmaster KA, Bow DA, Cheng Y, Lai Y, Palm JE, Stieger B, and Evers R; International Transporter Consortium (2013) In vitro methods to support transporter evaluation in drug discovery and development. *Clin Pharmacol Ther* **94**:95–112.
- Cerec V, Glaire D, Garnier D, Morosan S, Turfin B, Drenou B, Gripon P, Kremsdorf D, Guguen-Guillouzo C, and Corlu A (2007) Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* **45**:957–967.
- Chu XY, Bleasby K, Yabut J, Cai X, Chan GH, Hafey MJ, Xu S, Bergman AJ, Braun MP, Dean DC, et al. (2007) Transport of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin by human organic anion transporter 3, organic anion transporting polypeptide 4C1, and multidrug resistance P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* **321**:673–683.
- Chung KW, Han NI, Choi SW, Ahn BM, Yoon SK, Nam SW, Lee YS, Han JY, and Sun HS (2002) Increased microfilaments in hepatocytes and biliary ductular cells in cholestatic liver diseases. *J Korean Med Sci* **17**:795–800.
- Dawson S, Stahl S, Paul N, Barber J, and Kenna JG (2012) In vitro inhibition of the bile salt export pump correlates with risk of cholestatic drug-induced liver injury in humans. *Drug Metab Dispos* **40**:130–138.
- Dhillon S and Keating GM (2009) Bosentan: a review of its use in the management of mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiovasc Drugs* **9**:331–350.
- Donner MG and Keppler D (2001) Up-regulation of basolateral multidrug resistance protein 3 (Mrp3) in cholestatic rat liver. *Hepatology* **34**:351–359.
- Dykens JA, Jamieson JD, Marroquin LD, Nadanaciva S, Xu JJ, Dunn MC, Smith AR, and Will Y (2008) In vitro assessment of mitochondrial dysfunction and cytotoxicity of nefazodone, trazodone, and buspirone. *Toxicol Sci* **103**:335–345.
- Ellis LCJ, Grant MH, Hawksworth GM, and Weaver RJ (2014) Quantification of biliary excretion and sinusoidal excretion of 5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) in cultured hepatocytes isolated from Sprague Dawley, Wistar and Mrp2-deficient Wistar (TR(-)) rats. *Toxicol In Vitro* **28**:1165–1175.
- Fattinger K, Funk C, Pantze M, Weber C, Reichen J, Stieger B, and Meier PJ (2001) The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther* **69**:223–231.
- Feuer G and Di Fonzo CJ (1992) Intrahepatic cholestasis: a review of biochemical-pathological mechanisms. *Drug Metabol Drug Interact* **10**:1–161.
- Fisher A, Croft-Baker J, Davis M, Purcell P, and McLean AJ (2002) Entacapone-induced hepatotoxicity and hepatic dysfunction. *Mov Disord* **17**:1362–1365; discussion 1397–1400.
- Fromenty B and Paysseur D (1995) Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* **67**:101–154.
- Garzel B, Yang H, Zhang L, Huang S-M, Polli JE, and Wang H (2014) The role of bile salt export pump gene repression in drug-induced cholestatic liver toxicity. *Drug Metab Dispos* **42**:318–322.
- Graf J, Gautam A, and Boyer JL (1984) Isolated rat hepatocyte couplets: a primary secretory unit for electrophysiologic studies of bile secretory function. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**:6516–6520.
- Guguen-Guillouzo C, Campion JP, Brissot P, Glaire D, Launois B, Bourel M, and Guillouzo A (1982) High yield preparation of isolated human adult hepatocytes by enzymatic perfusion of the liver. *Cell Biol Int Rep* **6**:625–628.
- Guguen-Guillouzo C and Guillouzo A (2010) General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* **640**:1–40.
- Imanari H, Kuroda H, and Tamura K (1981) Microfilaments around the bile canaliculi in patients with intrahepatic cholestasis. *Gastroenterol Jpn* **16**:168–173.
- Jansen PL, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Hooiveld GJ, Koning JH, De Jager-Krieken A, Kuipers F, Stellaard F, et al. (1999) Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **117**:1370–1379.
- Kaimal R, Song X, Yan B, King R, and Deng R (2009) Differential modulation of farnesoid X receptor signaling pathway by the thiazolidinediones. *J Pharmacol Exp Ther* **330**:125–134.
- Keisu M and Andersson TB (2010) Drug-induced liver injury in humans: the case of ximelagatran. *Handbook Exp Pharmacol* **196**:407–418.
- Kenna JG (2014) Current concepts in drug-induced bile salt export pump (BSEP) interference. *Curr Protoc Toxicol* **61**:23.7.1–23.7.15.
- Kenne K, Skanberg I, Glinghammar B, Berson A, Paysseur D, Flinois JP, Beaune P, Edebert I, Pohl CD, Carlsson S, et al. (2008) Prediction of drug-induced liver injury in humans by using in vitro methods: the case of ximelagatran. *Toxicol In Vitro* **22**:730–746.
- Köck K, Ferleser BC, Netterberg I, Yang K, Urban TJ, Swaan PW, Stewart PW, and Brouwer KL (2014) Risk factors for development of cholestatic drug-induced liver injury: inhibition of hepatic basolateral bile acid transporters multidrug resistance-associated proteins 3 and 4. *Drug Metab Dispos* **42**:665–674.
- Kostrubsky SE, Strom SC, Kalgutkar AS, Kulkarni S, Atherton J, Mireles R, Feng B, Kubik R, Hanson J, Urda E, et al. (2006) Inhibition of hepatobiliary transport as a predictive method for clinical hepatotoxicity of nefazodone. *Toxicol Sci* **90**:451–459.
- Lee WM (2003) Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* **349**:474–485.
- Liguori MJ, Blomme EAG, and Waring JF (2008) Trovafloxacin-induced gene expression changes in liver-derived in vitro systems: comparison of primary human hepatocytes to HepG2 cells. *Drug Metab Dispos* **36**:223–233.
- Longo DM, Yang Y, Watkins PB, Howell BA, and Siler SQ (2016) Elucidating differences in the hepatotoxic potential of tolcapone and entacapone with DILSym®, a mechanistic model of drug-induced liver injury. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* **5**:31–39.
- Mano Y, Usui T, and Kamimura H (2007) Effects of bosentan, an endothelin receptor antagonist, on bile salt export pump and multidrug resistance-associated protein 2. *Biopharm Drug Dispos* **28**:13–18.
- May LD, Lefkowitz JH, Kram MT, and Rubin DE (2002) Mixed hepatocellular-cholestatic liver injury after pioglitazone therapy. *Ann Intern Med* **136**:449–452.
- McGill MR, Sharpe MR, Williams CD, Taha M, Curry SC, and Jaeschke H (2012) The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. *J Clin Invest* **122**:1574–1583.
- Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickeleit V, and Ryyfel B (1998) The side-effects of ciclosporin-A and tacrolimus. *Clin Nephrol* **49**:356–363.
- Mohi-ud-din R and Lewis JH (2004) Drug- and chemical-induced cholestasis. *Clin Liver Dis* **8**:95–132.
- Morgan RE, Trauner M, van Staden CJ, Lee PH, Ramachandran B, Eschenberg M, Afshari CA, Qualls CW, Jr, Lightfoot-Dunn R, and Hamadeh HK (2010) Interference with bile salt export pump function is a susceptibility factor for human liver injury in drug development. *Toxicol Sci* **118**:485–500.
- Morgan RE, van Staden CJ, Chen Y, Kalyanaraman N, Kalanzi J, Dunn RT, 2nd, Afshari CA, and Hamadeh HK (2013) A multifactorial approach to hepatobiliary transporter assessment enables improved therapeutic compound development. *Toxicol Sci* **136**:216–241.
- Nammour FE, Fayad NF, and Peikin SR (2003) Metformin-induced cholestatic hepatitis. *Endocr Pract* **9**:307–309.
- Padda MS, Sanchez M, Akhtar AJ, and Boyer JL (2011) Drug-induced cholestasis. *Hepatology* **53**:1377–1387.
- Pauli-Magnus C and Meier PJ (2006) Hepatobiliary transporters and drug-induced cholestasis. *Hepatology* **44**:778–787.
- Pedersen JM, Matsson P, Bergström CAS, Hoogstraate J, Norén A, LeCluyse EL, and Artursson P (2013) Early identification of clinically relevant drug interactions with the human bile salt export pump (BSEP/ABCC11). *Toxicol Sci* **136**:328–343.
- Pomponio G, Savary CC, Parmentier C, Bois F, Guillouzo A, Romanelli L, Richert L, Di Consiglio E, and Testai E (2015) In vitro kinetics of amiodarone and its major metabolite in two human liver cell models after acute and repeated treatments. *Toxicol In Vitro* **30** (Pt A):36–51.
- Regenthal R, Krueger M, Koeppel C, and Preiss R (1999) Drug levels: therapeutic and toxic serum/plasma concentrations of common drugs. *J Clin Monit Comput* **15**:529–544.
- Saadi T, Waterman M, Yassin H, and Baruch Y (2013) Metformin-induced mixed hepatocellular and cholestatic hepatic injury: case report and literature review. *Int J Gen Med* **6**:703–706.
- Schadt S, Simon S, Kustermann S, Boess F, McGinnis C, Brink A, Lieven R, Fowler S, Youdim K, Ullah M, et al. (2015) Minimizing DILI risk in drug discovery - a screening tool for drug candidates. *Toxicol In Vitro* **30** (Pt B):429–437.
- Sharanek A, Azzi PBE, Al-Attrache H, Savary CC, Humbert L, Rainteau D, Guguen-Guillouzo C, and Guillouzo A (2014) Different dose-dependent mechanisms are involved in early cyclosporine a-induced cholestatic effects in hepaRG cells. *Toxicol Sci* **141**:244–253.
- Sharanek A, Burban A, Burbank M, Le Guevel R, Li R, Guillouzo A, and Guguen-Guillouzo C (2016) Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway plays a key role in the impairment of bile canaliculi dynamics induced by cholestatic drugs. *Sci Rep* **6**:24709.
- Sharanek A, Burban A, Humbert L, Bachour-El Azzi P, Felix-Gomes N, Rainteau D, and Guillouzo A (2015) Cellular accumulation and toxic effects of bile acids in cyclosporine A-treated HepaRG hepatocytes. *Toxicol Sci* **147**:573–587.

- Smith KS, Smith PL, Heady TN, Trugman JM, Harman WD, and Macdonald TL (2003) In vitro metabolism of tolcapone to reactive intermediates: relevance to tolcapone liver toxicity. *Chem Res Toxicol* **16**:123–128.
- Spigset O, Hägg S, and Bate A (2003) Hepatic injury and pancreatitis during treatment with serotonin reuptake inhibitors: data from the World Health Organization (WHO) database of adverse drug reactions. *Int Clin Psychopharmacol* **18**:157–161.
- Stieger B (2010) Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis. *Drug Metab Rev* **42**:437–445.
- Swift B, Pfeifer ND, and Brouwer KL (2010) Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* **42**:446–471.
- Thibault N, Claude JR, and Ballet F (1992) Actin filament alteration as a potential marker for cholestasis: a study in isolated rat hepatocyte couplets. *Toxicology* **73**:269–279.
- Toyoda Y, Tamai M, Kashikura K, Kobayashi S, Fujiyama Y, Soga T, and Tagawa Y (2012) Acetaminophen-induced hepatotoxicity in a liver tissue model consisting of primary hepatocytes assembling around an endothelial cell network. *Drug Metab Dispos* **40**:169–177.
- Treiber A, Schneiter R, Häusler S, and Stieger B (2007) Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab Dispos* **35**:1400–1407.
- Tujjos S and Fontana RJ (2011) Mechanisms of drug-induced liver injury: from bedside to bench. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **8**:202–211.
- Velayudham LS and Farrell GC (2003) Drug-induced cholestasis. *Expert Opin Drug Saf* **2**:287–304.
- Watanabe N, Tsukada N, Smith CR, and Phillips MJ (1991) Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J Cell Biol* **113**:1069–1080.
- Watkins PB and Whitcomb RW (1998) Hepatic dysfunction associated with troglitazone. *N Engl J Med* **338**:916–917.
- Xu JJ, Henstock PV, Dunn MC, Smith AR, Chabot JR, and de Graaf D (2008) Cellular imaging predictions of clinical drug-induced liver injury. *Toxicol Sci* **105**:97–105.
- Zamek-Gliszczynski MJ, Hoffmaster KA, Tweedie DJ, Giacomini KM, and Hillgren KM (2012) Highlights from the International Transporter Consortium second workshop. *Clin Pharmacol Ther* **92**:553–556.
- Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C, Kenner L, Ferenci P, Stauber RE, Krejs GJ, Denk H, et al. (2001) Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* **33**:633–646.

Address correspondence to: André Guillouzo, INSERM UMR991, Faculté de Pharmacie, 2 avenue L. Bernard, 35043 Rennes Cedex, France. E-mail: andre.guillouzo@univ-rennes1.fr

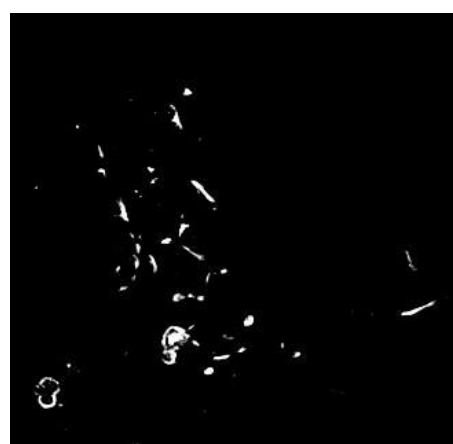
Drug Metabolism and Disposition

Early alterations of bile canaliculi dynamics and the ROCK/MLCK pathway are characteristic of drug-induced intrahepatic cholestasis

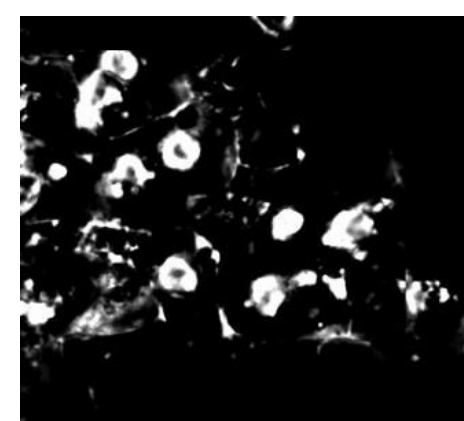
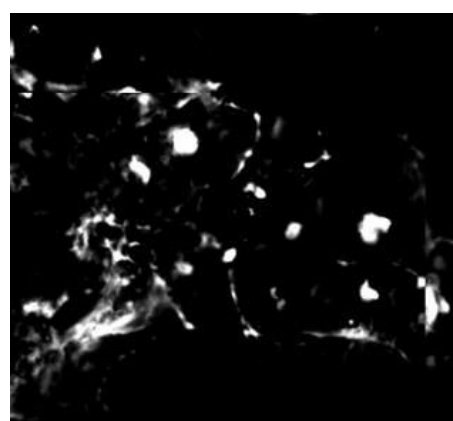
Matthew G. Burbank, Audrey Burban, Ahmad Sharaneq, Richard J. Weaver, Christiane Guguen-Guillouzo, André Guillouzo

Supplemental figure. 1.

A

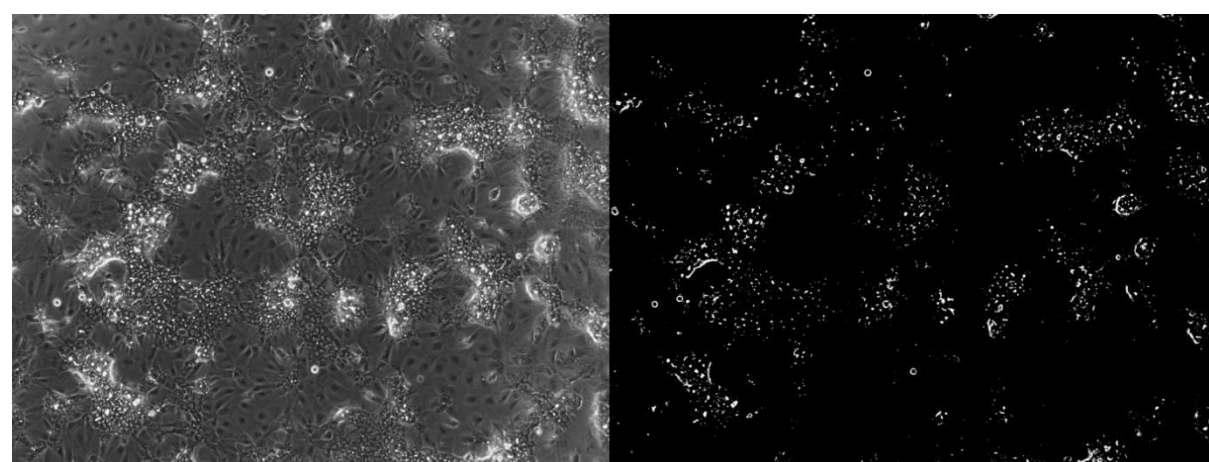
CsA 50 μ M (CONSTRICTION)

Integrated density	8629394	6856399
% white surface	100%	79.4%

ENT 100 μ M (DILATATION)

Integrated density	29518021	41731151
% white surface	100%	141.3%

B



Phase contrast picture

Density adjustment

Supplemental Figure. 1. Method for BC constriction/dilatation quantification

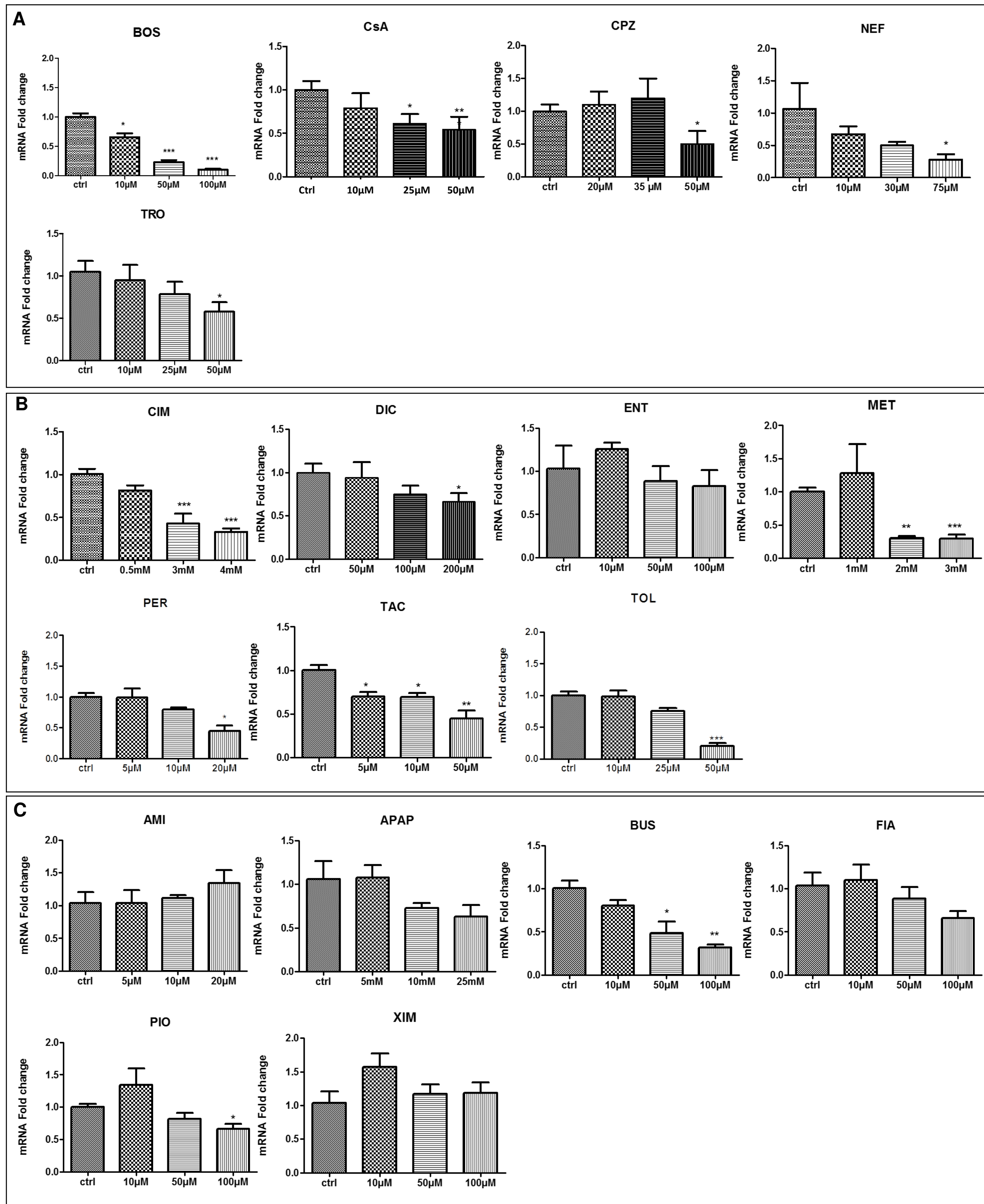
(A), Cells were treated with 50 μ M CsA (constriction) or 100 μ M ENT (dilatation) for 2h. Canalicular lumen surfaces appeared bright (white) and hepatocytes/biliary cells denser (black) using a phase-contrast microscope Zeiss Axiovert 200M. Brightness parameters were adjusted to eliminate non corresponding objects and analysis was performed on at least 4 images per each condition (well). White canalicular lumen was then quantified using the image J software every 10min for 24h. The integrated density was determined and then expressed as percent of the control (T0). (B), differences between a phase contrast picture and the same picture after density adjustment.

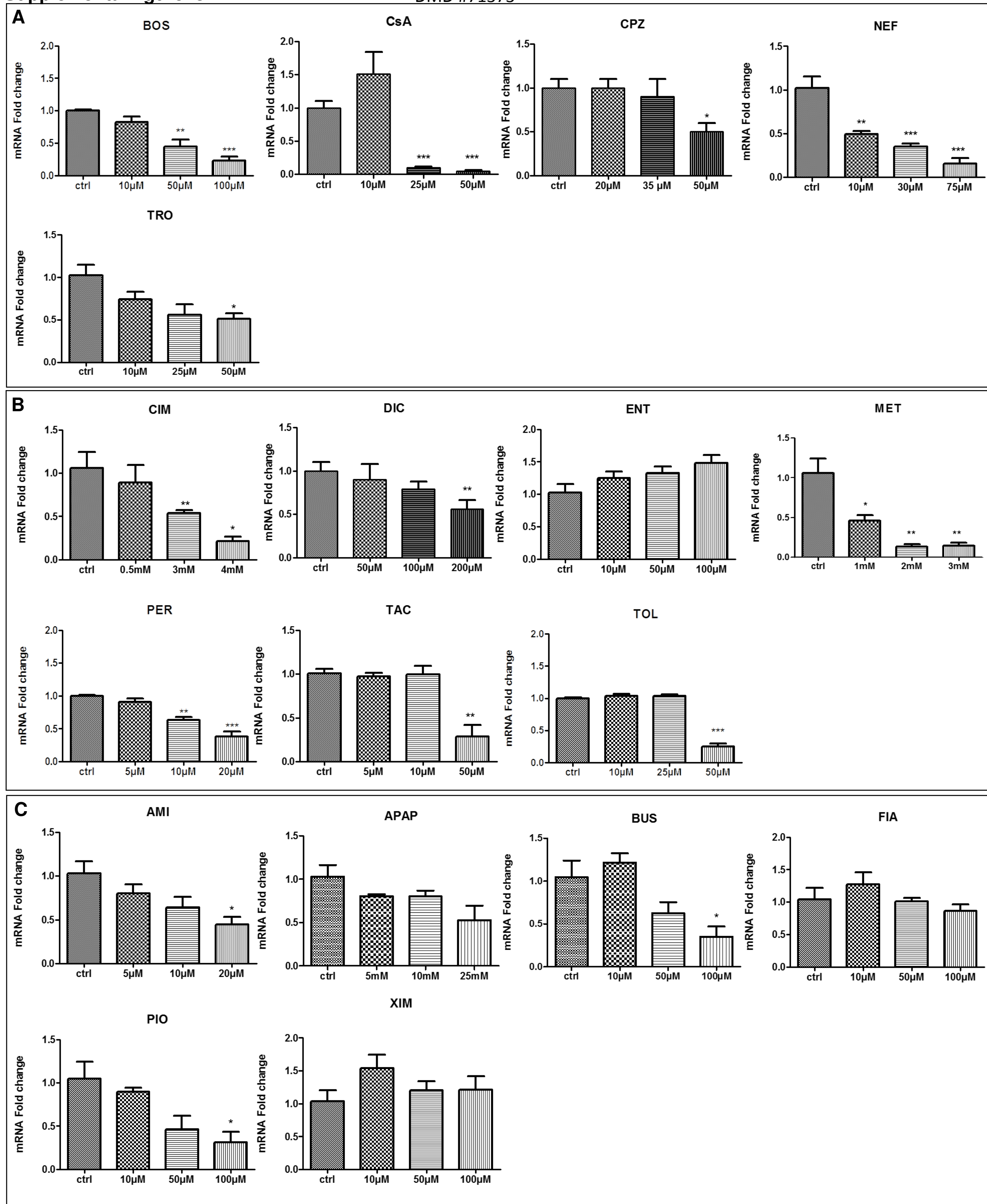
Supplemental table 1.

	Drugs
BC dilatation	BOS, DIC, ENT, TAC, CIM
BC constriction	CPZ, CsA, NEF, TRO, PER, MET
BC dilatation then constriction	TOL
No effect on BC	AMI, APAP, BUS, FIA, PIO, XIM

Supplemental Table 1. Drug-induced BC modulations

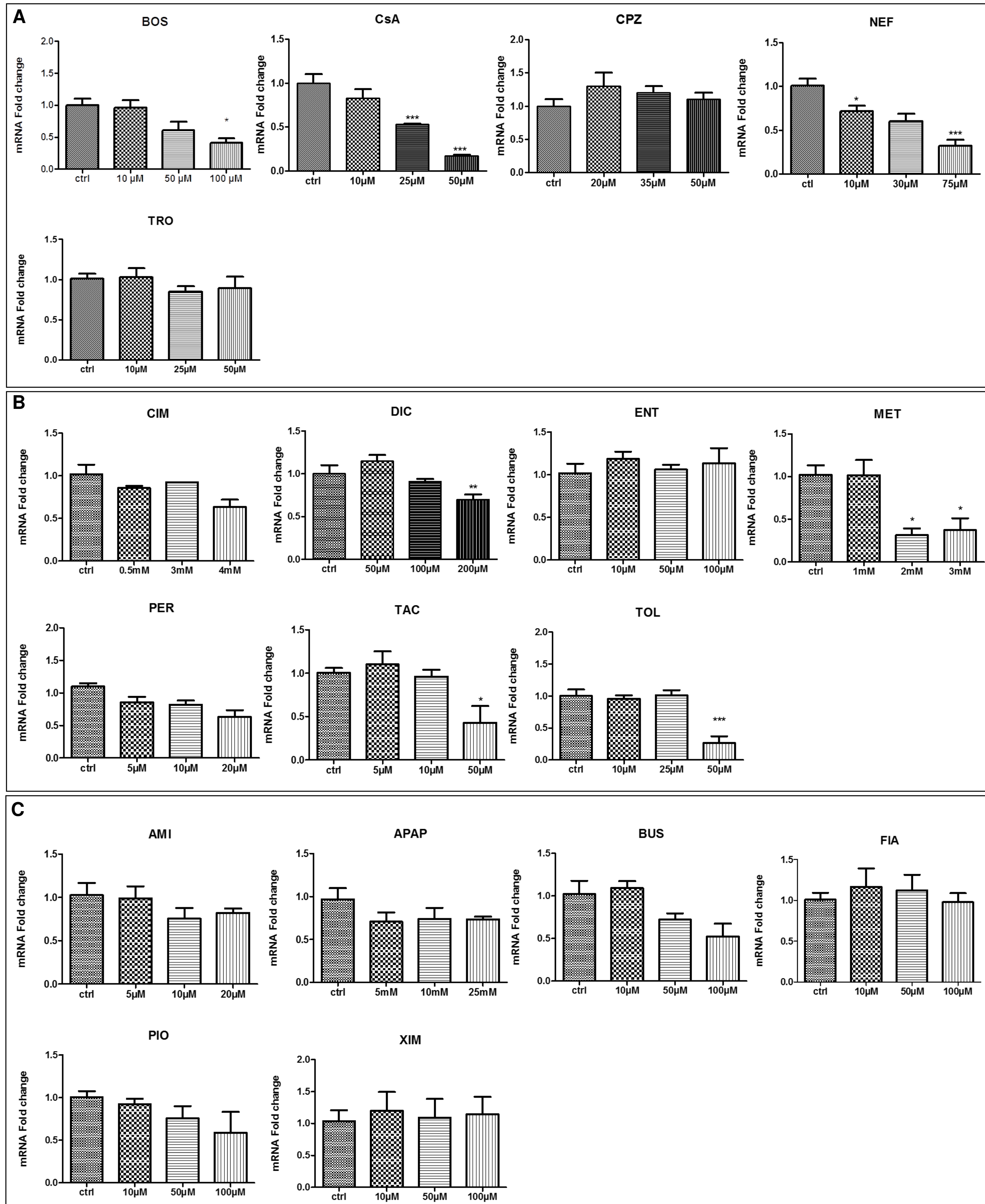
AMI, amiodarone; APAP, acetaminophen; BOS, bosentan; BUS, buspirone; CIM, cimetidine; CPZ, chlorpromazine; CsA, cyclosporine A; DIC, diclofenac; ENT, entacapone; FIA, fialuridine; MET, metformin; NEF, nefazodone; PER, perhexiline; PIO, pioglitazone; TAC, tacrolimus; TOL, tolcapone; TRO troglitazone; XIM, ximelagatran.





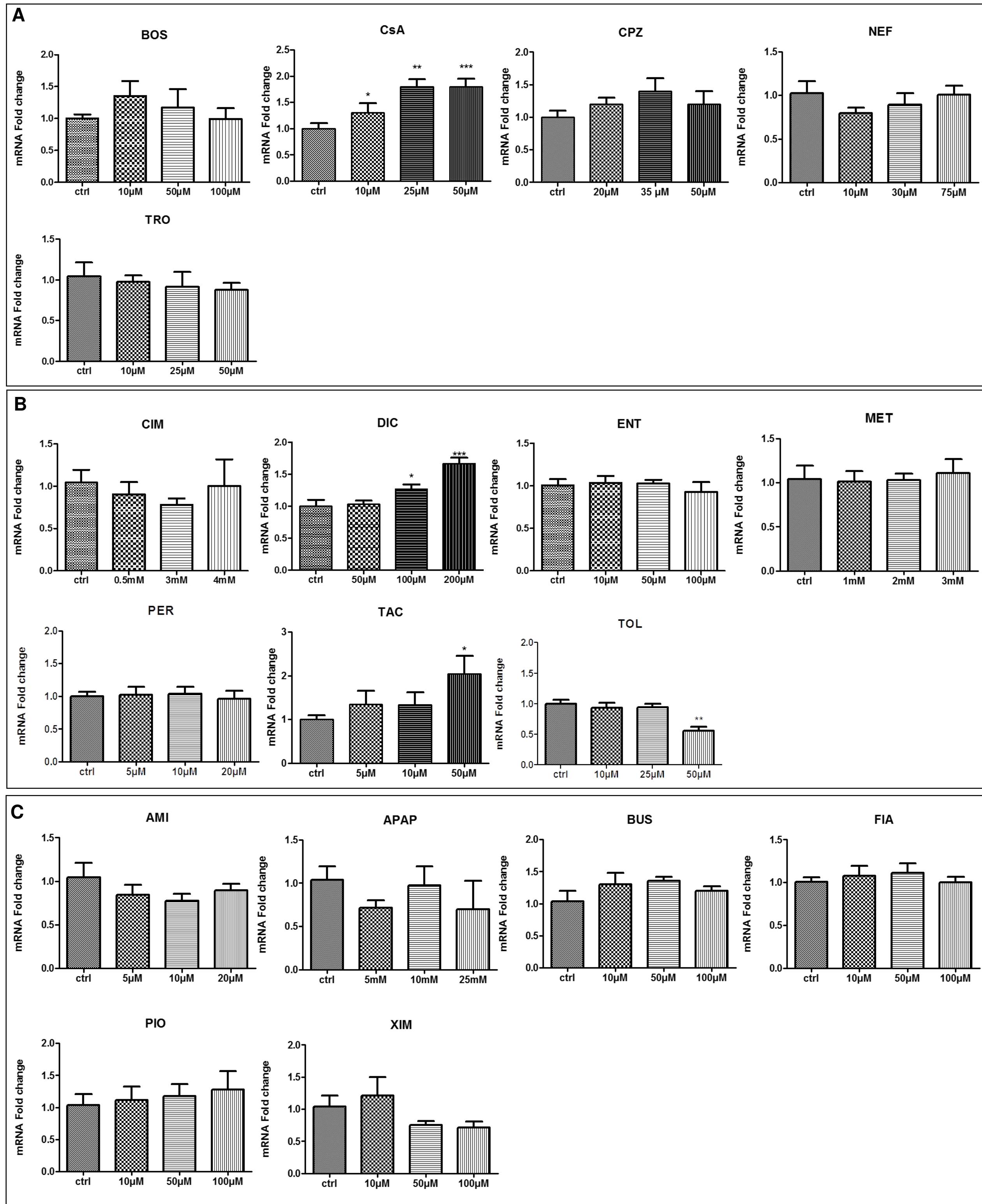
Supplemental figure. 3. Effects of the tested drugs on NTCP transcript levels

HepaRG cells were exposed to the 3 groups of compounds at 3 different concentrations for 24h : group 1 (A), group 2 (B) and group 3 (C). mRNA levels of NTCP were measured by RT-PCR analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells (ctrl), arbitrarily set at a value of 1. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001 compared with untreated cells.



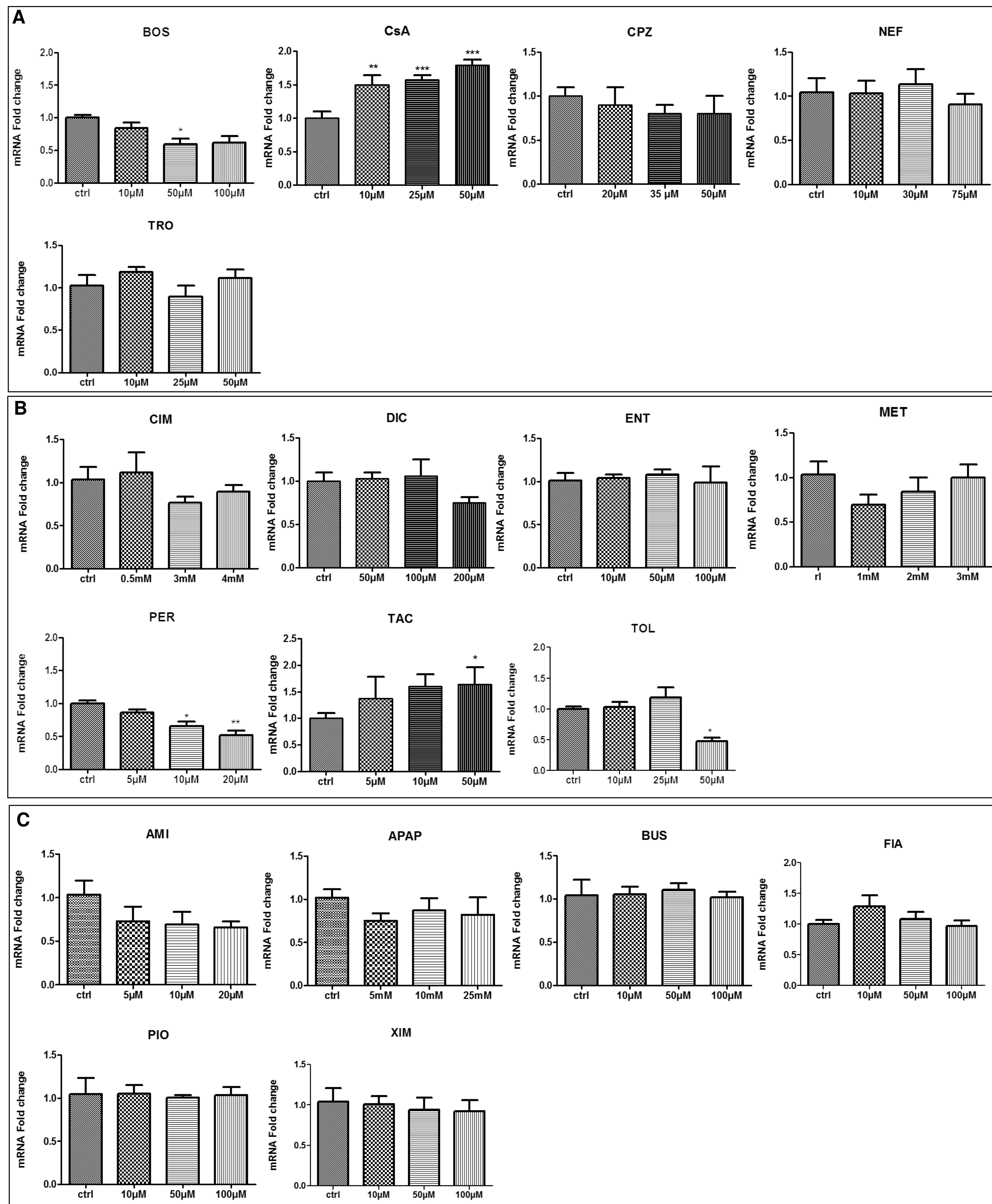
Supplemental figure. 4. Effects of the tested drugs on OATP-B transcript levels

HepaRG cells were exposed to the 3 groups of compounds at 3 different concentrations for 24h : group 1 (A), group 2 (B) and group 3 (C). mRNA levels of OATP-B were measured by RT-PCR analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells (ctrl), arbitrarily set at a value of 1. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001 compared with untreated



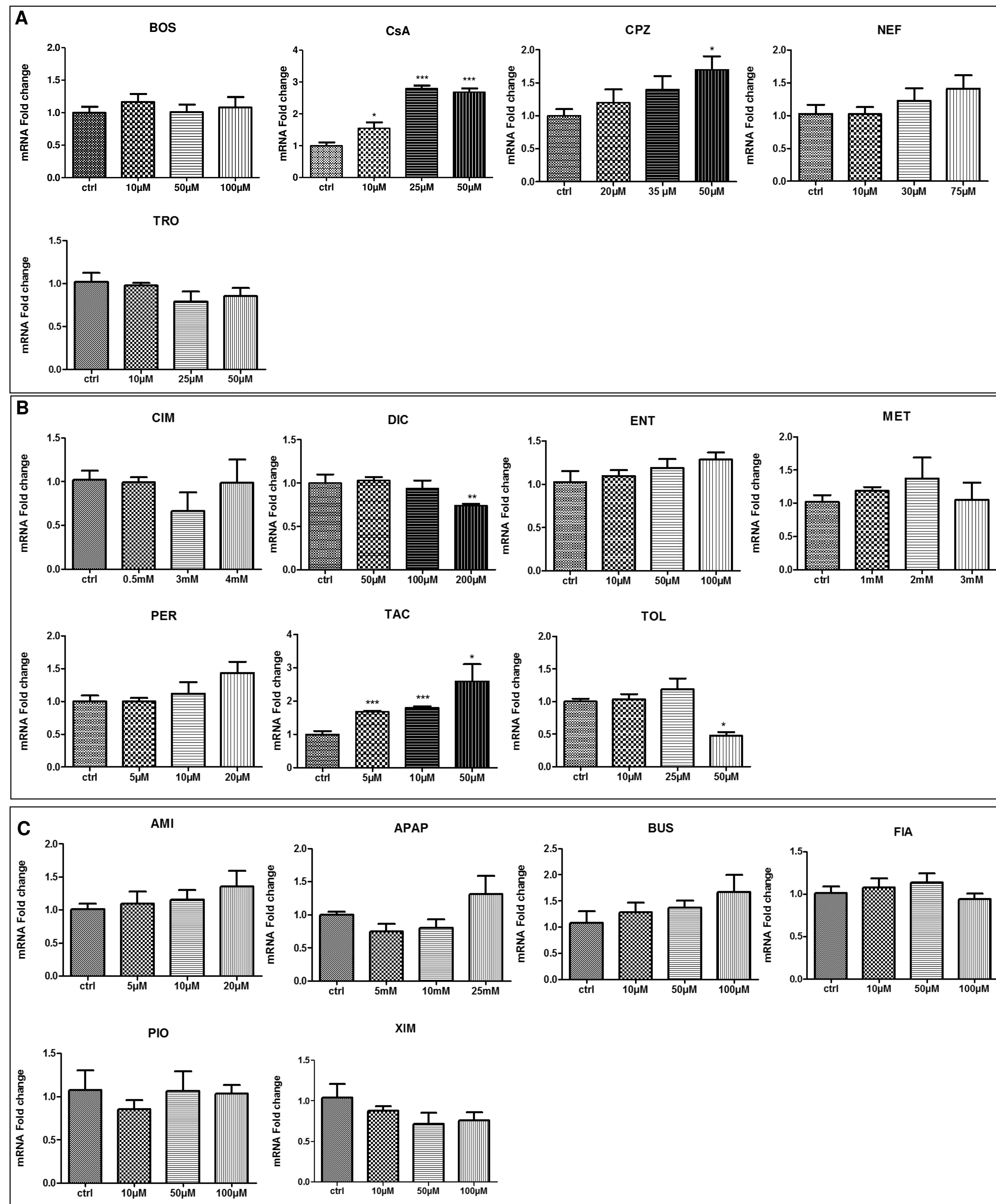
Supplemental figure 5. Effects of the tested drugs on MRP2 transcript levels

HepaRG cells were exposed to the 3 groups of compounds at 3 different concentrations for 24h : group 1 (A), group 2 (B) and group 3 (C). mRNA levels of MRP2 were measured by RT-PCR analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells (ctrl), arbitrarily set at a value of 1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with untreated cells.



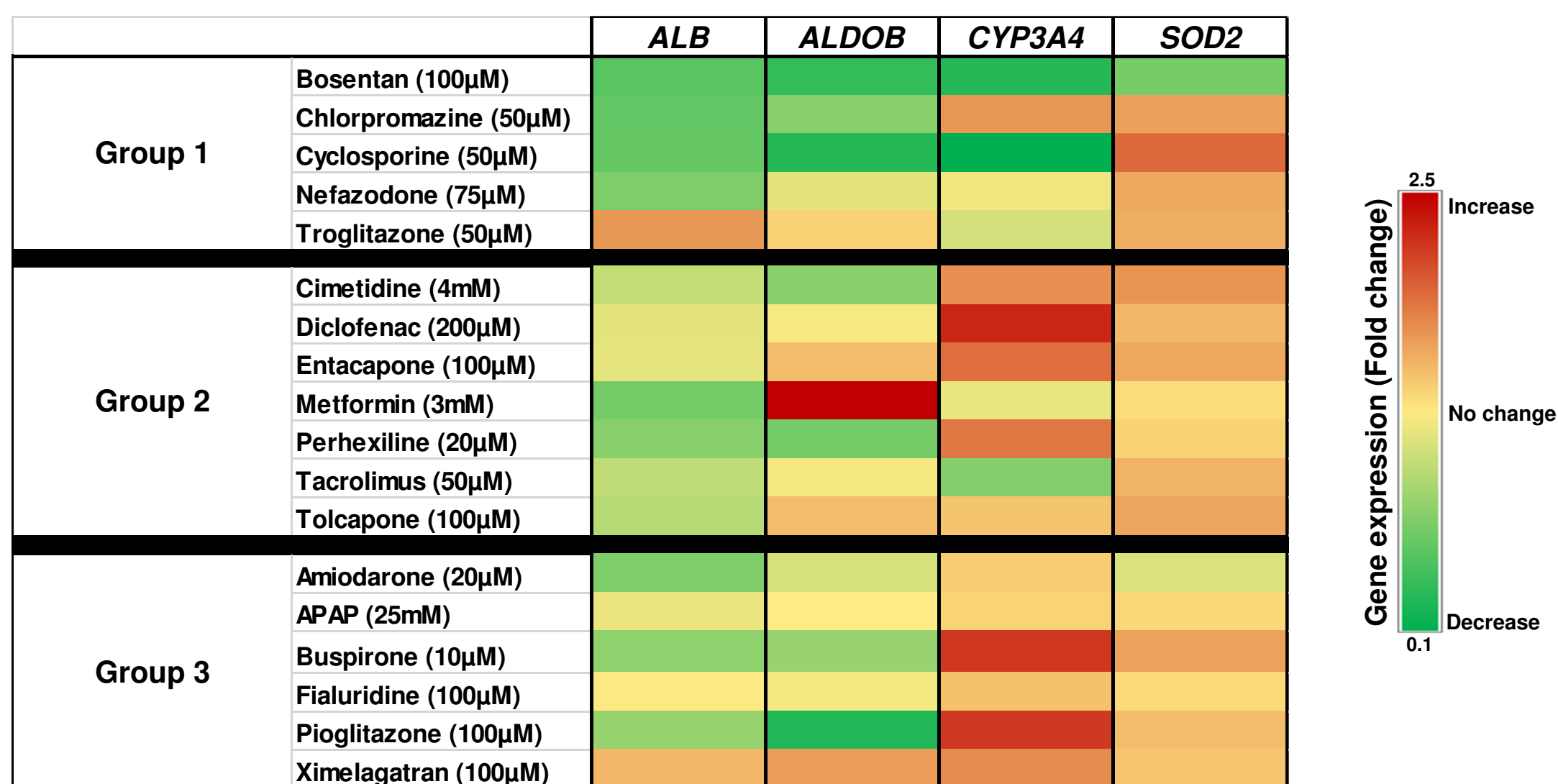
Supplemental figure. 6. Effects of the tested drugs on MRP3 transcript levels

HepaRG cells were exposed to the 3 groups of compounds at 3 different concentrations for 24h : group 1 (**A**), group 2 (**B**) and group 3 (**C**). mRNA levels of MRP3 were measured by RT-PCR analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells (ctrl), arbitrarily set at a value of 1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared with untreated cells.



Supplemental figure. 7. Effects of the tested drugs on MRP4 transcript levels

HepaRG cells were exposed to the 3 groups of compounds at 3 different concentrations for 24h : group 1 (A), group 2 (B) and group 3 (C). mRNA levels of MRP4 were measured by RT-PCR analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells (ctrl), arbitrarily set at a value of 1. * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001 compared with untreated cells.



Supplemental Table. 2. Heat map showing the effects of the tested drugs on transcript levels of non transporters genes

HepaRG cells were exposed to the 3 groups of compounds at 3 different concentrations for 24h : group 1, group 2 and group 3. mRNA levels of *ALB*, *ALDOB*, *CYP3A4*, *SOD2* were measured by RT-PCR analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells, arbitrarily set at a value of 1. two colors are used : Red when there is an increase in the fold change of gene expression and green when there is a decrease in the fold change of gene expression

Supplemental video 1. Constriction of BC in troglitazone-treated HepaRG cells

Constriction of BC and loss of their rhythmic dynamics in TRO-treated HepaRG cells. Images of 50 μ M TRO-treated cells were captured each 10 minutes during 24h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂).

Supplemental video 2. Dilatation of BC in entacapone-treated HepaRG cells

Dilatation of BC and loss of their rhythmic dynamics in ENT-treated HepaRG cells. Images of 100 μ M ENT-treated cells were captured each 10 minutes during 24h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂).

Supplemental video 3. BC rhythmic dynamics movements in acetaminophen-treated HepaRG cells

Rhythmic dynamics movements in APAP-treated HepaRG cells. Images of 25mM APAP-treated cells were captured each 10 minutes during 24h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂).

Chapitre 2

Etude du potentiel cholestatique et cytotoxique des antagonistes aux récepteurs à l'endothéline

Historiquement, le bosentan, un antagoniste aux récepteurs à l'endothéline, a été la première molécule étudiée par le laboratoire à présenter une dilatation des canalicules biliaires après un traitement aigu de quelques heures. Présentant un caractère novateur sur la dynamique des BC et étant reconnu comme une molécule cholestatique puissante, il a été largement étudié depuis quelques années pour ses propriétés inhibitrices de BSEP (Fattinger et al. 2001). Afin de mieux comprendre son mécanisme dans l'induction d'une cholestase, son étude a été élargie à l'ensemble de sa famille thérapeutique (ambrisentan, macitentan, sitaxentan). En effet, plusieurs antagonistes des récepteurs de l'endothéline ont été développés pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. Certains d'entre eux ont été rendus responsables de cas cliniques d'hépatotoxicité (sitaxentan) et/ou de cholestase (bosentan) et d'autres n'ont montré aucune toxicité chez l'homme (macitentan et ambrisentan). A partir de l'étude de la déformation des canalicules biliaires avec encore une fois l'implication de la voie MLCK dans la dilatation, nous avons tenté de comparer les différentes molécules. D'autres caractéristiques spécifiques à la cholestase ont également permis de comprendre le potentiel cholestatique *in vitro* de cette famille thérapeutique. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'accumulation intracellulaire d'acides biliaires individuels et totaux, puis à l'activité de transporteurs reflétant l'influx ou la clairance de ces acides biliaires. Enfin nous avons analysé la distribution de transporteurs basolatéraux et la modulation de l'expression des mRNA des principaux transporteurs hépatiques. Nos résultats ont montré que certains antagonistes des récepteurs de l'endothéline pouvaient être hépatotoxiques ou cholestatiques (et/ou cytotoxiques) par différents mécanismes et que le macitentan récemment commercialisé, structurellement similaire au bosentan, était capable de causer des altérations *in vitro* des canalicules biliaires, ce qui suggère un potentiel cholestatique qui pourrait se révéler dans certaines conditions cliniques et justifie donc une surveillance des fonctions hépatiques (mesure des transaminases et bilirubine).

Article 3

Differential cytotoxic and cholestatic potential of endothelin receptor antagonists in human HepaRG cells

M. Burbank, A. Sharanek, A. Burban, H. Mialanne, H. Aerts, C. Guguen-Guillouzo, R. J. Weaver, A. Guillouzo

Differential cytotoxic and cholestatic potential of endothelin receptor antagonists in human HepaRG cells

M. Burbank^{1,2,3}, A. Sharanek^{1,2}, A. Burban^{1,2}, H. Mialanne³, H. Aerts³, C. Guguen-Guillouzo^{1,2}, R. J. Weaver⁴, A. Guillouzo^{1,2}

¹Inserm UMR 991, Foie, métabolismes et cancer, Rennes, France; ²Université Rennes 1, Rennes, France; ³Biologie Servier, 45520, Gidy, France; ⁴Institut de Recherches internationales Servier, Suresnes, 92150, France.

Abstract

Several endothelin receptor antagonists (ERAs) have been developed for the treatment of pulmonary arterial hypertension. Some of them have been related to clinical cases of hepatocellular injury (sitaxentan) and/or cholestasis (bosentan). Recently, we showed that, like other cholestatic drugs, bosentan impaired *in vitro* bile canaliculi dynamics typified by loss of spontaneous contractions and occurrence of dilatations of bile canaliculi (BC) associated with deregulation of the ROCK/MLCK signaling pathway. We aimed to determine whether other ERAs, i.e. ambrisentan, macitentan and sitaxentan, could cause similar BC alterations, using differentiated HepaRG cells. Our results showed that like bosentan, macitentan induced cytotoxicity and cholestatic disorders typified by BC dilatation and impairment of ROCK/MLCK signaling. This drug also strongly inhibited taurocholic acid efflux after 2h, compared to a limited effect of bosentan and sitaxentan; however, macitentan had a much lower inhibitory effect than these two drugs on influx activity after either 2 or 24h. Moreover, these three drugs caused decreased intracellular accumulation and parallel increased levels in culture media of total bile acids. In addition, after 24h macitentan and bosentan down-regulated *BSEP* and together with sitaxentan, *NTCP* expression. Only bosentan down-regulated *OATP-B* and slightly *MRP3*. By contrast, sitaxentan was hepatotoxic without causing cholestatic damage, likely via the formation of reactive metabolites and ambrisentan appeared to be nonhepatotoxic. Together, our results show that some ERAs can be hepatotoxic and/or cholestatic and that the recently marketed macitentan, structurally similar to bosentan, can cause *in vitro* major BC alterations. The absence of *in vivo* reported hepatotoxicity could be at least partly explained by the use of much lower doses compared to bosentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension.

Abbreviations:

ABT, 1-Aminobenzotriazole; ALB, albumin; ALDOB, aldolase B; AMB, ambrisentan; BA, bile acid; BC, bile canaliculi; BOS, bosentan; BSEP, bile salt export pump; CA, cholic acid; CaM, calmodulin; CDCA, chenodeoxycholic acid; CYP3A4, cytochrome P450 3A4; DCA, deoxycholic acid; DILI, drug-induced liver injury; DMSO, dimethyl sulfoxide; ET_A, endothelin A receptor; ET_B, endothelin B receptor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GCA, glycocholic acid; GCDCA, glycochenodeoxycholic acid; GDCA, glycodeoxycholic acid; LCA, lithocholic acid; MAC, macitentan; MDR1, multidrug resistance 1; MLC, myosin-light-chain; MLC2, myosin light chain subunit-2; MLCK, myosin light chain kinase; MRP 2,3,4, multidrug resistance-associated protein 2,3,4; MTT, methylthiazolotetrazolium; NTCP, Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide; OATP-B, organic anion transporting polypeptide; PHH, primary human hepatocytes; ROCK, Rho-kinase; RT-qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; SCCH, sandwich-cultured hepatocytes; SIT, sitaxentan; SOD2, manganese superoxide dismutase ; T-AlphaMCA, tauro- α -muricholic acid ; TCA, taurocholic acid; [³H]-TCA, [³H]-taurocholic acid;

Acknowledgments

Financial Support: This work was supported by the European Community [Contract MIP-DILI-115336]. The MIP-DILI project has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking, resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Programme [FP7/20072013] and EFPIA companies' in kind contribution. <http://www.imi.europa.eu/>.

Matthew Burbank was financially supported ANRT [n°2013/0112], and Ahmad Sharaneq and Audrey Burban by the MIP-DILI project.

We are grateful to Remy Le Guevel from the ImPACcell platform for imaging analysis.

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare, progressive disorder characterized by hypertension in pulmonary arteries with an estimated prevalence of 15-50 cases per million annually (Peacock et al. 2007). The median survival for an untreated PAH patient with supportive care is 2.8 years after diagnosis (D'Alonzo et al. 1991). Although several classes of specific medications are available PAH remains relatively incurable and the overall prognosis remains guarded (Velayati et al. 2016). Since the pathogenesis of this disease is marked by enhanced synthesis of endothelin 1 (ET-1) and progressive proliferation and hypertrophy of smooth muscle cells in the pulmonary vasculature (Dupuis and Hoeper 2008), the endothelin receptor antagonists (ERAs) are thought to represent potent interesting therapeutics. ERAs have the capacity to inhibit the binding of endothelin, the most powerful vasoconstrictive peptide, to its receptors on smooth muscle cells which results in a vasodilation in order to decrease the pulmonary vascular pressure (Humbert, Sitbon, and Simonneau 2004). ERAs have been shown to improve exercise tolerance and slow progression of disease in PAH patients (McLaughlin, Davis, and Cornwell 2011). Two ERAs are currently approved in the USA under the name of bosentan (BOS) in 2001 and ambrisentan (AMB) in 2007. Another agent, sitaxentan (SIT), was approved in 2006 in Europe but not in the USA. Finally, a new ERA, macitentan (MAC), received approval in 2013. This ERAs family has been differently associated with liver injury. In 2010 SIT was removed from the market due to concerns about its liver toxicity (Galiè et al. 2011) and BOS was found to cause at least 3-fold upper limit of normal elevation of liver aminotransferases in about 11% of patients accompanied by elevated bilirubin in a small number of cases during clinical studies (Fattinger et al. 2001). By contrast, AMB did not appear to cause hepatotoxicity with long-term treatment (Ben-Yehuda et al. 2012); Although it is structurally similar to BOS, to date MAC has not been reported to cause elevation of liver transaminases or bilirubin. There is no data indicating that it has superior therapeutic potency to AMB (Sood 2014). The four ERAs differ on their level actions on the 2 different ET-1 receptors ET_A and ET_B which are G protein-coupled receptors whose activation results in elevation of intracellular free calcium (Davenport and Battistini 2002). While MAC and BOS are dual antagonists, AMB and SIT are selective of ET_A (Dupuis and Hoeper 2008). AMB is a propionic acid and the three others are sulfonamides. BOS as well as MAC and SIT are direct inhibitors of BSEP as shown

by using cells expressing human BSEP (Fattinger et al. 2001; Dawson et al. 2012; Lepist et al. 2014). By contrast, MAC and its active metabolite, ACT-132577 (Sidharta et al. 2011) were reported to have no significant inhibitory effects on bile salt transport *in vivo* (Raja 2010; Bolli et al. 2012). *In vitro* studies suggest that hepatic disposition of MAC is mainly driven by passive diffusion rather than OATP-mediated uptake (Bruderer et al. 2012). Mechanisms of ERAs hepatotoxicity remain poorly understood. Recently, we demonstrated that BOS and other cholestatic drugs cause alterations of bile canaliculi dynamics coupled with impairment of the ROCK/MLCK signaling pathway (Sharanek et al. 2016; Burbank et al. 2016). Interestingly, ERAs act by reducing myosin-actin interactions and myosin II contractile activity in smooth muscle and non-muscle cells is stimulated through phosphorylation of the myosin-light-chain (MLC) by both ROCK and Ca²⁺/calmodulin-dependent myosin light chain kinase (MLCK) (Miao, Dai, and Zhang 2002; Dupuis and Hoeper 2008).

In the present work, we aimed to analyze the mechanisms involved in cytotoxic and cholestatic effects induced by the 4 principal drugs from the ERA family using human HepaRG cells. Our results showed that BOS and MAC shared *in vitro* similar (comparable) cytotoxic and cholestatic properties while SIT was only cytotoxic and AMB was not hepatotoxic.

Materials and methods

Reagents

Macitentan (MAC) and sitaxentan (SIT) were purchased from Alsachim (St. Illkirch-Graffenstaden, France). Bosentan (BOS) was obtained from Sequoia Research Products (Pangbourne, U.K). Ambrisentan was a gift from MSN Laboratories (Sanath Nagar, India). 1-Aminobenzotriazole (ABT) and methylthiazoletetrazolium (MTT) were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). Calmodulin (CaM) was from Merck Chemicals (Fontenay sous Bois, France). Phalloidin fluoprobe was obtained from Interchim (Montluçon, France). [³H]-Taurocholic acid ([³H]-TCA) was from Perkin Elmer (Boston, MA). Specific antibodies against phospho-myosin light chain 2 (ser19) and HSC70 were provided by Cell Signaling Technology (Schuttersveld, The Netherlands). Anti-zona occludens protein 1 (ZO-1) antibody was obtained from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). Anti-MRP2 and anti-MRP3 antibodies were from Abcam (Cambridge, UK) and secondary antibodies from Invitrogen (Saint Aubin, France). Hoechst dye was from Promega (Madison, WI). Other chemicals were of the highest reagent grade.

Cell cultures and treatments

HepaRG cells were seeded at a density of 2.6×10^4 cells/cm² in Williams' E medium supplemented with 2mm glutaMAX, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin, 10% Hyclone bovine fetal calf serum, 5µg/ml insulin, and 50µM hydrocortisone hemisuccinate. At confluence, after 2 weeks, HepaRG cells were transferred to the same medium supplemented with 1.7% dimethyl sulfoxide (DMSO) for 2 additional weeks in order to obtain confluent differentiated cultures containing nearly equal proportions of hepatocyte-like and progenitors/primitive biliary-like cells (Cerec et al., 2007). These differentiated hepatic cell cultures were used for analytical assays. For drug treatments, differentiated HepaRG cells were incubated in a medium containing 2% serum and 1% DMSO. The list and characteristics of the 4 tested compounds are displayed in Table 1.

Cell viability

Cytotoxicity of the tested compounds was evaluated using the MTT colorimetric

assay. Briefly, cells were seeded in 24-well plates and exposed to various concentrations of each compound in triplicate for 24h. After medium removal, 100µl of serum-free medium containing MTT (0.5 mg/ml) was added to each well and incubated for 2 h at 37°C. The water-insoluble formazan was dissolved in 100µl DMSO and absorbance was measured at 550 nm (Aninat et al. 2006). IC20 values (the concentrations causing 20% cytotoxicity) were calculated from the concentration-responses curves. IC10 or IC20 values are widely used in toxicology studies (Pomponio et al. 2015; Liguori, et al. 2008).

Time-lapse cell imaging

Phase-contrast images of HepaRG cells were captured every 10 min, using time-lapse phase-contrast videomicroscopy. The inverted microscope Zeiss Axiovert 200M was equipped with a thermostatic chamber (37°C and 5% CO₂) to maintain the cells under normal culture conditions and an Axiocam MRm camera with a 10x objective.

Determination of bile canalicular lumen surfaces

Bile canalicular lumen surfaces appeared bright (white) and the hepatocytes/biliary cells denser (black) using a phase-contrast microscope Zeiss Axiovert 200M. Brightness parameters were adjusted to eliminate non corresponding objects and analysis was performed on at least 4 images per each condition (well). White canalicular lumen was then quantified using the image J software every 10min for 24h. Data obtained during the first 4h with all tested compounds are presented and BC quantification is expressed as percent of the control (Burbank et al. 2016).

MLCK activity

MLCK implication was estimated using calmodulin (CaM), a specific MLCK activator, at a 5µM final concentration either alone (control) or in co-treatment with the dilators (i.e. BOS and MAC). BC alteration was quantified after both drug treatment and drug/CaM co-treatment as described above.

Immunolabelling

Cells were washed with warm phosphate buffered saline (PBS), fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature and then washed three times with cold PBS. After paraformaldehyde fixation, cells were permeabilized for 20 minutes with 0.3% Triton in PBS followed by 1-hour incubation

in PBS containing 1% bovine serum albumin and 5% normal donkey serum. Cells were then incubated overnight with primary antibodies directed against ZO-1, MRP2 and MRP3, and washed with cold PBS before 2-hour incubation with mouse or rabbit Alexa fluor 488 labeled secondary antibodies in the same buffer as described above. Cells were washed with cold PBS and incubated with rhodamine-phalloidin fluoprobe SR101 (200 U/ml) diluted at 1/100 for F-actin labeling for 20min (Pernelle et al. 2011). After washing with cold PBS, cells were incubated with Hoechst in PBS for 20 min for nuclei labeling. Immunofluorescence images were detected by Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (Thermo Scientific, New Hampshire, U.S.A) (Bachour-EI Azzi *et al.*, 2015).

CDF excretion

After 2h of exposure to the drugs in serum-free medium, cells were incubated for 20 min at 37°C with 3 μ M CDFDA, which is hydrolyzed by intracellular esterases to CDF, a substrate of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). After washing, imaging was done using inverted microscope Zeiss Axiovert 200M and AxioCam MRm (Sharanek *et al.*, 2014).

Taurocholic acid clearance

To evaluate TCA clearance activity, cells were first exposed to 43.3nM [3 H]-TCA for 30min to induce its intracellular accumulation, then washed with standard buffer and incubated with the tested compounds for 2h in a standard buffer with Ca^{2+} and Mg^{2+} . After the incubation time, cells were washed and scraped in 0.5N NaOH and the remaining radiolabeled substrate was measured through scintillation counting to determine [3 H]-TCA clearance (Anthérieu *et al.* 2013). TCA influx was estimated by determination of sodium-dependent intracellular accumulation of the radiolabeled [3 H]-TCA substrate. Cells were treated with the 4 drugs for 2 or 24h followed by incubation with radiolabeled TCA for 30min. Then, they were washed with PBS and lysed with 0.1N NaOH. Accumulation of radiolabeled substrate was determined through scintillation counting (Anthérieu *et al.* 2013). [3 H]-TCA clearance was determined based on its accumulation in the cell layers (cells + BC) and calculated relative to the control using the following formula: [3 H]-TCA clearance = ($[^3H]$ -TCA accumulation in (cells + BC)_{Control} * 100) / ($[^3H]$ -TCA accumulation in cell layers)_{Tested compound} (Sharanek *et al.* 2016).

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis.

Total RNA was extracted from 10^6 HepaRG cells with the SV total RNA isolation

system (Promega, Charbonnieres-les-Bains, France). RNAs were reverse-transcribed into cDNA and RT-qPCR was performed using a SYBR Green mix. Primer pairs sequences are listed in supplemental Table 1.

Western blotting analysis of p-MLC2

HepaRG cells were treated with the tested compounds for 1, 2 and 3h at 100 μ M where BC alteration occurred, then washed with cold PBS and finally re-suspended in cell lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche, Mannheim, Germany). Aliquots containing equivalent total protein content, as determined by the Bradford procedure with bovine serum albumin as the standard, were subjected to sodium dodecyl sulfate/12% polyacrylamide gel electrophoresis, electrotransferred to immobilon-p membranes, and incubated overnight with primary antibodies directed against p-MLC2 and HSC70. After using a horseradish peroxidase conjugated anti-mouse/rabbit antibody (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA), membranes were incubated with a chemiluminescence reagent (Millipore, Billerica, MA) and bands were visualized and quantified by densitometry with fusion-CAPT software (Vilber Lourmat, Collégien, France).

Measurement of endogenous bile acid content

In order to avoid any bile acids (BA) contamination with the serum, all treatments and washings were done in serum-free media. Both dried cell pellets and 1 ml medium samples were collected for BA analysis from HepaRG cell cultures exposed to different drug concentrations at various time points. BA content was measured using Ultra high pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS). An Acquity UPLC BEH Waters column (Waters Corporation, Milford, MA.), thermostated at 65 °C, was used for chromatographic separation of BA. Mobile phases consisted of (A) (0.1% HCOOH in purified water) and (B) (0.05% triethylamine in acetonitrile) at 95:5 (v/v). BAs were eluted by increasing B/A ratio from 5 to 95 (v/v) for 14.5 min. Separation was achieved at a flow rate of 0.35 ml/min for 18 min. Mass spectra were obtained using an API4000 sciex (AB-Sciex, Framingham, MA). Data were acquired by Software Analyst (ABSCIEX) V 1.6.1; Software Masslynx (Waters) V 4.1 and Software Watson (Thermo-Fisher scientific) V 7.3.0.01. The amount of individual BAs in each medium sample was calculated as

pmol/ml (nM) and in cell lysate samples as pmol and scaled per mg of proteins. Since basal primitive biliary cells do not express BAs metabolizing enzymes as well as BA transporters (Sharanek et al., 2014) they were neglected for calculation of BA synthesis. Only HepaRG hepatocytes were considered and estimated to represent 50% of total cells in HepaRG cell cultures (Cerec et al. 2007). Total CA represented the sum of (unconjugated CA + TCA + GCA) whereas total CDCA represented the sum of (unconjugated CDCA + TCDCA +GCDCA).

Statistical analysis

One-way Anova with multiple comparison test (graphpad prism 6.00) was performed to compare time-dependent MLC2 phosphorylation in different samples. Data were considered significantly different when $*P < 0.05$. One-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test (GraphPad Prism 6.00) was performed to compare BAs data. Each value corresponded to the mean \pm standard error of mean (SEM) of at least three independent experiments. Data were considered significantly different when $*P < 0.05$. The student t test was also applied to compare values of cytotoxicity, TCA clearance and mRNA levels between treated and corresponding control cultures. Data were considered as significantly different when $*P < 0.05$. For the mRNA levels, data were also considered as significantly different with the 4h treatment when $#P < 0.05$. Each value corresponded to the mean \pm standard error (SEM) of three independent experiments.

Results

We first checked whether HepaRG cells expressed both sub-types A and B of endothelin receptors (ET_A and ET_B). mRNA expression was quantified and for comparison, in PHH, by PCR. Both transcripts were detected, with 10-fold higher levels of ET_B in both cell models (Supplemental Fig.1).

Cytotoxicity assay

Preliminary experiments were performed to calculate IC₂₀ values (the concentration causing 20% cytotoxicity) for the 4 drugs after a 24h treatment of HepaRG cells with a range of drug concentrations from 0 to 800µM using the MTT assay (Figure 1A). The most cytotoxic compound was BOS with an IC₂₀ value of 120µM followed by MAC (230 µM) and SIT (580µM). AMB was not cytotoxic in the range of tested concentrations. The IC₂₀ values and final selected concentrations of all tested compounds are displayed in Table 1B. In order to determine whether cytotoxicity was related to cytochrome P450-mediated formation of toxic metabolites a set of cultures was co-treated with ERAs and 300µM 1-aminobenzotriazole (ABT), a non-selective inhibitor for human P450s for 24h. Co-treatment with ABT markedly reduced SIT and BOS cytotoxicity at high concentration with greater effects with BOS (i.e. at 400µM and 800µM respectively) (Figure 1B) while it did modulate MAC effects.

Morphological examination of BC

We have previously shown that cholestatic drugs could cause constriction or dilatation of BC after a short treatment of HepaRG cells. In the present study, we analyzed effects of ERAs at a 100µM concentration on BC dynamics over at least a 12h period using time-lapse videomicroscopy imaging. Treatment with MAC and BOS caused dilatation of many BC, starting within the first hour whereas SIT and AMB were ineffective (Figure 2A) (Supplemental videos). Interestingly, even at 400µM, that corresponded to a cytotoxic concentration for both BOS and MAC, the two other ERAs, SIT and AMB, did not affect BC dynamics (Figure 2D). At 600µM (i.e. around IC₂₀ value), SIT caused some morphological alterations without any change in BC structures (Figure 2D). BC alterations caused by the tested compounds were quantified by measuring the canalicular surface using the image J software every 10min for 24h. BC dilatation was greater with MAC than with BOS (Figure 2B). Immunolocalization of the junctional zona occludens protein 1 (ZO-1) and

pericanalicular F-actin did not evidence any disruption of BC integrity associated with dilatation of the canalicular lumen after 2h or longer treatments (Figure 2C).

MLC2 and MLCK alterations with cholestatic drugs

It has been postulated that dynamic movements of BC could be controlled by pericanalicular myosin activity (Sharanek et al. 2016). Treatment with BOS and MAC, the two drugs that induce BC dilatation, showed a decrease with time in MLC2 phosphorylation while AMB and SIT were ineffective (Figure 3A, B). Since MLCK is coupled to ROCK and shares MLC2 as a common substrate, we evaluated whether MLCK also contributed to BC lumen alterations. MLCK implication in BC deformations was determined by the use of calmodulin (CaM), a specific MLCK activator. HepaRG cells were treated with CaM in the presence of dilators (Sharanek et al. 2016; Burbank et al. 2016) and BC alterations were quantified and compared to treatment with the modulator alone as described above. Co-treatment with CaM (5 μ M) partly counteracted dilatation induced by BOS and MAC. (Figure 3C, D).

Bile acids profiles

BA profiles were analyzed after treatment of HepaRG cells with 10, 50 and 100 μ M of each drug for 4 or 24h in serum-free medium. Overall, GCDCA, GDCA, TCA, CA, TCDCA, DCA and TDCA were detected in cellular layers and GCA, GCDCA, GDCA, TCA, TCDCA, TDCA and DCA in supernatants. Interestingly, a dose-dependent intracellular decrease and parallel accumulation in supernatants of total BAs were observed with MAC, BOS and SIT at both time points (Figure 4). By contrast, AMB did not cause any effect. At 100 μ M MAC showed a decrease in BA intracellular accumulation dropping from 15.7 (control value) to 5 and 2 pmol/mg proteins respectively while BA content increased in the supernatant from 25 to 64 nM and 34 to 78 nM after 4 and 24h treatment, respectively (Figure 4C). BOS exhibited approximately the same pattern, i.e. a decrease from 22 to 6 pmol/mg proteins in cellular layers and from 24 to 3 pmol/mg proteins after 4 and 24h respectively. In the supernatants, values oscillated between 31 and 46 nM at 4h and 51 to 67 nM at 24h (Figure 4B). At 100 μ M SIT showed a more important decrease in total BAs in cellular layers ranging from 15 (control value) to 4 pmol/mg proteins and 15 to 2 pmol/mg proteins after 4 and 24h, respectively. Concomitantly, BAs concentrations in the

supernatant increased from 39 to 69 nM and 54 to 78 nM at 4 and 24h of treatment with this drug (Figure 4D). Finally, AMB had no effect on BAs intracellular accumulation (around 19 pmol/mg proteins) and supernatant levels (between 33 and 70 nM) at all tested concentrations and at the two treatment time points (Figure 4A). When changes were estimated as percentages in comparison with controls, 100 μ M MAC caused an intracellular accumulation of BAs (32% at 4h and 15% at 24h), followed by 100 μ M BOS (25% at 4h and 15% at 24h) and 100 μ M SIT (23% at 4h and 11% at 24h) (Table 2). CA and CDCA represented approximately 16 and 75% of total BAs in untreated HepaRG cell layers after 24h whereas tauro- and glyco-conjugates represented approximately 90 and 10% respectively. Secondary BAs did not exceed 5% of total BAs at 24h (data not shown). CA did not show significant decrease in cellular layers at 4h while a decrease was observed with BOS (50 μ M and 100 μ M) and MAC (100 μ M), dropping to 26.2%, 16.1% and 36.0% respectively at 24h. Due to their very low concentration BA fold changes in supernatants were too variable to estimate any treatment effect. After 4h treatment, CDCA content in cell layers dropped to 23.1% with BOS (100 μ M), 22.5% with MAC (100 μ M) and 16.7% with SIT (100 μ M) with a parallel increase in supernatants. At 24h the decrease in cellular layers was even more pronounced, dropping to 12.1, 5.4 and 26.6% with MAC, SIT and BOS, respectively (Table 2). After 4h, total primary BAs dropped to 38.8, 36.1 and 28.1% with 100 μ M BOS, MAC and SIT, respectively; these values were divided by 2 at 24h (Table 3). Secondary BAs were barely detectable with values just over the limit of detection (data not shown). Finally, a 4h treatment with 100 μ M AMB, BOS, MAC and SIT reduced tauro-conjugates content to 87.0%, 29.5%, 27.1% and 30.3% respectively of control values and to around 50% with the four drugs after 24h. Glyco-conjugates were barely detectable at both time-points (Table 3).

Taurocholic acid influx and canalicular efflux

To confirm whether ERA-induced BC deformations were associated with alterations of BA transport, influx and efflux activities were measured using [3 H]-TCA as a substrate. As shown in Figure 5A, C and D, AMB had no significant effect on either influx or efflux activities. MAC and BOS inhibited TCA efflux, starting at 10 μ M for MAC and 50 μ M for BOS whereas SIT activated efflux activity at low concentration (10 μ M) and was ineffective at 50 μ M and higher

concentrations (Figure 5A). To confirm its greater activity at 10 μ M, SIT was also tested at 1, 5 and 20 μ M. Intermediate increased values were obtained confirming the concentration-dependent induction of TCA efflux by SIT, peaking at around 20 μ M (Figure 5B). TCA influx was inhibited by BOS and SIT; activity started to decrease with both drugs at 10 μ M after 2h treatment (Figure 5C). After 24h SIT and BOS still exerted an inhibitory effect starting at 10 and 50 μ M, respectively. MAC and AMB did not influence TCA influx. (Figure 5D). To determine whether inhibition of BC dilatation by CaM was associated with alteration of TCA efflux and/or influx, HepaRG cells were treated with the 4 drugs in the presence or absence of 5 μ M CaM. As shown in Figure 5E and F, only BOS significantly increased TCA clearance (3-fold) after 2h treatment. MAC and the two other drugs were ineffective.

MRP3 and MRP2 immunolabeling

After 2h treatment, distribution of MRP3 protein was analyzed using immunolabeling as shown in Figure 6. Compared to untreated cells, immunostaining intensity of MRP3 to the basolateral membrane of HepaRG cells was increased with the four ERAs, being much higher with MAC, SIT and BOS than with AMB. Distribution of MRP2 protein was also analyzed after 2h treatment with the 4 drugs using a specific antibody. Compared to untreated cells, immunostaining of MRP2 to the apical membrane of HepaRG cells was decreased with BOS, MAC and SIT.

CDF distribution

Fluorescent CDF, mainly excreted by MRP2, was also visualized in BC of untreated and treated HepaRG cells. While AMB did not show any significant effect compared to control cells SIT exerted a strong inhibition that was also observed with MAC and BOS although to a lower extent (Figure 6).

Modulation of BA transporters expression

Genes encoding the major BA transporters are also deregulated by cholestatic drugs (Pauli-Magnus and Meier 2006). Six major genes encoding either efflux (*BSEP*, *MRP2*, *MRP3*, *MRP4*) or uptake (*NTCP*, *OATP-B*) transporters were analyzed by RT-qPCR after 4, 8 or 24h treatment with 3 concentrations of each

tested drug (i.e. 10, 50 and 100 μ M). Different patterns depending on the compound and the tested concentration were evidenced and are shown in Figures 7, 8 and 9 and supplemental Table 2. AMB did not deregulate any of the transporters at the 3 concentrations used whatever the duration of treatment (4, 8 and 24h). By contrast, variable effects were observed with the 3 other drugs. *BSEP* was strongly repressed by BOS starting at 8h and by MAC only at high concentrations after 24h (Figure 7A). *NTCP* was downregulated starting at 24h for the two high concentrations (i.e. 50 and 100 μ M) of BOS, MAC and SIT. *MRP2* was upregulated with MAC and SIT at the two highest concentrations (Figure 7B). *OATP-B* and *MRP3* were decreased only with BOS starting after 8h at the highest concentrations (Figure 8B and 9A) and *MRP4* was not modulated by any of the drugs (Figure 9B).

Discussion

To-date, four ERAs have been developed for the treatment of advanced pulmonary arterial hypertension (Ghofrani et al. 2011). While SIT has been withdrawn from the market for hepatotoxicity, two other compounds, AMB and BOS, are currently in use. The last one, MAC has been recently put on the market, being considered as safe on the basis of preclinical and clinical studies. In the current work, we showed using human HepaRG cells that, although up-to now MAC has not been found to be responsible of cases of hepatocellular injury and/or cholestasis, it shared major cholestatic features with BOS and that SIT exhibited only cytotoxic effects.

SIT as well as BOS in addition to its cholestatic properties, can induce hepatocellular injury in treated patients (Fattinger et al. 2001; Lavelle et al. 2009; Galiè et al. 2011). SIT has been found to induce hypertrophy and necrosis of centrilobular hepatocytes in dogs (Lin et al. 2012), and to cause severe liver injury with 8 deaths during clinical trials (Owen et al. 2012). SIT undergoes several enzymatic reactions with the involvement of various CYPs, including CYP2C9 and CYP3A4, that lead to a reactive ortho-quinone metabolite which is able to form adducts with glutathione (Erve et al. 2013). Our data agree with the implication of reactive metabolites in the induction of hepatocellular injury. Indeed when CYP activities were inhibited by addition of the non-specific CYP inhibitor ABT, toxicity was reduced. Importantly, SIT was approved for a daily 100mg and 300mg/day has been used in clinical studies, and it is admitted that idiosyncratic hepatotoxicity is more frequent with drugs administered at > 50mg/ day (de Abajo et al. 2004).

In the 5-year EARLY study of PAH patients 16.8 % treated with BOS showed elevations of transaminases superior to 3-fold the upper limit of normal, mostly within the first 6 months of treatment (Simonneau et al. 2014). BOS is metabolized into 4 metabolites and some of them have been found to cause toxicity in primary human hepatocytes. Addition of ABT, a CYP 450 inhibitor, reduced its toxicity (Matsunaga et al. 2016). Our data with HepaRG cells treated with ABT fully agrees with this study concluding that at least one BOS CYP-mediated metabolite is potentially hepatotoxic.

By contrast, AMB and MAC are not known as inducing hepatocellular injury *in vivo*. In agreement with clinical data (Barst 2007; Takatsuki et al. 2013), AMB was

not toxic to HepaRG cells. It is mainly metabolized by UGTs; only 20% undergoes oxidative metabolism via CYP3A4 and to a lesser extent CYP3A5 and CYP2C19 (Croxtall and Keam 2008). Noteworthy, AMB is used at 5mg/day, a very low concentration in comparison with other ERAs (Takatsuki et al. 2013; Chaumais et al. 2015). By contrast MAC was toxic to HepaRG cells. If it is mainly metabolized by CYP3A4 and to a small extent by CYP2C8, 2C9 and 2C19 (Chaumais et al. 2015) it well established that at a clinical relevant concentration, it does not affect drugs that are substrates of CYP3A4 (Sidharta, Krähenbühl, and Dingemans 2015). Noticeably, if liver transaminases showed no higher incidence in MAC-treated patients versus placebo, when present they tended to be greater in the former. MAC toxicity was not reduced by a co-treatment with ABT in HepaRG cells.

Importantly, MAC and BOS caused deformation of BC and impairment of MLC2 phosphorylation that have previously been found to be characteristics of cholestatic drugs (Sharanek et al. 2016; Burbank et al. 2016) (Table 4). Contrary to the two other ERAs, AMB and SIT, which exhibit different chemical structures and are specific for ET_A receptors, MAC and BOS share a similar chemical structure and reactivity with both ET_A and ET_B receptors. Indeed, MAC and BOS structures differ only by addition of a smaller alkyl-sulfamide group to the former (Chaumais et al. 2015).

MAC showed greater effects on BC dilatation and efflux inhibition in comparison with BOS. Moreover, a co-treatment of MAC with CaM showed slightly less effects on BC dynamics than a co-treatment between BOS and CaM. However, TCA efflux with MAC and CaM co-treatment was not modified in comparison with MAC alone whereas co-treatment between BOS and CaM exhibited a sharp increase compared to BOS alone. The lower effect of CaM on BC dilatation and TCA efflux induced by MAC could be explained by the fact that at the concentration used, MAC exhibited a much higher effect on hepatic dysfunction that consequently, was more difficult to counteract.

ET_B receptors are predominant in the liver and their antagonism could contribute to the hepatotoxicity observed with the nonselective ERAs (Davenport, O'Reilly, and Kuc 1995; Ling et al. 2012). While ET receptors are detectable on all cell

types in rat liver, they are far more numerous on hepatic stellate cells than on other hepatic cells such as sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells, and hepatocytes (Housset, Rockey, and Bissell 1993; Stephenson et al. 1995). ET_B is usually classified into two subtypes, termed ET_{B1} and ET_{B2} , which most likely result from alternative splicing, (Frommer and Müller-Ladner 2008). Noticeably, infusion of ET_B agonists elicits an hypertensive response in most species (Highsmith 2013). Studies have also shown that ET_{B2} receptors located on smooth muscle cells mediated their constriction (McCulloch, Docherty, and MacLean 1998; Jones et al. 1999). It has been speculated that a dynamic relationship exists between ET_A and ET_{B2} receptor-mediated constriction; ET_1 -induced ET_{B2} receptor-mediated constriction of the basilar artery is dependent on activation of the ET_{B1} receptor and that in its absence, constriction completely reverts to an ET_A receptor mediated effect (Zuccarello, Boccaletti, and Rapoport 1999). Although *in vitro* data on ET_A versus ET_B potency suggest a higher affinity of MAC for ET_A , these tests were performed in the presence of plasma proteins (Iglarz et al. 2008), suggesting that dilatation was induced by an ET_B antagonism with BOS and MAC.

Intrahepatic cholestasis is characterized by an inhibition of biliary efflux of BAs leading to their accumulation mostly in hepatocytes. No BA accumulation was observed with either of the 4 drugs; on the contrary a decrease in total BAs content was evidenced in cellular layers after 4 and 24h treatment. Interestingly, it was previously found that CsA caused accumulation of endogenous secondary BAs in HepaRG cells after a 4h treatment (Sharanek et al. 2015). However, no similar BAs accumulation in the cell layers was obtained with BOS which is also a potent BSEP inhibitor (Fattinger et al. 2001; Morgan et al. 2010) after 4 or 24h treatment. Moreover, MAC which had the more important inhibitory effect on TCA efflux activity did not direct BAs accumulation. A similar observation has been made by using sandwich-cultured human hepatocytes treated with the 4 drugs (Lepist et al. 2014). Both BOS and MAC inhibited TCA efflux and NTCP activities; IC_{50} values of TCA efflux and NTCP inhibition being around 4-fold higher with MAC than with BOS. However, such inhibitions are not specific of cholestatic drugs (Pedersen et al. 2013; Köck et al. 2014). In agreement, as confirmed in the present study, SIT also inhibits TCA efflux and NTCP activities (Lepist et al. 2014).

TCA efflux inhibition could have been expected to lead to BAs accumulation in cellular layers but a dose-dependent decrease was observed after 4h treatment. MRP3 is well expressed on canalicular membranes in HepaRG cells (Bachour-EI Azzi et al. 2015) and (Qiu et al. 2016) have shown that in HepaRG cells KO in BSEP, MRP3 expression was upregulated. In the current study, after a 2h treatment, MRP3 was overexpressed with BOS, MAC and SIT in comparison with AMB and controls. MRP3 has been reported to be upregulated as a result of an adaptive mechanism to the inhibition of MRP2 and TCA efflux (Donner and Keppler 2001; Qiu et al. 2016). Interestingly, TCA influx was inhibited by both SIT and BOS after 2 or 24h treatments, likely representing a compensatory mechanism to avoid accumulation of cytotoxic BAs (Halilbasic, Claudel, and Trauner 2013). MAC had no effect on TCA influx but it was also the drug with the lower effect on BAs accumulation after AMB.

Immunolocalization of MRP2 was also altered by BOS, MAC and AMB after 2h. Another interesting observation was the 2.5 fold activation of TCA efflux after 2h with a low concentration of SIT (i.e. 10 μ M) which has already been described for troglitazone, entacapone or diclofenac (Al-Attrache et al. 2016; Burbank et al. 2016). In agreement, CDF accumulation which reflects MRP2 activity was also inhibited. Noticeably, an uncoupling effect between lipids and bile salt independent efflux at the MRP2 level has been reported in BOS-treated rats (Fouassier et al. 2002). Whether a similar effect can occur in treated patients and in cultured human hepatocytes remained presently unknown.

Only BOS has been reported to cause some cases of cholestasis in clinic. Several explanations can be advanced to support the absence of reported clinical cases of cholestasis with MAC: in particular the approval of this drug received only in 2013 and consequently the too small number of patients treated to-date and more likely the different physico-chemical properties, pharmacokinetics and metabolism profiles and conditions of administration to patients. BOS is mainly metabolized by CYP3A4 and 2C9 (Dingemans and van Giersbergen 2004) and is a strong PXR activator, (Weiss et al. 2013). It is dosed at 62.5mg twice a day for 4 weeks before using a dose of 125mg/day. MAC is active at 10mg/day (Pulido et al. 2013); it is a 2-fold more potent ERA than BOS and has a marked lower C_{max} in comparison with BOS. Noticeably, cholestatic features were obtained *in vitro* with BOS and

MAC at the same concentration (100 μ M). Experiments conducted at lower concentrations (i.e. 10 or 100 times less than the C_{max}) showed that MAC had no effect on BC deformation. MAC has a pK_a value of 6.2 compared with values of 5.1 for BOS and may have a greater affinity for the lipid phase compared with other ERAs (Iglarz et al. 2008). It also displays a 15-fold increased receptor residence time ($t_{1/2}$) compared to BOS (Gatfield et al. 2012).

In addition, importantly, ERAs are combined to phosphodiesterase 5 inhibitors for the treatment of PAH (Ghofrani et al. 2011). Clinical relevant drug-drug interactions have been described with some of these combinations (Venitz et al. 2012). Consequently, different interactions between BOS or MAC and other drugs could be expected. However, at a clinical relevant concentration, MAC was not found to affect drugs that are substrates of CYP3A4 (Sidharta, Krähenbühl, and Dingemans 2015).

Among the combination of drugs the association of BOS and the direct ROCK inhibitor fasudil has been evoked. Indeed, fasudil has been successfully used to reverse PAH findings in animal models (Liu et al. 2011). However, no improvement of exercise capacity and pulmonary hemodynamics was evidenced after a 3-month treatment of PAH patients with fasudil (Fukumoto et al. 2013). Moreover, our *in vitro* data showed that BOS-induced BC dilatation was strongly enhanced by co-addition of fasudil in HepaRG cells, suggesting that the combination of the two drugs could result in enhanced cholestatic effects (Supplemental fig. 2).

In summary, our data demonstrate that the two ERAs, BOS and MAC, share some typical cholestatic features which could be attributed to their similar chemical structures. However, these two drugs differ by several properties, in particular daily therapeutic dosages that could explain the absence of MAC toxicity presently reported *in vivo*. In addition, our results support a relationship between SIT and BOS hepatotoxicity and the formation of CYP-mediated reactive metabolites. They also support the current recommendation to monitor liver enzymes at the initiation of MAC treatment and then in the presence of clinical findings, and to discontinue therapy if patients develop sustained aminotransferase and bilirubin elevations, elevations (Monaco and Davila 2016) and further, the suitability of HepaRG cells

as an *in vitro* cell model for the prediction drug-induced cholestasis and hepatotoxicity.

References

- Al-Attrache, Houssein, Ahmad Sharaneq, Audrey Burban, Matthew Burbank, Thomas Gicquel, Ziad Abdel-Razzak, Christiane Guguen-Guillouzo, Isabelle Morel, and André Guillouzo. 2016. "Differential Sensitivity of Metabolically Competent and Non-Competent HepaRG Cells to Apoptosis Induced by Diclofenac Combined or Not with TNF- α ." *Toxicology Letters*. Accessed June 21.
- Aninat, Caroline, Amélie Piton, Denise Glaise, Typhen Le Charpentier, Sophie Langouët, Fabrice Morel, Christiane Guguen-Guillouzo, and André Guillouzo. 2006. "Expression of Cytochromes P450, Conjugating Enzymes and Nuclear Receptors in Human Hepatoma HepaRG Cells." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 34 (1): 75–83.
- Anthérieu, Sébastien, Pamela Bachour-El Azzi, Julie Dumont, Ziad Abdel-Razzak, Christiane Guguen-Guillouzo, Bernard Fromenty, Marie-Anne Robin, and André Guillouzo. 2013. "Oxidative Stress Plays a Major Role in Chlorpromazine-Induced Cholestasis in Human HepaRG Cells." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57 (4): 1518–29.
- Bachour-El Azzi, Pamela, Ahmad Sharaneq, Audrey Burban, Ruoya Li, Rémy Le Guével, Ziad Abdel-Razzak, Bruno Stieger, Christiane Guguen-Guillouzo, and André Guillouzo. 2015. "Comparative Localization and Functional Activity of the Main Hepatobiliary Transporters in HepaRG Cells and Primary Human Hepatocytes." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 145 (1): 157–68.
- Barst, Robyn J. 2007. "A Review of Pulmonary Arterial Hypertension: Role of Ambrisentan." *Vascular Health and Risk Management* 3 (1): 11–22.
- Ben-Yehuda, Ori, David Pizzuti, Andrea Brown, Marcus Littman, Hunter Gillies, Noreen Henig, and Tobias Peschel. 2012. "Long-Term Hepatic Safety of Ambrisentan in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension." *Journal of the American College of Cardiology* 60 (1): 80–81.
- Bolli, Martin H., Christoph Boss, Christoph Binkert, Stephan Buchmann, Daniel Bur, Patrick Hess, Marc Iglarz, et al. 2012. "The Discovery of N-[5-(4-Bromophenyl)-6-[2-[(5-Bromo-2-Pyrimidinyl)oxy]ethoxy]-4-Pyrimidinyl]-N'-Propylsulfamide (Macitentan), an Orally Active, Potent Dual Endothelin Receptor Antagonist." *Journal of Medicinal Chemistry* 55 (17): 7849–61.
- Bruderer, Shirin, Gérard Hopfgartner, Michael Seiberling, Janine Wank, Patricia N. Sidharta, Alexander Treiber, and Jasper Dingemans. 2012. "Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Macitentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist, in Humans." *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems* 42 (9): 901–10.
- Burbank, Matthew G., Audrey Burban, Ahmad Sharaneq, Richard J. Weaver, Christiane Guguen-Guillouzo, and André Guillouzo. 2016. "Early Alterations of Bile Canaliculi Dynamics and the ROCK/MLCK Pathway Are Characteristics of Drug-Induced Intrahepatic Cholestasis." *Drug Metabolism and Disposition*, August, dmd.116.071373.
- Cerec, Virginie, Denise Glaise, Delphine Garnier, Serban Morosan, Bruno Turlin, Bernard Drenou, Philippe Gripon, Dina Kremsdorf, Christiane Guguen-Guillouzo, and Anne Corlu. 2007. "Transdifferentiation of Hepatocyte-like Cells from the Human Hepatoma HepaRG Cell Line through Bipotent Progenitor." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 45 (4): 957–67.
- Chaumais, Marie-Camille, Christophe Guignabert, Laurent Savale, Xavier Jaïs, Athénaïs Boucly, David Montani, Gérald Simonneau, Marc Humbert, and Olivier Sitbon. 2015. "Clinical Pharmacology of Endothelin Receptor Antagonists Used in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension." *American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions* 15 (1): 13–26.
- Croxtall, Jamie D., and Susan J. Keam. 2008. "Ambrisentan." *Drugs* 68 (15): 2195–2204.
- D'Alonzo, G. E., R. J. Barst, S. M. Ayres, E. H. Bergofsky, B. H. Brundage, K. M. Detre, A. P. Fishman, R. M. Goldring, B. M. Groves, and J. T. Kernis. 1991. "Survival in Patients with Primary Pulmonary Hypertension. Results from a National Prospective Registry." *Annals of Internal Medicine* 115 (5): 343–49.

- Davenport, Anthony P., and Bruno Battistini. 2002. "Classification of Endothelin Receptors and Antagonists in Clinical Development." *Clinical Science (London, England: 1979)* 103 Suppl 48 (August): 1S – 3S.
- Davenport, Anthony P., Gillian O'Reilly, and Rhoda E. Kuc. 1995. "Endothelin ETA and ETB mRNA and Receptors Expressed by Smooth Muscle in the Human Vasculature: Majority of the ETA Sub-Type." *British Journal of Pharmacology* 114 (6): 1110–16.
- Dawson, Sarah, Simone Stahl, Nikki Paul, Jane Barber, and J. Gerald Kenna. 2012. "In Vitro Inhibition of the Bile Salt Export Pump Correlates with Risk of Cholestatic Drug-Induced Liver Injury in Humans." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 40 (1): 130–38.
- de Abajo, Francisco J., Dolores Montero, Mariano Madurga, and Luis A. García Rodríguez. 2004. "Acute and Clinically Relevant Drug-Induced Liver Injury: A Population Based Case-Control Study." *British Journal of Clinical Pharmacology* 58 (1): 71–80.
- Dingemans, Jasper, and Paul L. M. van Giersbergen. 2004. "Clinical Pharmacology of Bosentan, a Dual Endothelin Receptor Antagonist." *Clinical Pharmacokinetics* 43 (15): 1089–1115.
- Donner, M. G., and D. Keppler. 2001. "Up-Regulation of Basolateral Multidrug Resistance Protein 3 (Mrp3) in Cholestatic Rat Liver." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 34 (2): 351–59.
- Dupuis, J., and M. M. Hoeper. 2008. "Endothelin Receptor Antagonists in Pulmonary Arterial Hypertension." *The European Respiratory Journal* 31 (2): 407–15.
- Erve, John C. L., Shawn Gauby, John W. Maynard, Mats A. Svensson, George Tonn, and Kevin P. Quinn. 2013. "Bioactivation of Sitaxentan in Liver Microsomes, Hepatocytes, and Expressed Human P450s with Characterization of the Glutathione Conjugate by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry." *Chemical Research in Toxicology* 26 (6): 926–36.
- Fattinger, K., C. Funk, M. Pantze, C. Weber, J. Reichen, B. Stieger, and P. J. Meier. 2001. "The Endothelin Antagonist Bosentan Inhibits the Canalicular Bile Salt Export Pump: A Potential Mechanism for Hepatic Adverse Reactions." *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 69 (4): 223–31.
- Fouassier, Laura, Nils Kinnman, Guillaume Lefèvre, Elisabeth Lasnier, Colette Rey, Raoul Poupon, Ronald P. J. Oude Elferink, and Chantal Housset. 2002. "Contribution of mrp2 in Alterations of Canalicular Bile Formation by the Endothelin Antagonist Bosentan." *Journal of Hepatology* 37 (2): 184–91.
- Frommer, K. W., and U. Müller-Ladner. 2008. "Expression and Function of ETA and ETB Receptors in SSC." *Rheumatology* 47 (suppl 5): v27–28.
- Fukumoto, Yoshihiro, Norikazu Yamada, Hiromi Matsubara, Minori Mizoguchi, Kazuaki Uchino, Atsushi Yao, Yasuki Kihara, et al. 2013. "Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial with a Rho-Kinase Inhibitor in Pulmonary Arterial Hypertension." *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* 77 (10): 2619–25.
- Galiè, N., M. M. Hoeper, J. S. R. Gibbs, and G. Simonneau. 2011. "Liver Toxicity of Sitaxentan in Pulmonary Arterial Hypertension." *European Respiratory Journal* 37 (2): 475–76.
- Gatfield, John, Celia Mueller Grandjean, Thomas Sasse, Martine Clozel, and Oliver Nayler. 2012. "Slow Receptor Dissociation Kinetics Differentiate Macitentan from Other Endothelin Receptor Antagonists in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells." *PLOS ONE* 7 (10): e47662.
- Ghofrani, H. Ardeschir, Oliver Distler, Felix Gerhardt, Matthias Gorenflo, Ekkehard Grünig, Walter E. Haefeli, Matthias Held, et al. 2011. "Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension (PAH): Updated Recommendations of the Cologne Consensus Conference 2011." *International Journal of Cardiology* 154 Suppl 1 (December): S20–33.
- Halilbasic, Emina, Thierry Claudel, and Michael Trauner. 2013. "Bile Acid Transporters and Regulatory Nuclear Receptors in the Liver and beyond." *Journal of Hepatology* 58 (1): 155–68.
- Highsmith, Robert F. 2013. *Endothelin: Molecular Biology, Physiology, and Pathology*. Springer Science & Business Media.
- Housset, C, D C Rockey, and D M Bissell. 1993. "Endothelin Receptors in Rat Liver: Lipocytes as a Contractile Target for Endothelin 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (20): 9266–70.

- Humbert, Marc, Olivier Sitbon, and Gérald Simonneau. 2004. "Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension." *The New England Journal of Medicine* 351 (14): 1425–36.
- Iglarz, Marc, Christoph Binkert, Keith Morrison, Walter Fischli, John Gatfield, Alexander Treiber, Thomas Weller, et al. 2008. "Pharmacology of Macitentan, an Orally Active Tissue-Targeting Dual Endothelin Receptor Antagonist." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327 (3): 736–45.
- Jones, Richard D, Janet C Wanstall, Agatha Gambino, and Alyn H Morice. 1999. "The Effect of the Endothelin ETA Receptor Antagonist CI-1020 on Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction." *European Journal of Pharmacology* 374 (3): 367–75.
- Köck, Kathleen, Brian C. Ferslew, Ida Netterberg, Kyunghee Yang, Thomas J. Urban, Peter W. Swaan, Paul W. Stewart, and Kim L. R. Brouwer. 2014. "Risk Factors for Development of Cholestatic Drug-Induced Liver Injury: Inhibition of Hepatic Basolateral Bile Acid Transporters Multidrug Resistance-Associated Proteins 3 and 4." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 42 (4): 665–74.
- Lavelle, A., R. Sugrue, G. Lawler, N. Mulligan, B. Kelleher, D. M. Murphy, and S. P. Gaine. 2009. "Sitaxentan-Induced Hepatic Failure in Two Patients with Pulmonary Arterial Hypertension." *European Respiratory Journal* 34 (3): 770–71.
- Lepist, Eve-Irene, Hunter Gillies, William Smith, Jia Hao, Cassandra Hubert, Robert L. St Claire III, Kenneth R. Brouwer, and Adrian S. Ray. 2014. "Evaluation of the Endothelin Receptor Antagonists Ambrisentan, Bosentan, Macitentan, and Sitaxentan as Hepatobiliary Transporter Inhibitors and Substrates in Sandwich-Cultured Human Hepatocytes." *PloS One* 9 (1): e87548.
- Liguori, Michael J., Eric A. G. Blomme, and Jeffrey F. Waring. 2008. "Trovaflaxacin-Induced Gene Expression Changes in Liver-Derived in Vitro Systems: Comparison of Primary Human Hepatocytes to HepG2 Cells." *Drug Metabolism and Disposition* 36 (2): 223–33.
- Ling, Lowell, Rhoda E. Kuc, Janet J. Maguire, Neil J. Davie, David J. Webb, Paul Gibbs, Graeme J. M. Alexander, and Anthony P. Davenport. 2012. "Comparison of Endothelin Receptors in Normal versus Cirrhotic Human Liver and in the Liver from Endothelial Cell-Specific ETB Knockout Mice." *Life Sciences, Endothelin XII - Proceedings of the Twelfth International Conference on Endothelin*, Clare College, University of Cambridge, United Kingdom, September 11-14, 2011, 91 (13–14): 716–22.
- Lin, Yeong-Liang, Ya-Chi Wu, Churn-Shiouh Gau, and Min-Shung Lin. 2012. "Value of Preapproval Safety Data in Predicting Postapproval Hepatic Safety and Assessing the Legitimacy of Class Warning." *Therapeutic Advances in Drug Safety* 3 (1): 13–24.
- Liu, Ai-Jun, Feng Ling, Dong Wang, Qiang Wang, Xiao-Dong Lü, and Ying-Long Liu. 2011. "Fasudil Inhibits Platelet-Derived Growth Factor-Induced Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation by up-Regulation of p27kip¹ via the ERK Signal Pathway." *Chinese Medical Journal* 124 (19): 3098–3104.
- Matsunaga, Norikazu, Naomi Kaneko, Angelina Yukiko Staub, Takeo Nakanishi, Ken-ichi Nunoya, Haruo Imawaka, and Ikumi Tamai. 2016. "Analysis of the Metabolic Pathway of Bosentan and of the Cytotoxicity of Bosentan Metabolites Based on a Quantitative Modeling of Metabolism and Transport in Sandwich-Cultured Human Hepatocytes." *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 44 (1): 16–27.
- McCulloch, K. M., C. Docherty, and M. R. MacLean. 1998. "Endothelin Receptors Mediating Contraction of Rat and Human Pulmonary Resistance Arteries: Effect of Chronic Hypoxia in the Rat." *British Journal of Pharmacology* 123 (8): 1621–30.
- McLaughlin, Vallerie V., Melinda Davis, and William Cornwell. 2011. "Pulmonary Arterial Hypertension." *Current Problems in Cardiology* 36 (12): 461–517.
- Miao, Liyan, Yun Dai, and John Zhang. 2002. "Mechanism of RhoA/Rho Kinase Activation in Endothelin-1- Induced Contraction in Rabbit Basilar Artery." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 283 (3): H983–89.

- Monaco, Thomas J, and Carlos D Davila. 2016. "Safety, Efficacy, and Clinical Utility of Macitentan in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension." *Drug Design, Development and Therapy* 10 (May): 1675–82.
- Morgan, Ryan E., Michael Trauner, Carlo J. van Staden, Paul H. Lee, Bharath Ramachandran, Michael Eschenberg, Cynthia A. Afshari, Charles W. Qualls, Ruth Lightfoot-Dunn, and Hisham K. Hamadeh. 2010. "Interference with Bile Salt Export Pump Function Is a Susceptibility Factor for Human Liver Injury in Drug Development." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 118 (2): 485–500.
- Owen, Keith, David M. Cross, Mazin Derzi, Elizabeth Horsley, and Fiona L. Stavros. 2012. "An Overview of the Preclinical Toxicity and Potential Carcinogenicity of Sitaxentan (Thelin®), a Potent Endothelin Receptor Antagonist Developed for Pulmonary Arterial Hypertension." *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 64 (1): 95–103.
- Pauli-Magnus, Christiane, and Peter J. Meier. 2006. "Hepatobiliary Transporters and Drug-Induced Cholestasis." *Hepatology* 44 (4): 778–87.
- Peacock, A. J., N. F. Murphy, J. J. V. McMurray, L. Caballero, and S. Stewart. 2007. "An Epidemiological Study of Pulmonary Arterial Hypertension." *The European Respiratory Journal* 30 (1): 104–9.
- Pedersen, Jenny M., Pär Matsson, Christel A. S. Bergström, Janet Hoogstraate, Agneta Norén, Edward L. LeCluyse, and Per Artursson. 2013. "Early Identification of Clinically Relevant Drug Interactions with the Human Bile Salt Export Pump (BSEP/ABCB11)." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 136 (2): 328–43.
- Pernelle, K., R. Le Guevel, D. Glaise, C. Gaucher-Di Stasio, T. Le Charpentier, B. Bouaita, A. Corlu, and C. Guguen-Guillouzo. 2011. "Automated Detection of Hepatotoxic Compounds in Human Hepatocytes Using HepaRG Cells and Image-Based Analysis of Mitochondrial Dysfunction with JC-1 Dye." *Toxicology and Applied Pharmacology* 254 (3): 256–66.
- Pomponio, Giuliana, Camille C. Savary, Céline Parmentier, Frederic Bois, André Guillouzo, Luca Romanelli, Lysiane Richert, Emma Di Consiglio, and Emanuela Testai. 2015. "In Vitro Kinetics of Amiodarone and Its Major Metabolite in Two Human Liver Cell Models after Acute and Repeated Treatments." *Toxicology in Vitro, The Predict-IV project: Towards predictive toxicology using in vitro techniques*, 30 (1, Part A): 36–51.
- Pulido, Tomás, Igor Adzerikho, Richard N. Channick, Marion Delcroix, Nazzareno Galiè, Hossein-Ardeschir Ghofrani, Pavel Jansa, et al. 2013. "Macitentan and Morbidity and Mortality in Pulmonary Arterial Hypertension." *New England Journal of Medicine* 369 (9): 809–18.
- Qiu, Xi, Yueping Zhang, Tongtong Liu, Hong Shen, Yongling Xiao, Maureen J. Bourner, Jennifer R. Pratt, et al. 2016. "Disruption of BSEP Function in HepaRG Cells Alters Bile Acid Disposition and Is a Susceptive Factor to Drug-Induced Cholestatic Injury." *Molecular Pharmaceutics* 13 (4): 1206–16.
- Raja, Shahzad G. 2010. "Macitentan, a Tissue-Targeting Endothelin Receptor Antagonist for the Potential Oral Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension and Idiopathic Pulmonary Fibrosis." *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)* 11 (9): 1066–73.
- Sharaneek, Ahmad, Audrey Burban, Matthew Burbank, Rémy Le Guevel, Ruoya Li, André Guillouzo, and Christiane Guguen-Guillouzo. 2016. "Rho-Kinase/myosin Light Chain Kinase Pathway Plays a Key Role in the Impairment of Bile Canaliculi Dynamics Induced by Cholestatic Drugs." *Scientific Reports* 6 (May): 24709.
- Sharaneek, Ahmad, Audrey Burban, Lydie Humbert, Pamela Bachour-El Azzi, Neuza Felix-Gomes, Dominique Rainteau, and Andre Guillouzo. 2015. "Cellular Accumulation and Toxic Effects of Bile Acids in Cyclosporine A-Treated HepaRG Hepatocytes." *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 147 (2): 573–87.
- Sidharta, Patricia N, Stephan Krähenbühl, and Jasper Dingemans. 2015. "Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Evaluation of Macitentan, a Novel Endothelin Receptor Antagonist for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 11 (3): 437–49.

- Sidharta, Patricia N., Paul L. M. van Giersbergen, Atef Halabi, and Jasper Dingemans. 2011. "Macitentan: Entry-into-Humans Study with a New Endothelin Receptor Antagonist." *European Journal of Clinical Pharmacology* 67 (10): 977–84.
- Simonneau, Gérald, Nazzareno Galiè, Pavel Jansa, Gisela Martina Bohns Meyer, Hikmet Al-Hiti, Andjela Kusic-Pajic, Jean-Christophe Lemarié, Marius M. Hoeper, and Lewis J. Rubin. 2014. "Long-Term Results from the EARLY Study of Bosentan in WHO Functional Class II Pulmonary Arterial Hypertension Patients." *International Journal of Cardiology* 172 (2): 332–39.
- Sood, Namita. 2014. "Macitentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension." *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 15 (18): 2733–39.
- Stephenson, K., S. A. Harvey, S. B. Mustafa, A. T. Eakes, and M. S. Olson. 1995. "Endothelin Association with the Cultured Rat Kupffer Cell: Characterization and Regulation." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 22 (3): 896–905.
- Takatsuki, Shinichi, Erika B. Rosenzweig, Warren Zuckerman, Daniela Brady, Michelle Calderbank, and D. Dunbar Ivy. 2013. "Clinical Safety, Pharmacokinetics, and Efficacy of Ambrisentan Therapy in Children with Pulmonary Arterial Hypertension." *Pediatric Pulmonology* 48 (1): 27–34.
- Velayati, Arash, Marcos G. Valerio, Michael Shen, Sohaib Tariq, Gregg M. Lanier, and Wilbert S. Aronow. 2016. "Update on Pulmonary Arterial Hypertension Pharmacotherapy." *Postgraduate Medicine* 128 (5): 460–73.
- Venitz, Jürgen, Julia Zack, Hunter Gillies, Martine Allard, Jean Regnault, and Christopher Dufton. 2012. "Clinical Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions of Endothelin Receptor Antagonists in Pulmonary Arterial Hypertension." *Journal of Clinical Pharmacology* 52 (12): 1784–1805.
- Weiss, Johanna, Dirk Theile, Adriana Spalwiz, Jürgen Burhenne, Klaus-Dieter Riedel, and Walter Emil Haefeli. 2013. "Influence of Sildenafil and Tadalafil on the Enzyme- and Transporter-Inducing Effects of Bosentan and Ambrisentan in LS180 Cells." *Biochemical Pharmacology* 85 (2): 265–73.
- Zuccarello, M., R. Boccaletti, and R. M. Rapoport. 1999. "Does Blockade of endothelinB1-Receptor Activation Increase endothelinB2/endothelinA Receptor-Mediated Constriction in the Rabbit Basilar Artery?" *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 33 (5): 679–84.

Legends to figures

Fig. 1. Cytotoxicity of the 4 ERAs in HepaRG cells

Cells were treated with different concentrations of AMB, BOS, MAC, SIT in the absence **(A)** or presence of ABT (300 μ M) **(B)** for 24h. Cytotoxicity was measured by the MTT colorimetric assay. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments. Data were considered as significantly different when $*P < 0.05$.

Fig. 2. Effect of drugs on bile canaliculi dynamics in HepaRG cells

(A) Phase-contrast micrographs of HepaRG cells at 0, 60, 120 and 180min. Cells were exposed to 100 μ M of each drug (i.e. AMB, BOS, MAC, SIT) for 24 hours. Red arrows show dilatation. **(B)** BC surfaces of HepaRG cells exposed to drugs were quantified on the basis of brightness parameters that were adjusted to eliminate non corresponding objects and analysis was performed on at least 3 different experiments. White canalicular lumen was then quantified using image J software every 10min for 24h. Control: untreated cells. Data were expressed relative to untreated cells, arbitrarily set at a value of 100%. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments. Dilatators showed at least transiently enlarged BC $>125\%$. **(C)** F-actin localized using rhodamine-phalloidin fluoroprobe (red). Immunolabelling of the junctional ZO-1 protein (green) in HepaRG cells treated with the 4 ERAs compared with that of the control cells. Nuclei stained in blue (Hoechst dye). The images were obtained with a Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader. **(D)** Phase-contrast micrographs of HepaRG cells at 0 and 120min. Cells were exposed to different concentrations of each drug for 24 hours. Red arrows are showing dilatation.

Fig. 3. Alterations of MLC2 phosphorylation/dephosphorylation and involvement of the MLCK pathway in HepaRG cells.

(A) Representative western blots of p-MLC2 in comparison with HSC70 using anti-S19 phospho MLC2 and anti-HSC70 antibodies, at various time points (1, 2 and 3h) in ERA-treated cells. (B) Graphical representation of MLC2 phosphorylation/dephosphorylation quantified using fusion-CAPT software. Data are expressed in arbitrary units (A.U) and represent means \pm SEM of 3 independent experiments. One hour treatment was arbitrarily set at a fixed value of 2.5 for all drugs. Data were considered significantly different when $*P < 0.05$. (C) Cells treated with 100 μ M BOS or 100 μ M MAC +/- the MLCK activator CaM (5 μ M) for 2h. Phase-contrast images. (D) BC surface quantification with the drugs +/- CaM (5 μ M) as described above. Data are expressed relative to untreated cells, arbitrarily set at a value of 100%. Data represent the means \pm SEM of three independent experiments.

Fig. 4. Drugs effects on total BA disposition and profiles in HepaRG cell cultures incubated in serum-free medium.

BAs were measured in supernatant (nM) and cells (pmol/mg of proteins) from cultures treated with 10, 50 or 100 μ M of each drug for 4 and 24h and in corresponding untreated HepaRG cells (Control). Data were normalized relative to the amount of proteins in each condition. Values represent the sum of mean \pm SEM of duplicate measurements in 3 independent experiments; $*P < 0.05$ compared with values in supernatant/cells of untreated cultures.

Fig. 5. Effects of tested drugs on bile acid influx and clearance activity in HepaRG cells

(A) [3 H]-TCA clearance in HepaRG cells treated with 3 different concentrations of each drug after 2h. (B) [3 H]-TCA clearance of different concentrations of SIT 100 μ M after 2h. (C), (D) [3 H]-TCA influx in HepaRG cells treated with 3 different concentrations of each drug at 2 and

24h respectively. **(E)** [³H]-TCA clearance after a co-treatment with CaM (5μM) and 100μM of each drug after 2h. **(F)** [³H]-TCA influx after a co-treatment with CaM (5μM) and 100μM of each drug after 2h. [³H]-TCA clearance was determined based on its accumulation in cell layers (ctrl = control). Data were expressed relative to the levels found in untreated cells, arbitrarily set at a value of 100%. Data represent the means ± SEM of three independent experiments **P*<0.05 compared with untreated cells (ctrl). #*P*<0.05 compared with cells unexposed to CaM.

Fig. 6. MRP3 and MRP2 distribution and MRP2 functional activity in HepaRG cells

Differentiated HepaRG cells were fixed after 2h treatment and incubated with primary antibodies against MRP3 and MRP2 (green fluorescence). MRP2 activity was estimated using CDFDA. Efflux of fluorescent CDF, a substrate of MRP2, characterized by accumulation of green fluorescence into bile canaliculi, was evaluated in standard free buffer. Immunofluorescence images were obtained with a Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (Thermo Scientific).

Fig. 7. Effects of the 4 drugs on transcript levels of the canalicular transporters BSEP and MRP2.

HepaRG cells were exposed to the 4 drugs at the indicated concentration (i.e. 10, 50 or 100μM) for 4, 8 and 24h. mRNA levels were measured by RT-PCR analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells, arbitrarily set at a value of 1. **P*<0.05 compared with untreated cells. #*P*<0.05 compared with the 4h treatment.

Fig. 8. Effects of the 4 drugs on transcript levels of the influx transporters NTCP and OATP-B.

HepaRG cells were exposed to the 4 drugs at the indicated concentration (i.e. 10, 50 or 100 μ M) for 4, 8 and 24h. mRNA levels were measured by RT-PCR analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells, arbitrarily set at a value of 1. * P <0.05 compared with untreated cells. # P <0.05 compared with the 4h treatment.

Fig. 9. Effects of the 4 drugs on transcript levels of the basolateral transporters MRP3 and MRP4.

HepaRG cells were exposed to the 4 drugs at the indicated concentration (i.e. 10, 50 or 100 μ M) for 4, 8 and 24h. mRNA levels were measured by RT-PCR analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells, arbitrarily set at a value of 1. * P <0.05 compared with untreated cells. # P <0.05 compared with the 4h treatment.

Legends to tables

Table 1. Characteristics of the 4 ERAs.

(A) The list of compounds, their affinity to the 2 endothelin receptors, C_{max} (refers to the maximum serum concentration of the drug (μM), half lives, dosing, clinical hepatic effects and some results obtained *in vitro* with either vesicles overexpressing human BA transporters (*) or liver cells (**)) are displayed. C_{max} values are from the literature (see references). **(B)** Cells were incubated for 24h. For cytotoxicity testing the cells were treated with varying concentrations of each drug for 24h, then assayed with the MTT colorimetric test and IC_{20s} values were calculated. **(C)** Chemical structures of the 4 ERAs.

Table 2. Drugs effects on BA disposition and profiles in HepaRG cell cultures incubated in serum-free medium.

Total BAs, CDCA and CA were measured in supernatants (nM) and cells (pmol/mg of proteins) from cultures treated with 10, 50 or 100μM of each drug for 4 and 24h and in corresponding untreated HepaRG cells (Control). Values are presented as fold change compared to the control (Control=100%). Data were normalized relative to the amount of proteins in each condition. Values represent the sum of mean ± SEM of duplicate measurements in 3 independent experiments, **P*<0.05 compared with values in supernatants/cells of untreated cultures.

Table 3. Drugs effects on BA disposition and profiles in HepaRG cell cultures incubated in serum-free medium.

Primary and secondary BAs, tauro- and glyco-conjugates were measured in supernatants (nM) and cells (pmol/mg proteins) from cultures treated with 10, 50 or 100μM of each drug

for 4 and 24h and in corresponding untreated HepaRG cells (Control). Values are presented as fold change compared to the control (Control=100%). Data were normalized relative to the amount of proteins in each condition. Values represent the sum of mean \pm SEM of duplicate measurements in 3 independent experiments, * P <0.05 compared with values in supernatant/cells of untreated cultures.

Table 4. Summary of the results on the 4 ERAs

IC20 (μ M), BC deformation (i.e. constriction or dilatation), [3 H]-TCA Clearance (control=100%), *BSEP* mRNA expression (control=1), MLC2 phosphorylation state and MLCK implication are summarized. BC, bile canaliculi; ROCK, Rho-kinase; MLCK, myosin light chain kinase; nc: no change.

Fig. 1

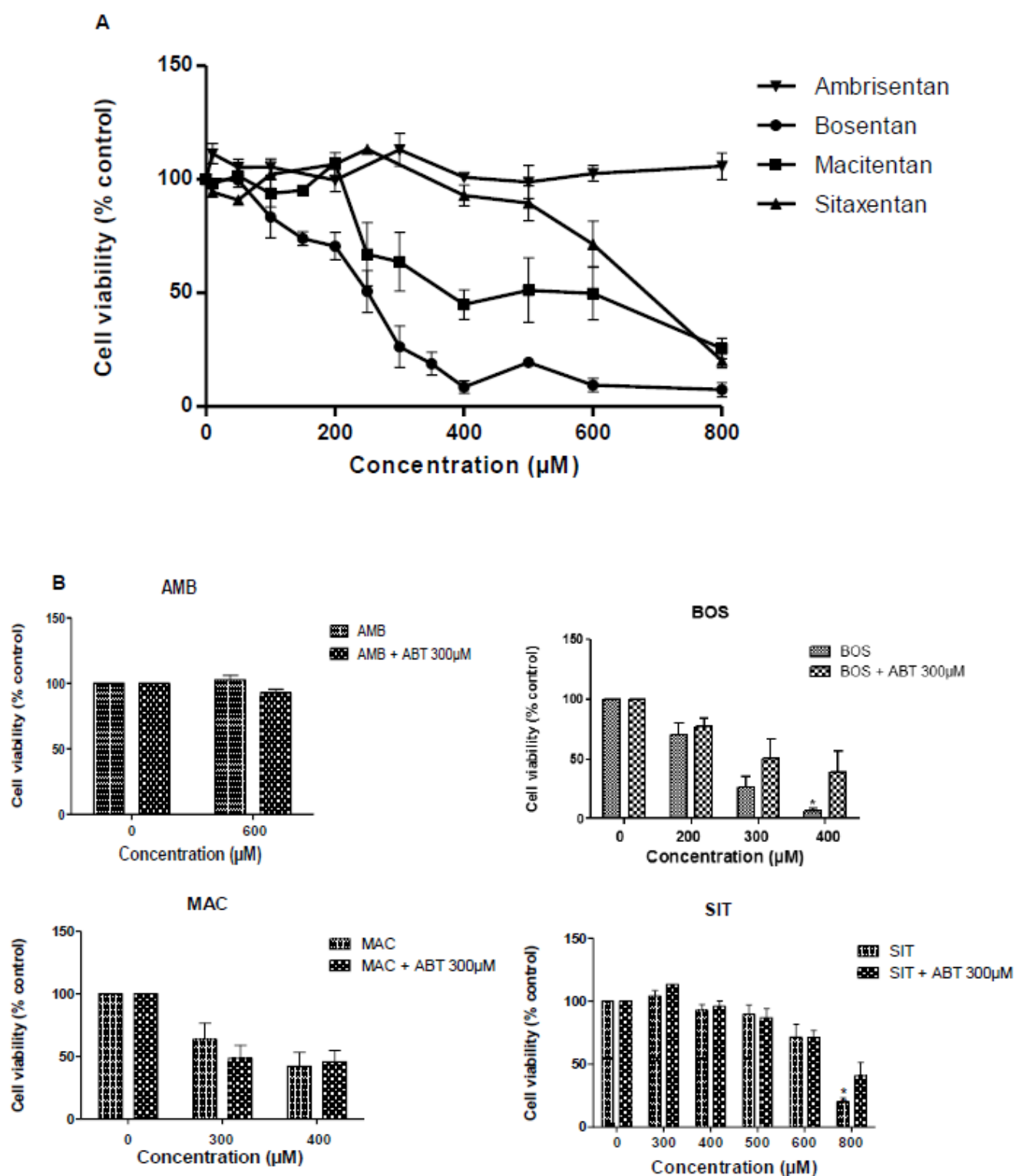


Fig. 2

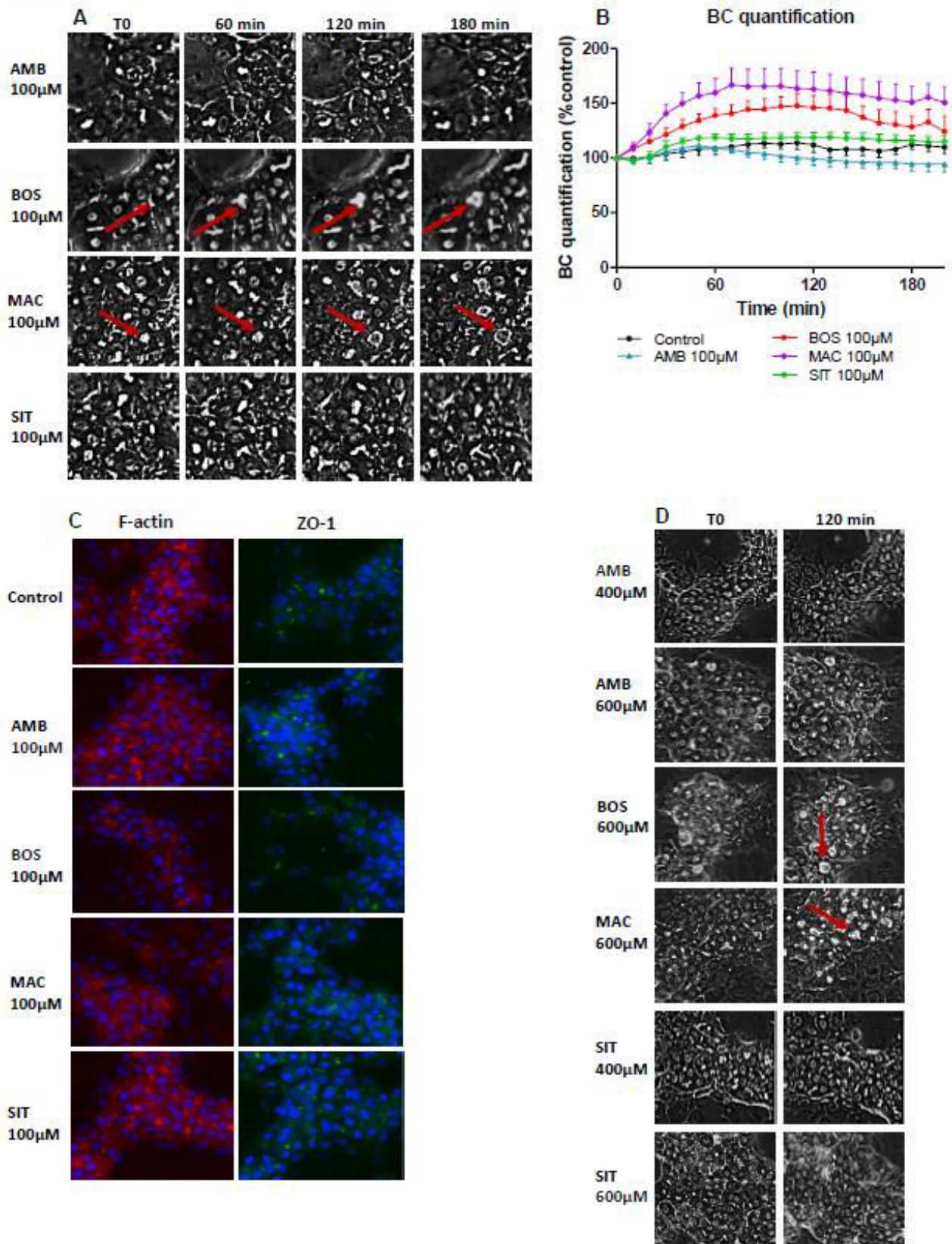


Fig. 3

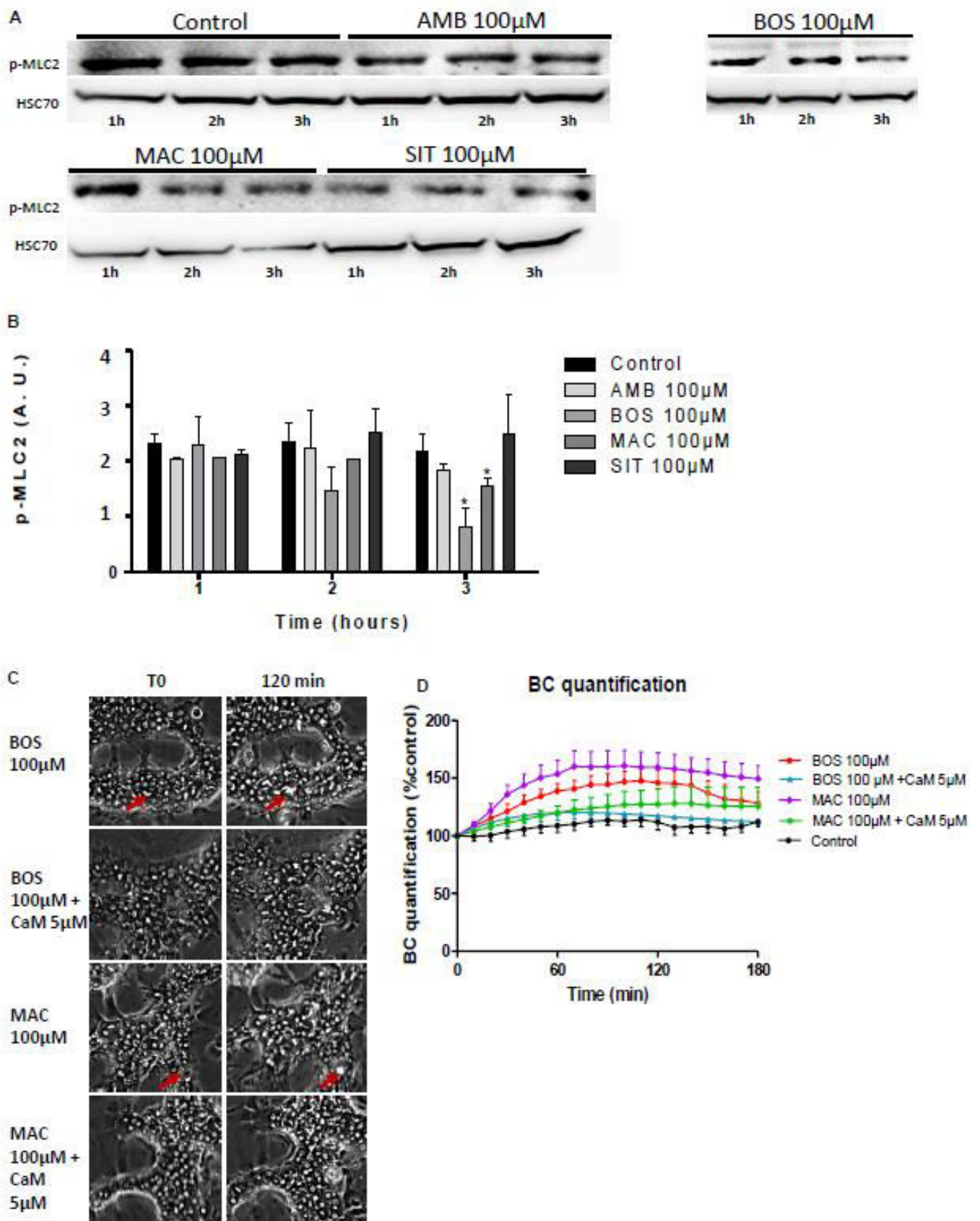


Fig. 4

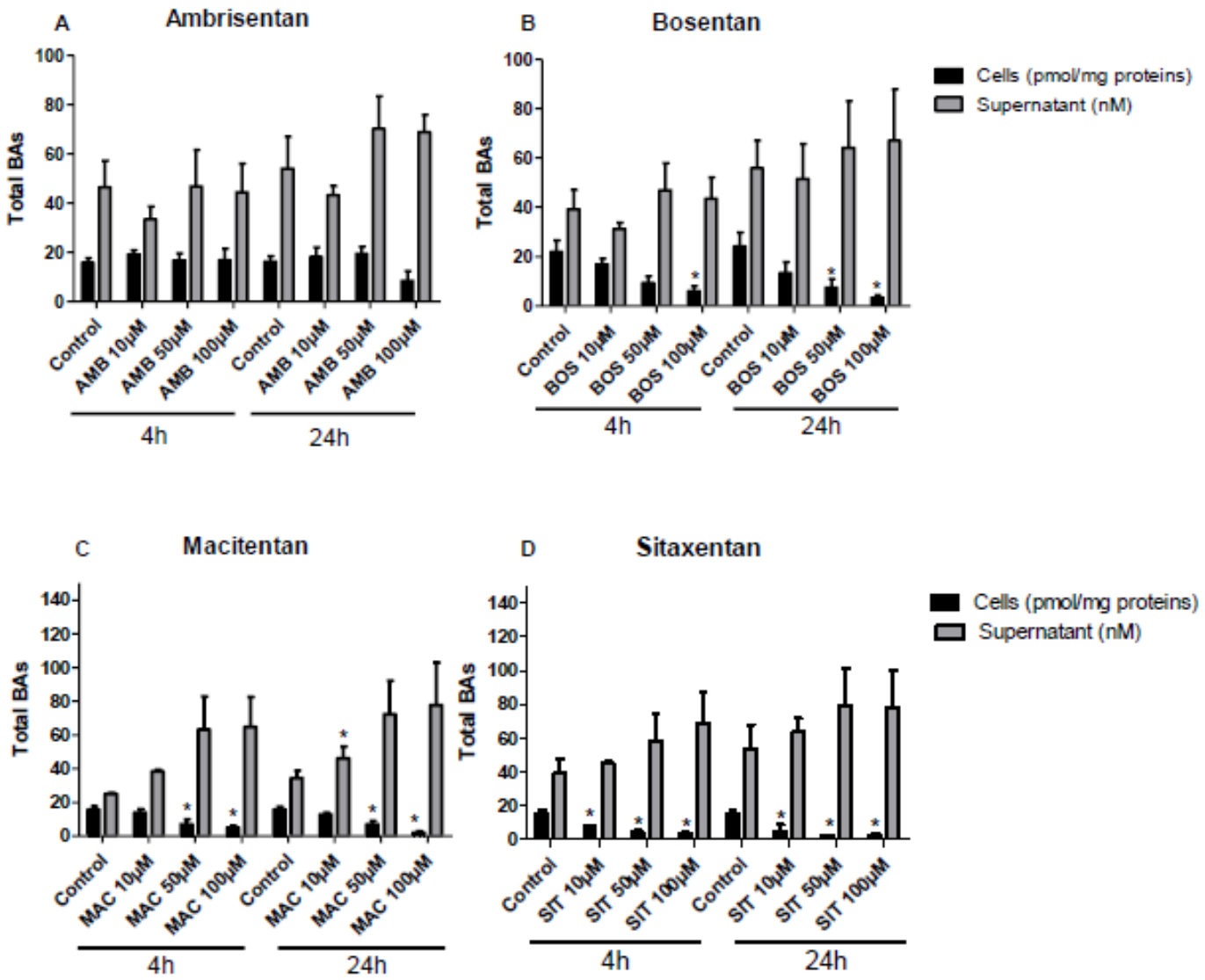


Fig. 5

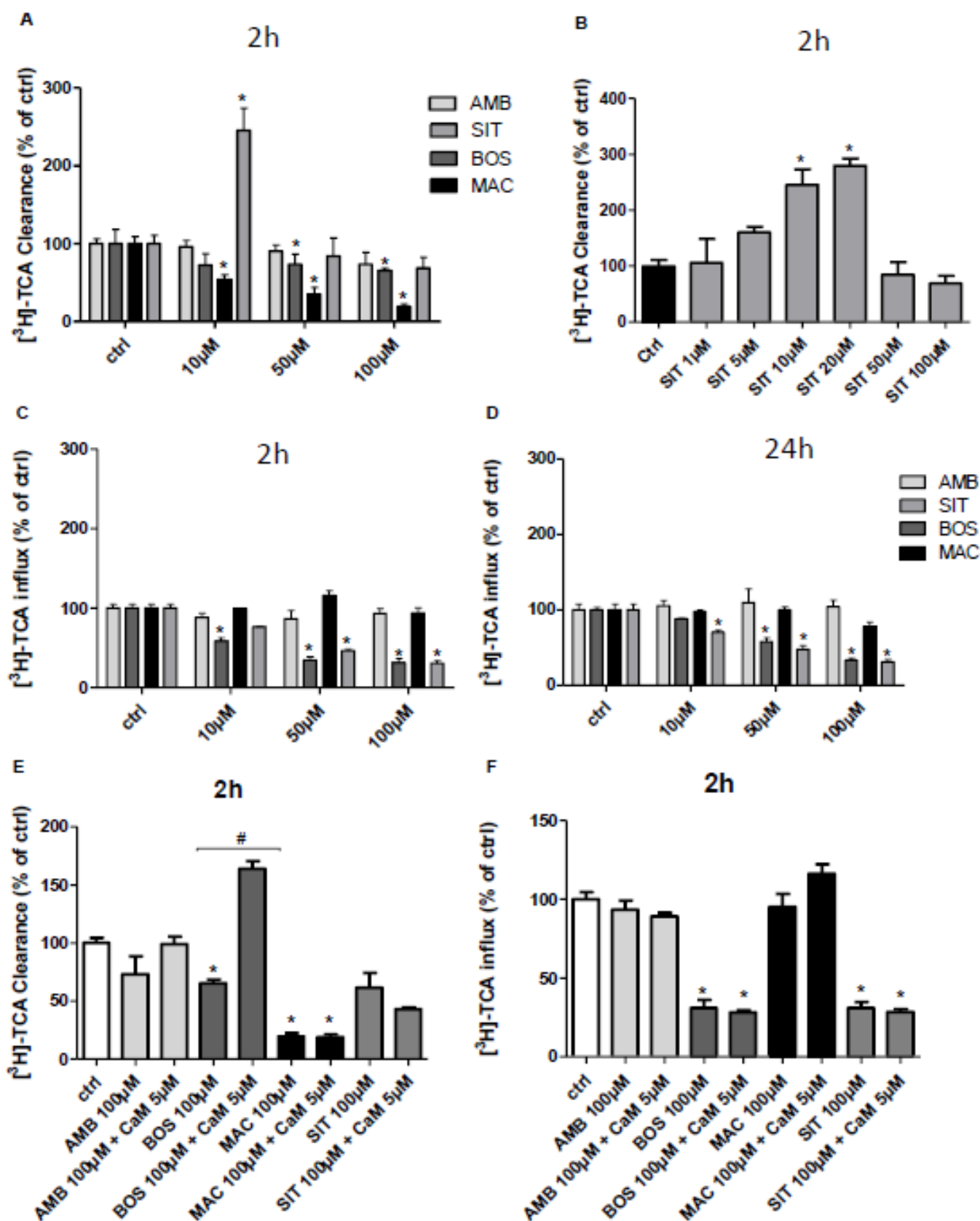


Fig. 6

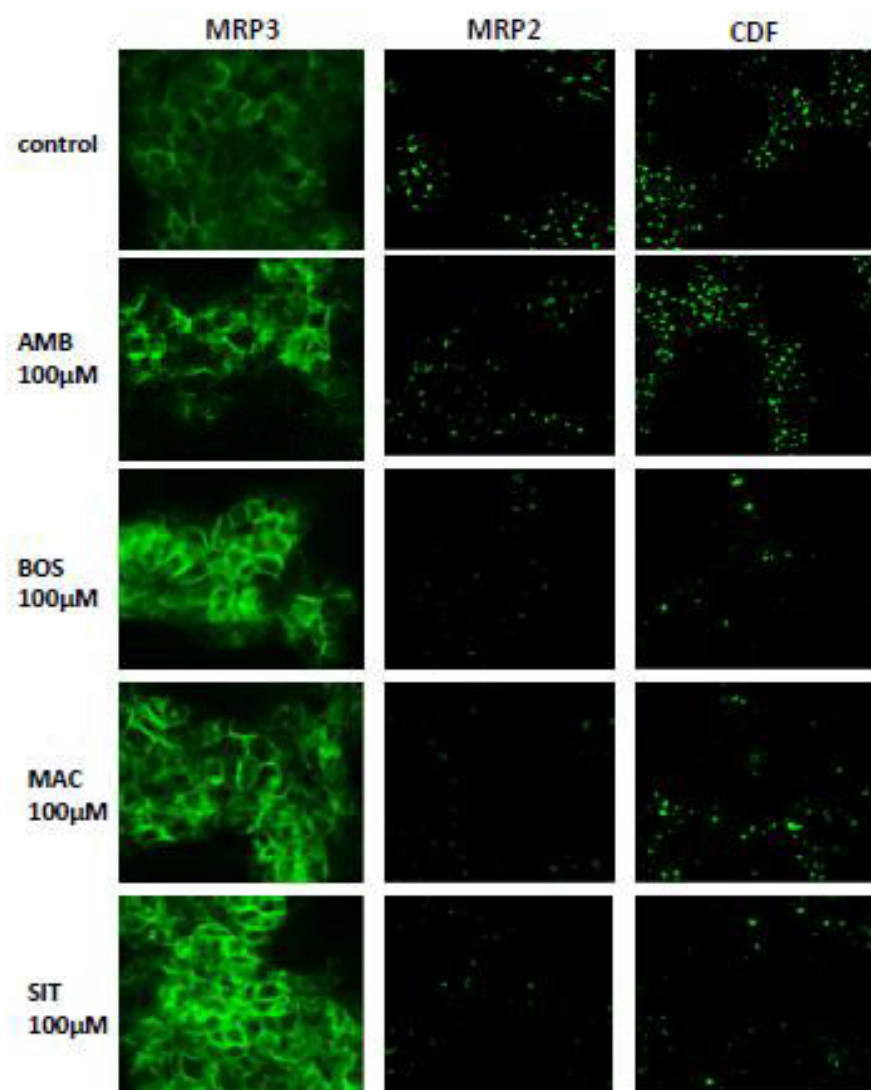


Fig. 7

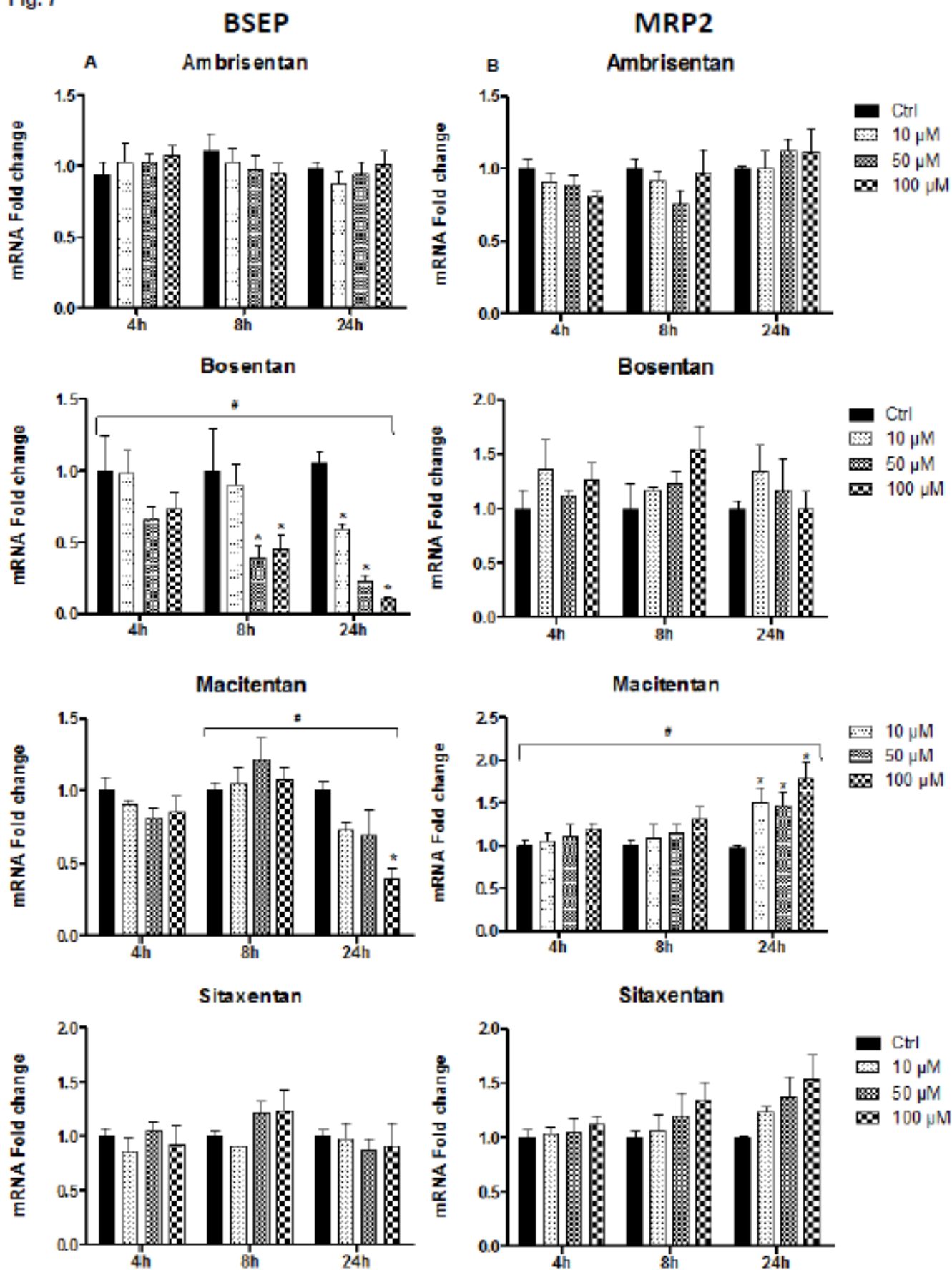


Fig. 8

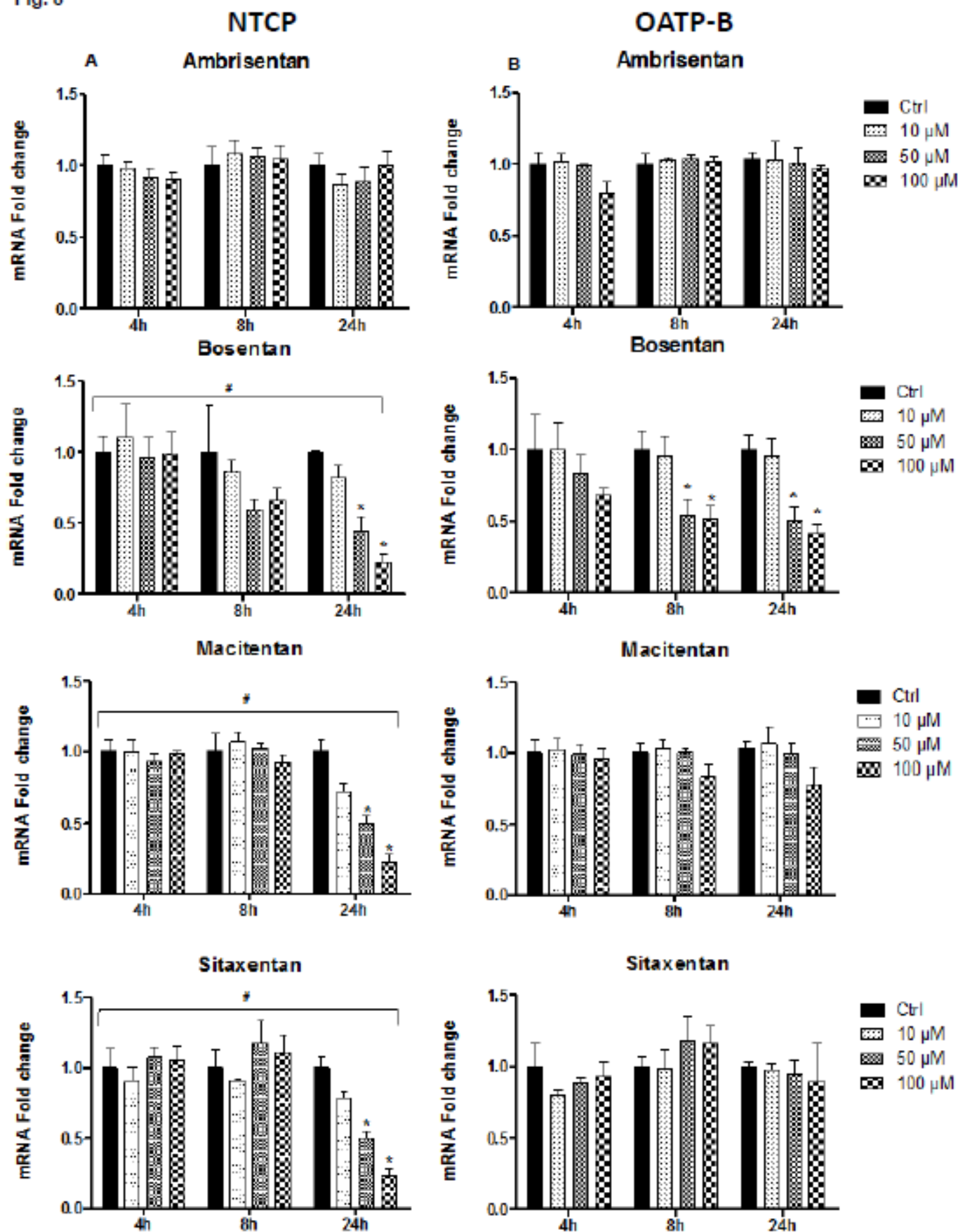


Fig. 9

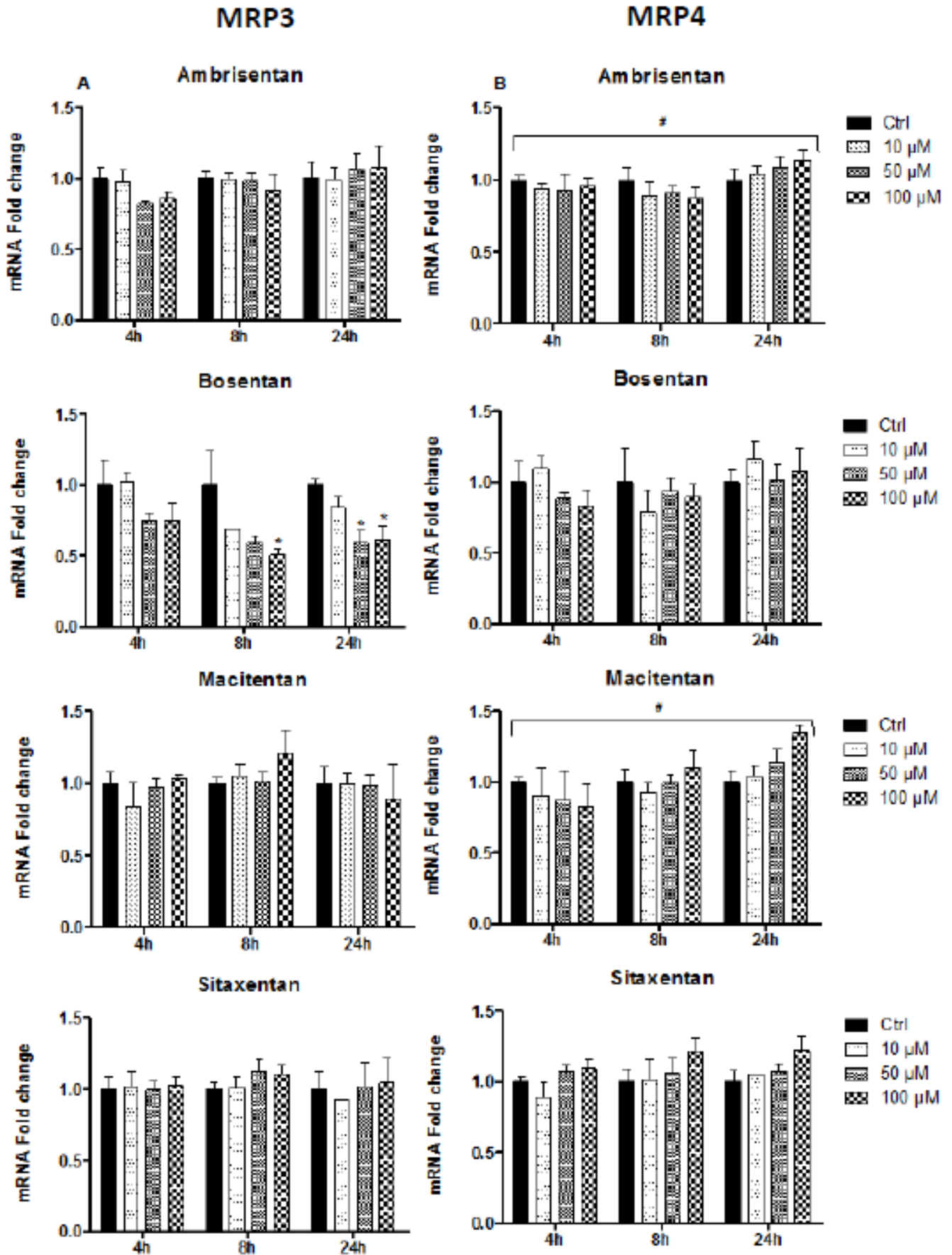


Table. 1

A

Compound	Affinity	Cmax	Half life (t1/2)	Dosing	Clinical hepatic effects	<i>In vitro</i> hepatic effects	References
Ambrisentan	- Selective for ET _A	2-3.2	15h	5 mg or 10 mg once a day	No evidence of hepatotoxicity ; better hepatic safety profile than for other ERAs.	No modulation of MRP2, Pgp or BSEP**	Ori ben-yehuda et al. 2012 ; Galie et al. 2005 ; Barst et al. 2007 ; Takatsuki et al.. 2013
Bosentan	- Dual antagonist - 50xET _A	6.75	5h	62.5 mg then 125 mg twice a day	Elevated transaminases ; increase in serum bile acids	BSEP and NTCP inhibition*;** ; substrate for OATP. NTCP and MRP2**	Fattinger et al. 2001 ; Mano et al. 2007 ; Treiber et al. 2007 ; Livertox Hartman. et al.. 2010 ; Dhillon and Keating. 2009
Macitentan	- Dual antagonist - 100xET _A	0.13-0.75	16h	10 mg once a day	Increased liver weight ; centrilobular hypertrophy	BSEP and NTCP inhibition* ; hepatic disposition mainly driven by passive diffusion	EMA RCP. Lepist. et al. 2014 ; Ahn LY et al.. 2014 livertox
Sitaxentan	-Selective for ET _A (6000xET _A)	22	10h	100 mg once a day	Elevated transaminases ; dose-related increase in liver weight (centrilobular hypertrophy and necrosis)	NTCP and OATP transport Inhibition** ; CYP3A4 inhibition	Chaumais et al. 2015 Lavelle et al. 2009 Erve et al.. 2013 Hartman. et al.. 2010 Galié et al.. 2005 ; Stavros et al.. 2010; Neeraj Dhaun et al.. 2007

B

Compound	IC20 (μM) (24h)
Ambrisentan	>800
Bosentan	120
Macitentan	230
Sitaxentan	580

C

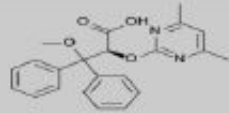
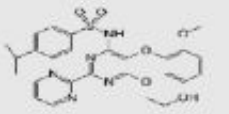
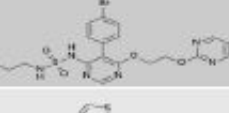
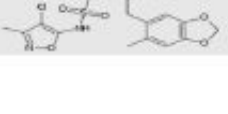
Compound	Chemical
Ambrisentan	
Bosentan	
Macitentan	
Sitaxentan	

Table. 2

		4H			24H		
		Cellular accumulation (% control)		Supernatant accumulation (% control)	Cellular accumulation (% control)		Supernatant accumulation (% control)
Total BAs	AMB	10	114.6 ± 7.1	117.6 ± 16.2	103.3 ± 15.1	99.9 ± 2.8	
		50	120.9 ± 29.8	109.3 ± 9.1	133.9 ± 11.7	100.0 ± 8.1	
		100	140.3 ± 19.9	117.8 ± 6.4	103.5 ± 7.3	139.1 ± 13.5	
	BOS	10	108.2 ± 32.8	119.5 ± 6.6	95.6 ± 13.7	115.2 ± 7.4	
		50	40.6 ± 7.9*	130.9 ± 2.4*	33.8 ± 13.5*	119.8 ± 4.9	
		100	25.5 ± 1.7*	124.5 ± 2.9	14.7 ± 3.7*	123.8 ± 10.8	
	MAC	10	86.1 ± 18.0	141.9 ± 8.3	78.1 ± 14.2	137.1 ± 19.9	
		50	51.2 ± 15.4	183.3 ± 9.1	54.9 ± 17.5	170.1 ± 31.6	
		100	32.2 ± 8.3*	194.3 ± 12.7	15.3 ± 5.8*	164.1 ± 35.5	
	SIT	10	47.6 ± 4.4	186.6 ± 9.6	50.1 ± 6.5	176.7 ± 5.2	
		50	26.4 ± 5.3	171.9 ± 8.8	14.9 ± 1.18	190.4 ± 15.7	
		100	22.8 ± 4.9*	200.0 ± 5.2	10.7 ± 2.0*	182.7 ± 23.9	
CA	AMB	10	101.7 ± 7.2	135.9 ± 24.6	118.8 ± 24.3	106.1 ± 4.7	
		50	156.4 ± 15.7	123.4 ± 19.6	124.0 ± 51.6	103.9 ± 3.8	
		100	130.7 ± 26.4	114.3 ± 37.8	43.6 ± 24.4	79.3 ± 13.2	
	BOS	10	41.3 ± 31.3	73.2 ± 18.9*	30.1 ± 24.7	83.7 ± 17.2	
		50	60.4 ± 9.4	144.1 ± 4.1	26.2 ± 11.2*	69.6 ± 7.3	
		100	60.9 ± 8.4	138.1 ± 10.3	16.1 ± 1.6*	54.1 ± 6.9*	
	MAC	10	75.1 ± 18.9	99.6 ± 13.9*	54.7 ± 12.1	69.5 ± 19.7	
		50	127.7 ± 28.1	166.8 ± 12.5*	46.1 ± 19.6	101.1 ± 35.1	
		100	108.0 ± 20.5	136.1 ± 12.8*	36.0 ± 9.2*	84.6 ± 8.5	
	SIT	10	80.1 ± 0.5	149.6 ± 38.4	0.0	79.0 ± 1.9	
		50	86.3 ± 16.1	117.7 ± 18.7	33.0 ± 12.6	81.6 ± 3.5*	
		100	127.6 ± 17.1	143.0 ± 9.9	69.0 ± 26.2	81.0 ± 7.1*	
CDCA	AMB	10	119.6 ± 9.1	76.5 ± 6.9	103.4 ± 16.3	65.3 ± 7.1	
		50	107.6 ± 51.3	105.3 ± 5.3	105.4 ± 27.2	101.0 ± 9.8	
		100	89.5 ± 42.5	100.1 ± 9.7	32.1 ± 39.9	144.9 ± 29.1	
	BOS	10	79.7 ± 36.0	62.5 ± 8.9	75.1 ± 17.4	109.2 ± 10.3	
		50	38.8 ± 9.3*	206.6 ± 15.1*	41.2 ± 19.9*	207.2 ± 14.9*	
		100	23.1 ± 3.6*	173.3 ± 15.2*	26.6 ± 5.6*	192.1 ± 22.2*	
	MAC	10	71.8 ± 19.5	98.9 ± 10.8	79.0 ± 16.7	90.8 ± 45.4	
		50	49.5 ± 8.1	227.8 ± 18.5*	52.0 ± 25.1	197.1 ± 36.6	
		100	22.5 ± 6.5*	214.7 ± 15.5*	12.1 ± 7.7*	214.0 ± 54.9	
	SIT	10	42.9 ± 1.4*	84.0 ± 12.3*	44.4 ± 6.6*	194.0 ± 13.3	
		50	18.3 ± 1.6*	180.9 ± 11.7*	14.4 ± 1.2*	263.4 ± 49.9	
		100	16.7 ± 0.1*	226.9 ± 16.6*	5.4 ± 0.8*	156.9 ± 135.0	

Table. 3

	4H				24H			
		Cellular accumulation (% control)	Supernatant accumulation (% control)		Cellular accumulation (% control)	Supernatant accumulation (% control)		
Primary Bas	AMB	10	113.2 ± 10.4	116.9 ± 18.0	103.7 ± 11.2	101.6 ± 5.1		
		50	108.9 ± 48.4	104.7 ± 11.8	119.7 ± 14.7	100.9 ± 1.6		
		100	84.5 ± 44.7	105.0 ± 20.8	38.8 ± 57.8	127.4 ± 7.5*		
	BOS	10	76.8 ± 23.6	79.5 ± 7.3*	62.7 ± 21.4	82.7 ± 22.1		
		50	55.9 ± 11.0*	183.2 ± 2.7*	43.3 ± 19.9*	85.3 ± 2.4		
		100	38.8 ± 3.9*	152.2 ± 4.3*	18.8 ± 5.0*	70.3 ± 13.8		
	MAC	10	87.1 ± 19.6	144.2 ± 9.1	74.3 ± 14.2	120.2 ± 33.2		
		50	65.0 ± 14.4	176.5 ± 19.1*	51.5 ± 23.7	155.6 ± 64.6		
		100	36.1 ± 10.3*	187.7 ± 17.9*	15.4 ± 6.8*	163.2 ± 43.1		
	SIT	10	30.5 ± 4.5*	88.1 ± 20.8*	54.0 ± 6.1*	184.0 ± 3.4*		
		50	28.9 ± 7.3*	97.3 ± 18.9*	14.0 ± 1.9*	158.9 ± 20.7		
		100	28.1 ± 7.5*	186.6 ± 14.4*	11.2 ± 1.9*	114.2 ± 52.8		
Secondary BAs	AMB	10	126.0 ± 1.2	76.3 ± 16.8	134.3 ± 43.1	77.8 ± 1.1		
		50	120.0 ± 45.5	65.7 ± 24.1	160.6 ± 40.5	105.7 ± 6.7		
		100	103.1 ± 44.2	70.3 ± 16.1	88.8 ± 1.9	329.2 ± 88.8		
	BOS	10	75.9 ± 23.4	91.0 ± 6.5	36.0 ± 15.9	200.8 ± 61.8		
		50	54.2 ± 7.5	177.6 ± 33.6	37.7 ± 25.6	358.8 ± 123.9		
		100	25.5 ± 1.9*	181.3 ± 28.7	18.6 ± 15.6*	431.1 ± 102.2		
	MAC	10	61.5 ± 14.3	81.1 ± 24.1	85.5 ± 13.6	211.7 ± 2.9		
		50	40.9 ± 21.0	169.7 ± 44.8	98.4 ± 14.6	398.7 ± 58.5		
		100	29.0 ± 11.4*	165.7 ± 30.1	32.4 ± 6.5*	489.9 ± 108.5*		
	SIT	10	41.5 ± 4.4*	75.6 ± 53.8	39.0 ± 9.6	237.0 ± 46.5		
		50	20.8 ± 7.5*	133.3 ± 28.4	79.0 ± 13.2	417.0 ± 167.4		
		100	20.9 ± 8.9*	187.8 ± 26.4*	61.0 ± 42.7	613.0 ± 80.2*		
Tauro-conjugates	AMB	10	113.3 ± 8.1	114.9 ± 13.7	103.3 ± 13.8	101.5 ± 5.1		
		50	111.1 ± 51.9	105.9 ± 14.5	120.1 ± 14.9	122.9 ± 16.9		
		100	87.0 ± 45.3	103.0 ± 19.0	39.4 ± 37.5	124.3 ± 10.8		
	BOS	10	97.9 ± 26.6	66.1 ± 13.2	63.0 ± 20.6	82.9 ± 19.3		
		50	54.6 ± 10.2*	164.0 ± 9.8	35.7 ± 14.6*	122.5 ± 9.9		
		100	29.5 ± 7.6*	145.0 ± 6.9	16.0 ± 3.8*	139.6 ± 21.6		
	MAC	10	86.1 ± 18.9	97.9 ± 8.7*	74.6 ± 14.2	90.5 ± 19.1		
		50	65.8 ± 16.7	211.0 ± 8.1*	55.0 ± 24.5	148.5 ± 40.2		
		100	27.1 ± 13.3*	195.2 ± 10.5*	12.4 ± 1.4*	150.4 ± 29.6		
	SIT	10	46.8 ± 4.1*	128.0 ± 15.7*	94.0 ± 24.6	198.0 ± 6.4		
		50	31.0 ± 7.7*	123.7 ± 15.0*	28.0 ± 9.2*	175.5 ± 26.5		
		100	30.3 ± 8.2*	200.6 ± 10.8*	14.2 ± 1.2*	123.5 ± 68.2		
Glyco-conjugates	AMB	10	111.4 ± 1.8	118.8 ± 8.5	134.3 ± 38.6	108.5 ± 1.8		
		50	111.8 ± 21.9	95.0 ± 13.1	147.7 ± 52.5	111.4 ± 0.8		
		100	146.2 ± 17.4	109.7 ± 18.4	113.0 ± 41.3	190.7 ± 52.2		
	BOS	10	105.3 ± 23.4	119.9 ± 9.9	134.6 ± 39.7	112.5 ± 9.5		
		50	66.1 ± 12.5*	136.3 ± 12.3*	74.4 ± 21.5	118.5 ± 9.8		
		100	32.4 ± 4.0*	131.2 ± 9.3*	47.1 ± 12.3*	119.8 ± 25.1		
	MAC	10	78.8 ± 11.2*	111.4 ± 7.6*	66.3 ± 24.4	110.8 ± 51.6		
		50	67.4 ± 0.5*	129.1 ± 13.8*	43.7 ± 20.4	100.9 ± 18.6*		
		100	33.0 ± 0.2*	118.9 ± 11.9*	30.1 ± 3.4*	99.1 ± 31.7*		
	SIT	10	41.0 ± 16.2	171.0 ± 25.9	59.0 ± 26.8	226.0 ± 2.2		
		50	38.0 ± 9.4	153.3 ± 16.5	23.0 ± 14.2	235.0 ± 2.9*		
		100	34.5 ± 10.1	185.8 ± 12.1*	53.0 ± 19.6	164.0 ± 79.7		

Table 4

Compound	IC20	BC deformation	[³ H]-TCA Clearance (ctrl = 100%)	BSEP mRNA expression (ctrl = 1)	MLC2 phosphorylation state	MLCK implication
Ambrisentan 100 μM	>800	nc	73.2 ± 15.4	1.0 ± 0.0	nc	-
Bosentan 100 μM	120	Dilatation	64.24 ± 3.2*	0.4 ± 2.0*	Dephosphorylation	MLCK
Macitentan 100 μM	230	Dilatation	19.4 ± 2.9*	0.77 ± 0.2*	Dephosphorylation	MLCK
Sitaxentan 100 μM	580	nc	68.7 ± 13.7	1.03 ± 0.1	nc	-

Supplemental Table 1

Gene	Name	Forward primer	Reverse primer
<i>GAPDH</i>	Glyceraldéhyde-3-Phosphate déshydrogénase	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA
<i>CYP3A4</i>	Cytochrome P450 3A4	CTTCATCCAATGGACTGCATAAAT	TCCAAGTATAACACTCTACACAGACAA
<i>SOD2</i>	Manganese superoxide dismutase	GGGTTGGCTTGGTTTCAATA	CTGATTTGGACAAGCAGCAA
<i>BSEP</i>	Bile salt export pump	TGATCCTGATCAAGGGAAGG	TGGTTCCTGGGAAACAATTC
<i>NTCP</i>	Na ⁺ -dependent taurocholic cotransporting polypeptide	GGGACATGAACCTCAGCATT	CGTTTGGATTGAGGACGAT
<i>MRP2</i>	Multidrug resistance-associated protein 2	TGAGCAAGTTTGAAACGCACAT	AGCTCTTCTCTGCCGTCTCT
<i>MRP3</i>	Multidrug resistance-associated protein 3	GTCCGCAGAATGGACTTGAT	TCACCACTGGGGATCATT
<i>MRP4</i>	Multidrug resistance-associated protein 4	GCTCAGGTTGCCTATGTGCT	CGGTTACAATTTCTCTCTCCA
<i>OATP-B</i>	Organic anion transporting polypeptide	TGATTGGTATGGGGCTATC	CATATCCTAGGGCTGGTGT
<i>ALB</i>	Albumin	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT	ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC
<i>ALDOB</i>	Aldolase-B	TGCGCCCAGTACAAGAAGGACGGTTG	CTCAAGATCTCGGACGGCTG
<i>ETA</i>	Endothelin A receptor	TGCCCTCAGTGAACATCTTAAG	CATCGGTTCTTGCCATCTCG
<i>ETB</i>	Endothelin B receptor	CAAGGACCCATCGAGATCAAG	AGATATTGGGACCGTTTCGC

Supplemental Table. 1. Primer pairs sequences

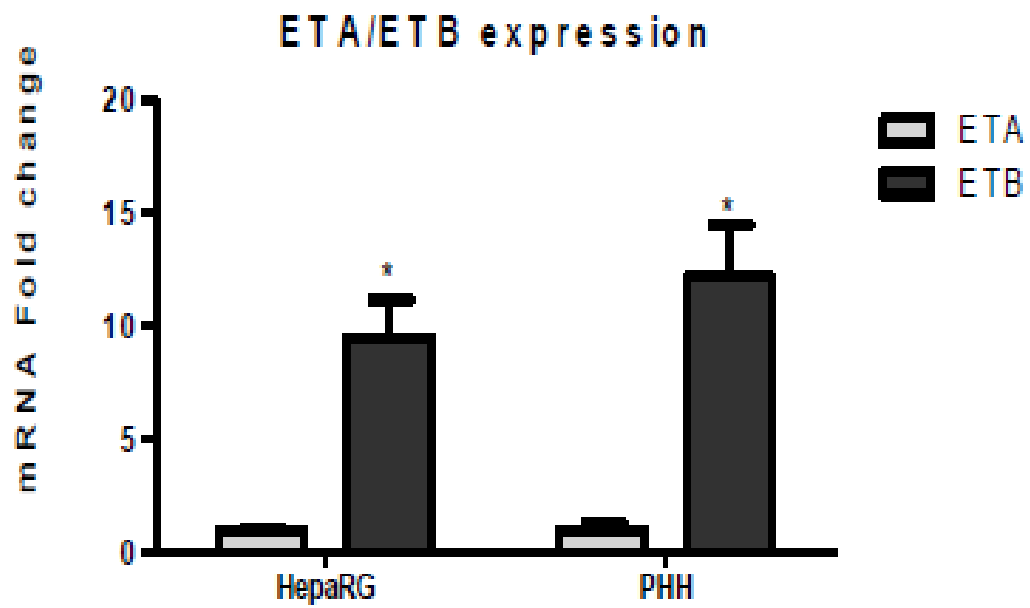
Supplemental Table 2

Drugs	Non transporters genes expression			
	ALB	ALDOB	CYP3A4	SOD2
Bosentan (100µM)	0,37 ± 0.09*	0.29 ± 0.08*	0,56 ± 0,18	0,21 ± 0.06*
Macitentan (100µM)	0,87 ± 0.03	0.61 ± 0.1	1,71 ± 0,28	1.08 ± 0.17
Ambrisentan (100µM)	1,09 ± 0,12	1,11 ± 0.28	0.99 ± 0,2	0.85 ± 0.13
Sitaxentan (100µM)	0,84 ± 0.1	0,86 ± 0,09	2,54 ± 0.75*	1.10 ± 0.26

Supplemental Table. 2. Effects of the tested drugs on transcript levels of non transporters genes

HepaRG cells were exposed to the 4 compounds (100µM) for 24h. mRNA levels of ALB, ALDOB, CYP3A4, SOD2 were measured by RT-PCR analysis. All results are expressed relative to the levels found in control cells, arbitrarily set at a value of 1. Data were considered significantly different when *P < 0.05

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure. 1. Relative expressions of ET_A and ET_B receptors in both HepaRG cells and PHH

mRNA levels were measured by RT-PCR analysis in both HepaRG and PHH untreated cells. All results are expressed relative to the levels of ET_A found in control cells, arbitrarily set at a value of 1. * $P < 0.05$ compared with ET_A receptors.

Supplemental Video 1. BC rhythmic dynamics movements in ambrisentan-treated HepaRG cells

Rhythmic dynamics movements in ambrisentan-treated HepaRG cells. Images of 100 μ M ambrisentan-treated cells were captured each 10 min during 24h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂).

Supplemental Video 2. Dilatation of BC in bosentan-treated HepaRG cells

Dilatation of BC and loss of their rhythmic dynamics in bosentan-treated HepaRG cells. Images of 100 μ M bosentan-treated cells were captured each 10 min during 24h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂).

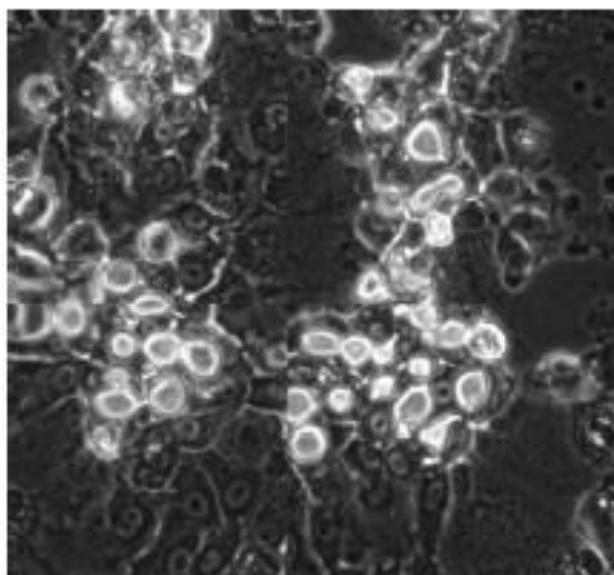
Supplemental Video 3. Dilatation of BC in macitentan-treated HepaRG cells

Dilatation of BC and loss of their rhythmic dynamics in macitentan-treated HepaRG cells. Images of 100 μ M macitentan-treated cells were captured each 10 min during 24h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂).

Supplemental Video 4. BC rhythmic dynamics movements in sitaxentan-treated HepaRG cells

Rhythmic dynamics movements in sitaxentan-treated HepaRG cells. Images of 100 μ M sitaxentan-treated cells were captured each 10 min during 24h under time-lapse phase-contrast videomicroscopy equipped with a thermostatic chamber (37°C and CO₂).

Supplemental Figure 2



Supplemental Figure. 2. Effect of a combination between bosentan 100 μ M and fasudil 50 μ M on bile canaliculi dynamics in HepaRG cells

Time-lapse imaging of HepaRG cells co-treated with 100 μ M bosentan and 50 μ M fasudil for 3h.

Conclusion générale et perspectives

La cholestase, maladie hépatique caractérisée par une accumulation intrahépatique d'acides biliaires toxiques résultant d'une altération de leur sécrétion, représente un obstacle majeur au développement des médicaments. En effet, on estime qu'elle est responsable de plus de 50 % des cas d'insuffisance hépatique. Par ailleurs, environ 40 % des DILI conduisent à des maladies cholestatiques intrahépatiques pouvant mener à des lésions graves voire la mort. Les mécanismes de la cholestase induite par les médicaments restent mal compris ; environ 40 % des cas de cholestase restent imprévisibles. En raison de cette hépatotoxicité idiosyncratique, de nombreux médicaments ont été retirés du marché ou mis sous "warning box" au cours des dernières décennies.

La détection précoce des DILI, et plus particulièrement d'une cholestase, demeure un véritable défi pour les industries pharmaceutiques et les organismes de réglementation. Plusieurs mécanismes ont été évoqués pour expliquer la cholestase intrahépatique mais son étude est rendue difficile par le fait que les modèles animaux ne permettent pas de reproduire de manière satisfaisante les lésions observées chez l'Homme. Au cours des dernières années, de plus en plus d'études ont fait appel aux cultures primaires d'hépatocytes humains en sandwich. Cependant ce modèle a de nombreuses limitations, en particulier la difficulté d'obtention des cellules ainsi que leur qualité fonctionnelle variable d'un donneur à l'autre, l'utilisation pour la réalisation du sandwich de protéines matricielles qui peuvent fixer des molécules chimiques et l'instabilité fonctionnelle des hépatocytes en fonction du temps de culture. Selon l'Agence européenne du médicament et l'International Transporter Consortium, il a été recommandé que l'inhibition du transporteur BSEP soit évaluée au cours du développement, lorsque des preuves d'atteinte hépatique cholestatique ont été observées dans les études de sécurité non cliniques ou durant les essais cliniques (Kenna 2014). Plusieurs médicaments rapportés comme étant responsables de DILI ont été identifiés comme étant des inhibiteurs de BSEP (Morgan et al. 2010; Stieger 2010; Dawson et al. 2012; Pedersen et al. 2013), mais un nombre important de faux positifs a été trouvé sur des modèles de vésicules exprimant BSEP ou sur des hépatocytes humains en conformation sandwich (Pedersen et al. 2013).

Aussi, il existe actuellement un besoin de nouveaux modèles d'étude *in vitro* et de méthodes de détection de la cholestase. Le modèle cellulaire HepaRG représente une alternative intéressante à ce besoin. En effet, capable d'exprimer les transporteurs

hépatiques, il possède également la majeure partie des enzymes de biotransformation permettant ainsi l'étude des molécules mères tout comme des métabolites. Grâce à ce modèle cellulaire, nous avons réussi à développer une méthode de détection de la cholestase reposant sur des caractéristiques fonctionnelles, tout à fait différente de ce qui a été proposé jusqu'à maintenant. En effet, la sécrétion biliaire est un processus complexe comportant plusieurs étapes comprenant la translocation des acides biliaires à travers la membrane basolatérale, le trafic à travers le cytoplasme et enfin l'efflux vers la lumière canaliculaire. La motilité des canalicules biliaires démontrée principalement dans des couplets d'hépatocytes (Phillips et al. 1974; Phillips et al. 1975; Oshio and Phillips 1981), a été signalée comme jouant un rôle dans le flux biliaire dans les hépatocytes de rat, *in vitro* et *in vivo* (Watanabe et al. 1991b). Dans notre étude, en utilisant la microscopie de type time-lapse sur des monocouches organisées d'hépatocytes HepaRG, nous avons réussi à caractériser les contractions des canalicules biliaires qui semblent être associées à un processus dynamique d'ouverture et de fermeture répété qui témoigne d'une expulsion unidirectionnelle de ce que nous pouvons supposer être des acides biliaires. De plus, après un traitement par une molécule cholestatique *in vitro*, nous avons également démontré que cette dynamique canaliculaire pouvait être inhibée, conduisant à une constriction ou une dilatation des canalicules biliaires, bloquant ainsi l'écoulement de la bile. Nous avons aussi montré que les effets cholestatiques induits par les médicaments pouvaient être médiés par une séquence d'événements hiérarchiques initiés par la modulation de l'activité ROCK/MLCK, suivis par un changement d'état de phosphorylation de MLC2 (Myosin Light Chain) et par conséquent, une modification de la chaîne lourde de myosine II altérant ainsi la contractilité des canalicules biliaires et la clairance de [³H]-TCA.

Ce schéma a été confirmé par la suite avec l'étude de 18 molécules cholestatiques ou non. L'altération de la voie ROCK/MLCK a été observée avec tous les médicaments cholestatiques testés, y compris ceux qui n'étaient pas des inhibiteurs de BSEP. Au total, les résultats sont favorables à la conclusion que les modifications de la dynamique des canalicules biliaires avec la participation de la voie ROCK/MLCK sont des marqueurs plus prédictifs et spécifiques que la clairance de TCA ou l'inhibition directe de BSEP, pour évaluer (« screener ») le potentiel cholestatique de nouvelles entités chimiques.

Pour confirmer et étendre ces conclusions, nous avons cherché à analyser les mécanismes impliqués dans les effets cytotoxiques et cholestatiques induits par les 4 principaux médicaments de la famille des antagonistes des récepteurs à l'endothéline toujours en utilisant les cellules HepaRG comme modèle expérimental. *In vivo*, le sitaxentan et le bosentan sont tous les deux connus pour leurs propriétés hépatotoxiques (Eriksson et al. 2011; Galiè et al. 2011; Lavelle et al. 2009), ce qui a du reste conduit au retrait du sitaxentan en 2010. Par ailleurs, des cas de cholestase ont été observés avec le bosentan (Fattinger et al. 2001). En revanche l'ambrisentan et le macitentan n'ont jusqu'à maintenant montré aucun signe d'hépatotoxicité ou de cholestase (Barst 2007; Takatsuki et al. 2013). Nos résultats ont montré qu'en plus d'avoir des structures chimiques identiques, le bosentan et le macitentan possédaient les mêmes propriétés cholestatiques *in vitro* (déformation des canalicules biliaires, inhibition de la clairance de TCA). Le sitaxentan a lui confirmé son potentiel hépatotoxique avec l'implication d'au moins un métabolite toxique, cytochrome P450-dépendant et l'ambrisentan n'a pas présenté d'hépatotoxicité majeure sur les cellules HepaRG. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'effet cholestatique du macitentan *in vitro*. Tout d'abord, la dose utilisée en clinique ainsi que la Cmax sont bien inférieures à celles des autres ERA. Les différences dans les propriétés physico-chimiques, pharmacocinétiques et dans le profil métabolique des patients peut aussi expliquer cette différence dans le mécanisme de toxicité. Enfin, le nombre d'études sur l'hépatotoxicité liée au macitentan est plutôt faible en raison du manque de recul sur la molécule (mise sur le marché en 2013) et le nombre de patients traités reste peu élevé pour le moment. A titre d'exemple qui souligne l'aspect novateur de cette famille thérapeutique, seuls le bosentan et l'ambrisentan sont disponibles en France et ils le sont uniquement en milieu hospitalier. D'après la pharmacie du CHU de Rennes, 87 patients sont suivis sous bosentan et 19 patients sous ambrisentan en rétrocession. Concernant le nombre de prescriptions de patients hospitalisés en 2015, il y en a eu 92 sous bosentan et 22 sous ambrisentan, ce qui en fait des médicaments très peu prescrits.

Dans le contexte actuel où l'on dénombre de plus en plus de cas de toxicité après la mise sur le marché des médicaments, la pharmacovigilance est donc tout à fait de rigueur dans la surveillance de leurs effets toxiques. Surtout dans les maladies orphelines comme la PAH, les médicaments sont souvent approuvés à un stade où il n'y a pas suffisamment d'informations sur la sécurité à long terme, en particulier en ce qui concerne les effets

secondaires rares. Les autorités doivent peser les avantages des nouveaux médicaments dans les maladies mortelles et rares contre les dommages potentiels causés par la toxicité de ces médicaments. Dans le cas des trois ERA sur le marché, les autorités européennes ont demandé la mise en œuvre de systèmes de surveillance post-marketing afin d'obtenir de plus amples informations sur la sécurité de ces médicaments après approbation. Le système de surveillance post-marketing pour le bosentan a été fermé comme prévu après avoir été mis en place pendant 30 mois afin de collecter des données auprès de 5000 patients, mais les bases de données respectives sont encore ouvertes pour le sitaxentan et l'ambrisentan. Pour le moment, les cas rapportés par Lavelle et al. 2009 nous rappellent que la surveillance hépatique doit rester partie intégrante de la thérapie des ERA (Hoepfer 2009). D'autres ERA sont actuellement en cours d'essais de phases II et III en particulier dans les pathologies à composante vasculaire. La plupart sont des ERA dits sélectifs vis-à-vis du récepteur ETA : atrasentan, avosentan, clazosentan, darusentan, avec un ERA mixte : le tezosentan (Battistini et al. 2006) et seront très certainement soumis à une surveillance étroite au regard du potentiel hépatotoxique des molécules déjà sur le marché.

En conclusion, c'est la première fois, qu'un test basé sur les mécanismes impliqués dans la dynamique des canalicules biliaires est décrit, permettant de déceler au plus tôt le caractère cholestatique d'une molécule. Pour le moment, un panel de 20 molécules pharmaceutiques, cholestatiques, hépatotoxiques ou inertes sur le foie ainsi que quelques composés chimiques non médicamenteux ont été étudiés et la concordance semble être de 100 %. Des études sont en cours afin de tester un plus grand nombre de molécules dans le but d'augmenter la robustesse de ce test. Cette approche semble par ailleurs être plus pertinente que le test d'inhibition du transporteur BSEP exprimé sur des vésicules d'insectes qui non seulement ne tient pas compte du métabolisme du composé testé mais présente également une grande variété de faux positifs et de faux négatifs. De même, une autre méthode consistant à évaluer le potentiel d'une molécule à altérer l'homéostasie des ABs en se basant sur la capacité à réduire la formation de l'urée dans des hépatocytes humains en conformation sandwich, a été récemment proposée (Chatterjee et al. 2014). Il s'agit d'un test fonctionnel des hépatocytes qui ne semble pas être d'une grande prédiction. Ces nouveaux marqueurs robustes (déformation des canalicules associée à des altérations de la voie de signalisation ROCK/MLCK), utilisés comme critères de base moléculaire et cellulaire dans la prédiction du potentiel cholestatique, pourraient servir à la définition d'un nouvel

AOP (Adverse Outcome Pathway) qui ne s'appuierait plus uniquement sur le stress oxydant ou sur la modulation des transporteurs hépatiques (Vinken et al. 2013) mais serait basé sur la dynamique des canalicules biliaires.

Si ce test devrait permettre de mieux identifier des molécules potentiellement cholestatiques, il ne peut pour autant prédire ou détecter une hépatotoxicité de type idiosyncratique qui reste un challenge pour les instances de santé. Néanmoins, il est possible d'évaluer l'influence d'une inflammation ou du métabolisme (interactions médicamenteuses) sur la réponse toxique. En revanche, l'influence du polymorphisme génétique, de pathologies hépatiques préexistantes ou encore de l'expression des gènes de type HLA, restent difficiles à considérer *in vitro*. Des réactions immunes sont souvent associées à une hépatotoxicité idiosyncratique. La co-culture de cellules HepaRG avec des cellules immunitaires ou inflammatoires devrait représenter une approche intéressante pour estimer l'influence de ces cellules sur l'induction d'une hépatotoxicité idiosyncratique par certains médicaments. Si de telles co-cultures sont difficiles à mettre en place en configuration 2D, elles devraient pouvoir l'être beaucoup plus aisément en 3D (sous forme de sphéroïdes ou préparées par bioprinting,...), comme l'indiquent certains résultats récents (Soldatow et al. 2013; Rose et al. 2016; Zeilinger et al. 2016; Nguyen et al. 2016).

Références

- Adelstein, R. S., Pato, M. D., Sellers, J. R., de Lanerolle, P. & Conti, M. A. Regulation of actin-myosin interaction by reversible phosphorylation of myosin and myosin kinase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 46 Pt 2, 921–928 (1982).
- Aleo, Michael D., Yi Luo, Rachel Swiss, Paul D. Bonin, David M. Potter, and Yvonne Will. 2014. Human Drug-Induced Liver Injury Severity Is Highly Associated with Dual Inhibition of Liver Mitochondrial Function and Bile Salt Export Pump. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 60 (3): 1015–22.
- Allen, Katryn, Hartmut Jaeschke, and Bryan L. Copple. 2011. Bile Acids Induce Inflammatory Genes in Hepatocytes. *The American Journal of Pathology* 178 (1): 175–86.
- Anderson, J. M. 1996. Leaky Junctions and Cholestasis: A Tight Correlation. *Gastroenterology* 110 (5): 1662–65.
- Anderson, Nora, and Jürgen Borlak. 2008. Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets in Steatosis and Steatohepatitis. *Pharmacological Reviews* 60 (3): 311–57.
- Aninat, Caroline, Amélie Piton, Denise Glaise, Typhen Le Charpentier, Sophie Langouët, Fabrice Morel, Christiane Guguen-Guillouzo, and André Guillouzo. 2006. Expression of Cytochromes P450, Conjugating Enzymes and Nuclear Receptors in Human Hepatoma HepaRG Cells. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 34 (1): 75–83.
- Ansele, John H., William R. Smith, Cassandra H. Perry, Robert L. St Claire, and Kenneth R. Brouwer. 2010. An In Vitro Assay to Assess Transporter-Based Cholestatic Hepatotoxicity Using Sandwich-Cultured Rat Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 38 (2): 276–80.
- Anthérieu, Sébastien, Pamela Bachour-El Azzi, Julie Dumont, Ziad Abdel-Razzak, Christiane Guguen-Guillouzo, Bernard Fromenty, Marie-Anne Robin, and André Guillouzo. 2013. Oxidative Stress Plays a Major Role in Chlorpromazine-Induced Cholestasis in Human HepaRG Cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 57 (4): 1518–29.
- Arikawa, K., Hicks, J. L. & Williams, D. S. Identification of actin filaments in the rhabdomeral microvilli of *Drosophila* photoreceptors. *J Cell Biol* 110, 1993–1998 (1990).
- Arrese, Marco, and Michael Trauner. 2003. Molecular Aspects of Bile Formation and Cholestasis. *Trends in Molecular Medicine* 9 (12): 558–64.
- Bachour-El Azzi, Pamela, Ahmad Sharanek, Ziad Abdel-Razzak, Sebastien Antherieu, Houssein Al-Attrache, Camille C. Savary, Sylvie Lepage, et al. 2014. Impact of Inflammation on Chlorpromazine-Induced Cytotoxicity and Cholestatic Features in HepaRG Cells. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 42 (9): 1556–66.
- Ballet, F. 1997. Hepatotoxicity in Drug Development: Detection, Significance and Solutions. *Journal of Hepatology* 26 Suppl 2: 26–36.
- Barst, Robyn J., Dunbar Ivy, Jasper Dingemans, Allison Widlitz, Kelly Schmitt, Aimee Doran, Deborah Bingaman, Ngoc Nguyen, Michael Gaitonde, and Paul L. M. van Giersbergen. 2003. Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy of Bosentan in Pediatric Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 73 (4): 372–82.
- Battistini, Bruno, Nathalie Berthiaume, Nicholas F. Kelland, David J. Webb, and Donald E. Kohan. 2006. Profile of Past and Current Clinical Trials Involving Endothelin Receptor Antagonists: The Novel ‘-Sentan’ Class of Drug. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 231 (6): 653–95.
- Bell, Lauren N., and Naga Chalasani. 2009. Epidemiology of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Seminars in Liver Disease* 29 (4): 337–47.

- Bénichou, C. 1990. Criteria of Drug-Induced Liver Disorders. Report of an International Consensus Meeting. *Journal of Hepatology* 11 (2): 272–76.
- Ben-Yehuda, Ori, David Pizzuti, Andrea Brown, Marcus Littman, Hunter Gillies, Noreen Henig, and Tobias Peschel. 2012. Long-Term Hepatic Safety of Ambrisentan in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 60 (1): 80–81.
- Bessemers, M., N. A. 't Hart, R. Tolba, B. M. Doorschodt, H. G. D. Leuvenink, R. J. Ploeg, T. Minor, and T. M. van Gulik. 2006. The Isolated Perfused Rat Liver: Standardization of a Time-Honoured Model. *Laboratory Animals* 40 (3): 236–46.
- Beuers, U., M. H. Nathanson, C. M. Isales, and J. L. Boyer. 1993. Tauroursodeoxycholic Acid Stimulates Hepatocellular Exocytosis and Mobilizes Extracellular Ca⁺⁺ Mechanisms Defective in Cholestasis. *The Journal of Clinical Investigation* 92 (6): 2984–93.
- Biologie Cellulaire et Moléculaire - Eduardo D. P. De Robertis, E. M. F. De Robertis - Google Livres. 2016. Accessed June 27.
- Biour, M., R. Poupon, J. D. Grangé, and O. Chazouillères. 2000. [Drug-induced hepatotoxicity. The 13th updated edition of the bibliographic database of drug-related liver injuries and responsible drugs]. *Gastroentérologie Clinique Et Biologique* 24 (11): 1052–91.
- Björkhem, I., and G. Eggertsen. 2001. Genes Involved in Initial Steps of Bile Acid Synthesis. *Current Opinion in Lipidology* 12 (2): 97–103.
- Björnsson, Einar, Elin I. Jacobsen, and Evangelos Kalaitzakis. 2012. Hepatotoxicity Associated with Statins: Reports of Idiosyncratic Liver Injury Post-Marketing. *Journal of Hepatology* 56 (2): 374–80.
- Boden, Guenther, Erez F. Scapa, Keishi Kanno, David E. Cohen, Margaret E. Brosnan, John T. Brosnan, Dominique Pessayre, et al. 2007. Metabolism. In *Textbook of Hepatology*, edited by Juan Rodés MD, Jean-Pierre Benhamou MD, Andres T. Blei MD, Jürg Reichen MD, and rio Rizzetto MD, 129–249. Blackwell Publishing Ltd.
- Bolli, Martin H., Christoph Boss, Christoph Binkert, Stephan Buchmann, Daniel Bur, Patrick Hess, Marc Iglarz, et al. 2012. The Discovery of N-[5-(4-Bromophenyl)-6-[2-[(5-Bromo-2-Pyrimidinyl)oxy]ethoxy]-4-Pyrimidinyl]-N'-Propylsulfamide (Macitentan), an Orally Active, Potent Dual Endothelin Receptor Antagonist. *Journal of Medicinal Chemistry* 55 (17): 7849–61.
- Bove, Kevin E., James E. Heubi, William F. Balistreri, and Kenneth D. R. Setchell. 2004. Bile Acid Synthetic Defects and Liver Disease: A Comprehensive Review. *Pediatric and Developmental Pathology: The Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 7 (4): 315–34.
- Brandon, Esther F. A., Christiaan D. Raap, Irma Meijerman, Jos H. Beijnen, and Jan H. M. Schellens. 2003. An Update on in Vitro Test Methods in Human Hepatic Drug Biotransformation Research: Pros and Cons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 189 (3): 233–46.
- Bull, L. N., M. J. van Eijk, L. Pawlikowska, J. A. DeYoung, J. A. Juijn, M. Liao, L. W. Klomp, et al. 1998. A Gene Encoding a P-Type ATPase Mutated in Two Forms of Hereditary Cholestasis. *Nature Genetics* 18 (3): 219–24.
- Cao, Jingsong, Liyue Huang, Yong Liu, Tim Hoffman, Bruno Stieger, Peter J. Meier, and Mary Vore. 2001. Differential Regulation of Hepatic Bile Salt and Organic Anion Transporters in Pregnant and Postpartum Rats and the Role of Prolactin. *Hepatology* 33 (1): 140–47.

- Cardell, L. O., R. Uddman, and L. Edvinsson. 1993. A Novel ETA-Receptor Antagonist, FR 139317, Inhibits Endothelin-Induced Contractions of Guinea-Pig Pulmonary Arteries, but Not Trachea. *British Journal of Pharmacology* 108 (2): 448–52.
- Castell, José V., Ramiro Jover, Celia P. Martínez-Jiménez, and María José Gómez-Lechón. 2006. Hepatocyte Cell Lines: Their Use, Scope and Limitations in Drug Metabolism Studies. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2 (2): 183–212.
- Cattori, Valentino, Jessica E. Montfoort, Bruno Stieger, Lukas Landmann, Dirk K. Meijer, Kaspar H. Winterhalter, Peter J. Meier, and Bruno Hagenbuch. 2001. Localization of Organic Anion Transporting Polypeptide 4 (Oatp4) in Rat Liver and Comparison of Its Substrate Specificity with Oatp1, Oatp2 and Oatp3. *Pflügers Archiv* 443 (2): 188–95.
- Cerec, Virginie, Denise Glaise, Delphine Garnier, Serban Morosan, Bruno Turlin, Bernard Drenou, Philippe Gripon, Dina Kremsdorf, Christiane Guguen-Guillouzo, and Anne Corlu. 2007. Transdifferentiation of Hepatocyte-like Cells from the Human Hepatoma HepaRG Cell Line through Bipotent Progenitor. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 45 (4): 957–67.
- CHALASANI, NAGA, and EINAR BJÖRNSSON. 2010. Risk Factors for Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury. *Gastroenterology* 138 (7): 2246–59.
- Channick, R. N., G. Simonneau, O. Sitbon, I. M. Robbins, A. Frost, V. F. Tapson, D. B. Badesch, et al. 2001. Effects of the Dual Endothelin-Receptor Antagonist Bosentan in Patients with Pulmonary Hypertension: A Randomised Placebo-Controlled Study. *Lancet (London, England)* 358 (9288): 1119–23.
- Chatterjee, Sagnik, Lysiane Richert, Patrick Augustijns, and Pieter Annaert. 2014. Hepatocyte-Based in Vitro Model for Assessment of Drug-Induced Cholestasis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 274 (1): 124–36.
- Chaumais, Marie-Camille, Christophe Guignabert, Laurent Savale, Xavier Jaïs, Athénaïs Boucly, David Montani, Gérald Simonneau, Marc Humbert, and Olivier Sitbon. 2015. Clinical Pharmacology of Endothelin Receptor Antagonists Used in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions* 15 (1): 13–26.
- Cheng, Ailan, and Steven L. Dixon. 2003. In Silico Models for the Prediction of Dose-Dependent Human Hepatotoxicity. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 17 (12): 811–23.
- Cheng, Hung Yuan, Patricia Holt Sackett, and Richard L. McCreery. 1978. Kinetics of Chlorpromazine Cation Radical Decomposition in Aqueous Buffers. *Journal of the American Chemical Society* 100 (3): 962–67.
- Chen, Jianbo, Wenping Deng, Junwei Wang, Yong Shao, Minglin Ou, and Min Ding. 2013. Primary Bile Acids as Potential Biomarkers for the Clinical Grading of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 122 (1): 5–8.
- Chen, Mengchun, Youting Zhang, Peipei Pan, Li Wang, Yunyun Zhan, Hui Jin, Mengmin Xia, et al. 2014. Effects of Cytochrome P450 2C9 Polymorphism on Bosentan Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 42 (11): 1820–25.
- Chen, Minjun, Ayako Suzuki, Jürgen Borlak, Raúl J. Andrade, and M. Isabel Lucena. 2015. Drug-Induced Liver Injury: Interactions between Drug Properties and Host Factors. *Journal of Hepatology* 63 (2): 503–14.

- Chen, S. J., Y. F. Chen, Q. C. Meng, J. Durand, V. S. Dicarlo, and S. Oparil. 1995. Endothelin-Receptor Antagonist Bosentan Prevents and Reverses Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 79 (6): 2122–31.
- Chiang, J. Y. 1998. Regulation of Bile Acid Synthesis. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 3 (February): d176–93.
- Chung KW, Han NI, Choi SW, Ahn BM, Yoon SK, Nam SW, Lee YS, Han JY, and Sun HS (2002) Increased microfilaments in hepatocytes and biliary ductular cells in cholestatic liver diseases. *J Korean Med Sci* 17:795–800.
- Claude, Nancy, Françoise Goldfain-Blanc, and André Guillouzo. 2009. La Place Des Méthodes in Silico, in Vitro, in Omic Dans L'évaluation de La Sécurité Des Médicaments. *Médecine/sciences* 25 (1): 105–10.
- Clozel, Martine, Volker Breu, Kaspar Burri, Jean-Marie Cassal, Walter Fischli, Gillian A. Gray, Georges Hirth, et al. 1993. Pathophysiological Role of Endothelin Revealed by the First Orally Active Endothelin Receptor Antagonist. *Nature* 365 (6448): 759–61.
- Clozel, M., and V. Breu. 1996. The Role of ETB Receptors in Normotensive and Hypertensive Rats as Revealed by the Non-Peptide Selective ETB Receptor Antagonist Ro 46-8443. *FEBS Letters* 383 (1-2): 42–45.
- Clozel, M., V. Breu, G. A. Gray, B. Kalina, B. M. Löffler, K. Burri, J. M. Cassal, G. Hirth, M. Müller, and W. Neidhart. 1994. Pharmacological Characterization of Bosentan, a New Potent Orally Active Nonpeptide Endothelin Receptor Antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 270 (1): 228–35.
- Cook, David, Dearn Brown, Robert Alexander, Ruth March, Paul Morgan, Gemma Satterthwaite, and Menelas N. Pangalos. 2014. Lessons Learned from the Fate of AstraZeneca's Drug Pipeline: A Five-Dimensional Framework. *Nature Reviews Drug Discovery* 13 (6): 419–31.
- Copple, Bryan, Hartmut Jaeschke, and Curtis Klaassen. 2010. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Cholestasis. *Seminars in Liver Disease* 30 (02): 195–204.
- Davenport, Anthony P., and Bruno Battistini. 2002. Classification of Endothelin Receptors and Antagonists in Clinical Development. *Clinical Science* (London, England: 1979) 103 Suppl 48 (August): 1S – 3S.
- Davies, S. E. 1997. Drugs and the Liver. *Current Diagnostic Pathology* 4 (3): 135–44.
- Dawson, Paul A., Tian Lan, and Anuradha Rao. 2009. Bile Acid Transporters. *Journal of Lipid Research* 50 (12): 2340–57.
- Dawson, Sarah, Simone Stahl, Nikki Paul, Jane Barber, and J. Gerald Kenna. 2012. In Vitro Inhibition of the Bile Salt Export Pump Correlates with Risk of Cholestatic Drug-Induced Liver Injury in Humans. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 40 (1): 130–38.
- de Abajo, Francisco J., Dolores Montero, Mariano Madurga, and Luis A. García Rodríguez. 2004. Acute and Clinically Relevant Drug-Induced Liver Injury: A Population Based Case-Control Study. *British Journal of Clinical Pharmacology* 58 (1): 71–80.
- Denson, L. A., E. Sturm, W. Echevarria, T. L. Zimmerman, M. Makishima, D. J. Mangelsdorf, and S. J. Karpen. 2001. The Orphan Nuclear Receptor, Shp, Mediates Bile Acid-Induced Inhibition of the Rat Bile Acid Transporter, Ntcp. *Gastroenterology* 121 (1): 140–47.
- Dhaun, Neeraj, Vanessa Melville, William Kramer, Fiona Stavros, Terrance Coyne, Suzanne Swan, Jane Goddard, and David J. Webb. 2007. The Pharmacokinetic Profile of

- Sitaxsentan, a Selective Endothelin Receptor Antagonist, in Varying Degrees of Renal Impairment. *British Journal of Clinical Pharmacology* 64 (6): 733–37.
- Dhillon, Sohita, and Gillian M. Keating. 2009. Bosentan: A Review of Its Use in the Management of Mildly Symptomatic Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Cardiovascular Drugs: Drugs, Devices, and Other Interventions* 9 (5): 331–50.
- Dingemanse, Jasper, Patricia N Sidharta, Willis C Maddrey, Lewis J Rubin, and Hani Mickail. 2014. Efficacy, Safety and Clinical Pharmacology of Macitentan in Comparison to Other Endothelin Receptor Antagonists in the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Expert Opinion on Drug Safety* 13 (3): 391–405.
- Donner, M. G., and D. Keppler. 2001. Up-Regulation of Basolateral Multidrug Resistance Protein 3 (Mrp3) in Cholestatic Rat Liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 34 (2): 351–59.
- Døssing, M., and J. Sonne. 1993. Drug-Induced Hepatic Disorders. Incidence, Management and Avoidance. *Drug Safety* 9 (6): 441–49.
- Dumont, Julie, Rozenn Jossé, Carine Lambert, Sébastien Anthérieu, Ludovic Le Hegarat, Caroline Aninat, Marie-Anne Robin, Christiane Guguen-Guillouzo, and André Guillouzo. 2010. Differential Toxicity of Heterocyclic Aromatic Amines and Their Mixture in Metabolically Competent HepaRG Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245 (2): 256–63.
- Dupuis, J., and M. M. Hoeper. 2008. Endothelin Receptor Antagonists in Pulmonary Arterial Hypertension. *The European Respiratory Journal* 31 (2): 407–15.
- Eguchi, Satoru, Yukio Hirata, Masaki Ihara, Mitsuo Yano, and Fumiaki Marumo. 1992. A Novel ETA Antagonist (BQ-123) Inhibits Endothelin-1-Induced Phosphoinositide Breakdown and DNA Synthesis in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *FEBS Letters* 302 (3): 243–46.
- Eriksson, Carl, Anders Gustavsson, Thomas Kronvall, and Curt Tysk. 2011. Hepatotoxicity by Bosentan in a Patient with Portopulmonary Hypertension: A Case-Report and Review of the Literature. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases: JGLD* 20 (1): 77–80.
- Erve, John C. L., Shawn Gauby, John W. Maynard, Mats A. Svensson, George Tonn, and Kevin P. Quinn. 2013. Bioactivation of Sitaxentan in Liver Microsomes, Hepatocytes, and Expressed Human P450s with Characterization of the Glutathione Conjugate by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* 26 (6): 926–36.
- Fahrmayr, C., J. König, D. Auge, M. Mieth, K. Münch, J. Segrestaa, T. Pfeifer, A. Treiber, and M. Fromm. 2013. Phase I and II Metabolism and MRP2-Mediated Export of Bosentan in a MDCKII-OATP1B1-CYP3A4-UGT1A1-MRP2 Quadruple-Transfected Cell Line. *British Journal of Pharmacology* 169 (1): 21–33.
- Faqi, Ali S. 2013. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development*. Academic Press.
- Farina, Annarita, Jean-Marc Dumonceau, Jean-Louis Frossard, Antoine Hadengue, Denis F. Hochstrasser, and Pierre Lescuyer. 2009. Proteomic Analysis of Human Bile from Malignant Biliary Stenosis Induced by Pancreatic Cancer. *Journal of Proteome Research* 8 (1): 159–69.
- Fattinger, K., C. Funk, M. Pantze, C. Weber, J. Reichen, B. Stieger, and P. J. Meier. 2001. The Endothelin Antagonist Bosentan Inhibits the Canalicular Bile Salt Export Pump: A Potential Mechanism for Hepatic Adverse Reactions. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 69 (4): 223–31.

- Flecknell, P. A. 1994. Refinement of Animal Use--Assessment and Alleviation of Pain and Distress. *Laboratory Animals* 28 (3): 222–31.
- Fouassier, Laura, Nils Kinnman, Guillaume Lefèvre, Elisabeth Lasnier, Colette Rey, Raoul Poupon, Ronald P. J. Oude Elferink, and Chantal Housset. 2002. Contribution of mrp2 in Alterations of Canalicular Bile Formation by the Endothelin Antagonist Bosentan. *Journal of Hepatology* 37 (2): 184–91.
- Fricker, G, L Landmann, and P J Meier. 1989. Extrahepatic Obstructive Cholestasis Reverses the Bile Salt Secretory Polarity of Rat Hepatocytes. *Journal of Clinical Investigation* 84 (3): 876–85.
- Frommer, K. W., and U. Müller-Ladner. 2008. Expression and Function of ETA and ETB Receptors in SSc. *Rheumatology* 47 (suppl 5): v27–28.
- Funk, C., C. Ponelle, G. Scheuermann, and M. Pantze. 2001. Cholestatic Potential of Troglitazone as a Possible Factor Contributing to Troglitazone-Induced Hepatotoxicity: In Vivo and in Vitro Interaction at the Canalicular Bile Salt Export Pump (Bsep) in the Rat. *Molecular Pharmacology* 59 (3): 627–35.
- Galiè, N., M. M. Hoepfer, J. S. R. Gibbs, and G. Simonneau. 2011. Liver Toxicity of Sitaxentan in Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal* 37 (2): 475–76.
- Gandolfi, A. Jay, Jayanthika Wijeweera, and Klaus Brendel. 1996. Use of Precision-Cut Liver Slices as an in Vitro Tool for Evaluating Liver Function. *Toxicologic Pathology* 24 (1).
- Garzel, Brandy, Hui Yang, Lei Zhang, Shiew-Mei Huang, James E. Polli, and Hongbing Wang. 2014. The Role of Bile Salt Export Pump Gene Repression in Drug-Induced Cholestatic Liver Toxicity. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 42 (3): 318–22.
- Geier, Andreas, Martin Wagner, Christoph G. Dietrich, and Michael Trauner. 2007. Principles of Hepatic Organic Anion Transporter Regulation during Cholestasis, Inflammation and Liver Regeneration. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1773 (3): 283–308.
- Gerets, H. H. J., K. Tilmant, B. Gerin, H. Chanteux, B. O. Depelchin, S. Dhalluin, and F. A. Atienzar. 2012. Characterization of Primary Human Hepatocytes, HepG2 Cells, and HepaRG Cells at the mRNA Level and CYP Activity in Response to Inducers and Their Predictivity for the Detection of Human Hepatotoxins. *Cell Biology and Toxicology* 28 (2): 69–87.
- Geri, G., and P. Cacoub. 2011. Granulomatose Hépatique. *La Revue de Médecine Interne* 32 (9): 560–66.
- Giaid, A., M. Yanagisawa, D. Langleben, R. P. Michel, R. Levy, H. Shennib, S. Kimura, T. Masaki, W. P. Duguid, and D. J. Stewart. 1993. Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. *The New England Journal of Medicine* 328 (24): 1732–39.
- Gillies, Hunter, Irene Lepist, Jia Hao, and Adrian Ray. 2012. Effect of Ambrisentan, Bosentan and Macitentan on Human Hepatic Uptake and Efflux Transporters. *European Respiratory Journal* 40 (Suppl 56): P952.
- Goldkind, Lawrence, and Loren Laine. 2006. A Systematic Review of NSAIDs Withdrawn from the Market due to Hepatotoxicity: Lessons Learned from the Bromfenac Experience. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 15 (4): 213–20.
- Gómez-Lechón, María José, Laia Tolosa, José V. Castell, and María Teresa Donato. 2010. Mechanism-Based Selection of Compounds for the Development of Innovative in Vitro Approaches to Hepatotoxicity Studies in the LIINTOP Project. *Toxicology in Vitro* 24 (7): 1879–89.

- González, Pablo M., Naissan Hussainzada, Peter W. Swaan, Alexander D. Mackerell, and James E. Polli. 2012. Putative Irreversible Inhibitors of the Human Sodium-Dependent Bile Acid Transporter (hASBT; SLC10A2) Support the Role of Transmembrane Domain 7 in Substrate Binding/translocation. *Pharmaceutical Research* 29 (7): 1821–31.
- Graf, J., A. Gautam, and J. L. Boyer. 1984. Isolated Rat Hepatocyte Couplets: A Primary Secretory Unit for Electrophysiologic Studies of Bile Secretory Function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (20): 6516–20.
- Grattagliano, Ignazio. 2009. Biochemical Mechanisms in Drug-Induced Liver Injury: Certainties and Doubts. *World Journal of Gastroenterology* 15 (39): 4865.
- Greek, Ray. 2014. The Ethical Implications for Humans in Light of the Poor Predictive Value of Animal Models. *International Journal of Clinical Medicine* 05 (16): 966–1005.
- Green, R. M., D. Beier, and J. L. Gollan. 1996. Regulation of Hepatocyte Bile Salt Transporters by Endotoxin and Inflammatory Cytokines in Rodents. *Gastroenterology* 111 (1): 193–98.
- Greupink, Rick, Sander B. Nabuurs, Barbara Zarzycka, Vivienne Verweij, Mario Monshouwer, Maarten T. Huisman, and Frans G. M. Russel. 2012. In Silico Identification of Potential Cholestasis-Inducing Agents via Modeling of Na(+)-Dependent Taurocholate Cotransporting Polypeptide Substrate Specificity. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 129 (1): 35–48.
- Gripon, Philippe, Sylvie Rumin, Stephan Urban, Jacques Le Seyec, Denise Glaise, Isabelle Cannie, Claire Guyomard, Josette Lucas, Christian Trepo, and Christiane Guguen-Guillouzo. 2002. Infection of a Human Hepatoma Cell Line by Hepatitis B Virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24): 15655–60.
- Guillouzo, A. 1998. Liver Cell Models in in Vitro Toxicology. *Environmental Health Perspectives* 106 Suppl 2 (April): 511–32.
- Guillouzo, André, Francelyne Marano, and Monique Adolphe. 1995. *Toxicologie cellulaire in vitro: méthodes et applications*. Ed. INSERM.
- Gupta, Suresh K., Amit Saxena, Uma Singh, and Dharamvir S. Arya. 2005. Bosentan, the Mixed ETA-ETB Endothelin Receptor Antagonist, Attenuated Oxidative Stress after Experimental Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Molecular and Cellular Biochemistry* 275 (1-2): 67–74.
- Halilbasic, Emina, Anna Baghdasaryan, and Michael Trauner. 2013. Nuclear Receptors as Drug Targets in Cholestatic Liver Diseases. *Clinics in Liver Disease* 17 (2): 161–89.
- Hanawa, Naoko, Mie Shinohara, Behnam Saberi, William A. Gaarde, Derick Han, and Neil Kaplowitz. 2008. Role of JNK Translocation to Mitochondria Leading to Inhibition of Mitochondria Bioenergetics in Acetaminophen-Induced Liver Injury. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (20): 13565–77.
- Hartman, J. Craig, Kenneth Brouwer, Arun Mandagere, Lawrence Melvin, and Richard Gorczynski. 2010. Evaluation of the Endothelin Receptor Antagonists Ambrisentan, Darusentan, Bosentan, and Sitaxsentan as Substrates and Inhibitors of Hepatobiliary Transporters in Sandwich-Cultured Human Hepatocytes. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88 (6): 682–91.
- Hillaire, Sophie, Dominique Cazals, and Dominique Valla. 2008. *Les maladies vasculaires du foie en dehors des atteintes des gros vaisseaux*.

- Hirano M, Maeda K, Hayashi H, Kusuhara H, and Sugiyama Y (2005) Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 314:876–882.
- Hoeper, M. M. 2009. Liver Toxicity: The Achilles' Heel of Endothelin Receptor Antagonist Therapy? *European Respiratory Journal* 34 (3): 529–30.
- Holt, Michael P., and Cynthia Ju. 2006. Mechanisms of Drug-Induced Liver Injury. *The AAPS Journal* 8 (1): E48–54.
- Huggins, J. P., J. T. Pelton, and R. C. Miller. 1993. The Structure and Specificity of Endothelin Receptors: Their Importance in Physiology and Medicine. *Pharmacology & Therapeutics* 59 (1): 55–123.
- Hynynen, Meri M., and Raouf A. Khalil. 2006. The Vascular Endothelin System in Hypertension--Recent Patents and Discoveries. *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* 1 (1): 95–108.
- Ichai, Philippe, and Didier Samuel. 2008. Etiology and Prognosis of Fulminant Hepatitis in Adults. *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 14 Suppl 2 (October): S67–79.
- Imanari H, Kuroda H, and Tamura K (1981) Microfilaments around the bile canaliculi in patients with intrahepatic cholestasis. *Gastroenterol Jpn* 16:168–173.
- Kathleen M. Giacomini, Shiew-Mei Huang, Donald J. Tweedie, Leslie Z. Benet, Kim L. R. Brouwer, Xiaoyan Chu, et al. 2010. International Transporter Consortium, Membrane Transporters in Drug Development. *Nature Reviews. Drug Discovery* 9 (3): 215–36.
- Jacquemin, E. 2001. Role of Multidrug Resistance 3 Deficiency in Pediatric and Adult Liver Disease: One Gene for Three Diseases. *Seminars in Liver Disease* 21 (4): 551–62.
- Jaeschke, Hartmut, Gregory J. Gores, Arthur I. Cederbaum, Jack A. Hinson, Dominique Pessayre, and John J. Lemasters. 2002. Mechanisms of Hepatotoxicity. *Toxicological Sciences* 65 (2): 166–76.
- Jemnitz, Katalin, Zsuzsa Veres, Monika Szabo, Zsolt Baranyai, Ferenc Jakab, and Laszlo Vereczkey. 2012. Differential Inhibitory Effect of Cyclosporin A and Bosentan on Taurocholate Uptake in Human and Rat Hepatocytes as a Function of Culturing Time. *Toxicology in Vitro* 26 (1): 174–81.
- John E. Koerner. 07112001. Bosentan : Overall Summary and Evaluation OF PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS, TOXICOKINETICS AND TOXICOLOGY. http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3775b2_07_PharmToxReview.htm.
- Josse, R., C. Aninat, D. Glaise, J. Dumont, V. Fessard, F. Morel, J.-M. Poul, C. Guguen-Guillouzo, and A. Guillouzo. 2008. Long-Term Functional Stability of Human HepaRG Hepatocytes and Use for Chronic Toxicity and Genotoxicity Studies. *Drug Metabolism and Disposition* 36 (6): 1111–18.
- Jossé, Rozenn, Alexandra Rogue, Elisabeth Lorge, and André Guillouzo. 2012. An Adaptation of the Human HepaRG Cells to the in Vitro Micronucleus Assay. *Mutagenesis* 27 (3): 295–304.
- Kanebratt, K. P., and T. B. Andersson. 2008. Evaluation of HepaRG Cells as an in Vitro Model for Human Drug Metabolism Studies. *Drug Metabolism and Disposition* 36 (7): 1444–52.
- Kast, Heidi R., Bryan Goodwin, Paul T. Tarr, Stacey A. Jones, Andrew M. Anisfeld, Catherine M. Stoltz, Peter Tontonoz, Steve Kliewer, Timothy M. Willson, and Peter A. Edwards.

2002. Regulation of Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (ABCC2) by the Nuclear Receptors Pregnane X Receptor, Farnesoid X-Activated Receptor, and Constitutive Androstane Receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (4): 2908–15.
- Keitel, Verena, Martin Burdelski, Ulrich Warskulat, Thomas Kühlkamp, Dietrich Keppler, Dieter Häussinger, and Ralf Kubitz. 2005. Expression and Localization of Hepatobiliary Transport Proteins in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 41 (5): 1160–72.
- Kemp, Daniel C., Maciej J. Zamek-Gliszczynski, and Kim L. R. Brouwer. 2005. Xenobiotics Inhibit Hepatic Uptake and Biliary Excretion of Taurocholate in Rat Hepatocytes. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 83 (2): 207–14.
- Kenna, J. Gerry. 2014. Current Concepts in Drug-Induced Bile Salt Export Pump (BSEP) Interference. *Current Protocols in Toxicology / Editorial Board, Mahin D. Maines* (editor-in-Chief) ... [et Al.] 61: 23.7.1–15.
- Kenyon, Kenneth W., and Jean M. Nappi. 2003. Bosentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *The Annals of Pharmacotherapy* 37 (7-8): 1055–62.
- Keppler, D., and J. König. 2000. Hepatic Secretion of Conjugated Drugs and Endogenous Substances. *Seminars in Liver Disease* 20 (3): 265–72.
- Kholdani, Cyrus A, Wassim H Fares, and Terence K Trow. 2014. Macitentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Vascular Health and Risk Management* 10 (November): 665–73.
- Klabunde R (2011) *Cardiovascular Physiology Concepts*, Lippincott Williams & Wilkins.
- Knowles, Sandra R, Jack Uetrecht, and Neil H Shear. 2000. Idiosyncratic Drug Reactions: The Reactive Metabolite Syndromes. *The Lancet* 356 (9241): 1587–91.
- Köck, K, and K L R Brouwer. 2012. A Perspective on Efflux Transport Proteins in the Liver. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 92 (5): 599–612.
- Kohan, Donald E., Noreen F. Rossi, Edward W. Inscho, and David M. Pollock. 2011. Regulation of Blood Pressure and Salt Homeostasis by Endothelin. *Physiological Reviews* 91 (1): 1–77.
- Kola, Ismail, and John Landis. 2004. Can the Pharmaceutical Industry Reduce Attrition Rates? *Nature Reviews Drug Discovery* 3 (8): 711–16.
- Kosters, Astrid, and Saul J. Karpen. 2010. The Role of Inflammation in Cholestasis – Clinical and Basic Aspects. *Seminars in Liver Disease* 30 (2): 186–94.
- Kostrubsky, S. E. 2005. Inhibition of Hepatobiliary Transport as a Predictive Method for Clinical Hepatotoxicity of Nefazodone. *Toxicological Sciences* 90 (2): 451–59.
- Kramer, Jeffrey A., John E. Sagartz, and Dale L. Morris. 2007. The Application of Discovery Toxicology and Pathology towards the Design of Safer Pharmaceutical Lead Candidates. *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (8): 636–49.
- Kshirsagar AV, Bang H, Bomback AS, Vupputuri S, Shoham DA, Kern LM, et al. A simple algorithm to predict incident kidney disease. *Arch Intern Med.* 2008;168(22):2466–73.
- Larrey, Dominique. 1995. Prescription Des médicaments En Cas de Maladies Du Foie. *Hépatogastro & Oncologie Digestive* 2 (6): 519–25.
- Lasser KE, Allen PD, Woolhandler SJ, Himmelstein DU, Wolfe SM, and Bor DH. 2002. Timing of New Black Box Warnings and Withdrawals for Prescription Medications. *JAMA* 287 (17): 2215–20.

- Lausecker, B., B. Hess, G. Fischer, M. Mueller, and G. Hopfgartner. 2000. Simultaneous Determination of Bosentan and Its Three Major Metabolites in Various Biological Matrices and Species Using Narrow Bore Liquid Chromatography with Ion Spray Tandem Mass Spectrometric Detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 749 (1): 67–83.
- Lavelle, A., R. Sugrue, G. Lawler, N. Mulligan, B. Kelleher, D. M. Murphy, and S. P. Gaine. 2009. Sitaxentan-Induced Hepatic Failure in Two Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *European Respiratory Journal* 34 (3): 770–71.
- Lee, John, and James L. Boyer. 2000. Molecular Alterations in Hepatocyte Transport Mechanisms.
- Lee, William M. 2003. Drug-Induced Hepatotoxicity. *The New England Journal of Medicine* 349 (5): 474–85.
- Le Gall, J. Y., A. Guillouzo, D. Glaise, Y. Deugnier, M. Messner, and M. Bourel. 1980. Perhexiline Maleate Toxicity on Human Liver Cell Lines. *Gut* 21 (11): 977–84.
- Lepist, Eve-Irene, Hunter Gillies, William Smith, Jia Hao, Cassandra Hubert, Robert L. St Claire III, Kenneth R. Brouwer, and Adrian S. Ray. 2014. Evaluation of the Endothelin Receptor Antagonists Ambrisentan, Bosentan, Macitentan, and Sitaxentan as Hepatobiliary Transporter Inhibitors and Substrates in Sandwich-Cultured Human Hepatocytes. *PLoS One* 9 (1): e87548.
- Leslie, E. M., P. B. Watkins, R. B. Kim, and K. L. R. Brouwer. 2007. Differential Inhibition of Rat and Human Na⁺-Dependent Taurocholate Cotransporting Polypeptide (NTCP/SLC10A1) by Bosentan: A Mechanism for Species Differences in Hepatotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321 (3): 1170–78.
- Liu, Xingrong, Kim L. R. Brouwer, Liang-Sheng L. Gan, Kenneth R. Brouwer, Bruno Stieger, Peter J. Meier, Kenneth L. Audus, and Edward L. LeCluyse. n.d. Partial Maintenance of Taurocholate Uptake by Adult Rat Hepatocytes Cultured in a Collagen Sandwich Configuration. *Pharmaceutical Research* 15 (10): 1533–39.
- Liu, Xuemei, Liang He, Bruce Dinger, Larry Stensaas, and Salvatore Fidone. 2012. Effect of Endothelin Receptor Antagonist Bosentan on Chronic Hypoxia-Induced Inflammation and Chemoafferent Neuron Adaptation in Rat Carotid Body. *High Altitude Medicine & Biology* 13 (3): 209–16.
- Llerena, Adrián, Pedro Dorado, and Eva M. Peñas-Lledó. 2009. Pharmacogenetics of Debrisoquine and Its Use as a Marker for CYP2D6 Hydroxylation Capacity. *Pharmacogenomics* 10 (1): 17–28.
- Lucena, M. Isabel, Raúl J. Andrade, Neil Kaplowitz, Miren García-Cortes, M. Carmen Fernández, Manuel Romero-Gomez, Miguel Bruguera, et al. 2009. Phenotypic Characterization of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury: The Influence of Age and Sex. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49 (6): 2001–9.
- Luster, M. I., D. R. Germolec, T. Yoshida, F. Kayama, and M. Thompson. 1994. Endotoxin-Induced Cytokine Gene Expression and Excretion in the Liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 19 (2): 480–88.
- MacDonald, James S., and Richard T. Robertson. 2009. Toxicity Testing in the 21st Century: A View from the Pharmaceutical Industry. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 110 (1): 40–46.
- Maher, Jonathan M., Matthew Z. Dieter, Lauren M. Aleksunes, Angela L. Slitt, Grace Guo, Yuji Tanaka, George L. Scheffer, et al. 2007. Oxidative and Electrophilic Stress Induces Multidrug Resistance-Associated Protein Transporters via the Nuclear Factor- κ B.

- Related Factor-2 Transcriptional Pathway. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 46 (5): 1597–1610.
- Mano, Yuji, Takashi Usui, and Hidetaka Kamimura. 2007. Effects of Bosentan, an Endothelin Receptor Antagonist, on Bile Salt Export Pump and Multidrug Resistance-associated Protein 2. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 28 (1): 13–18.
- Masubuchi, Noriko, Masahiro Sugihara, Tomonori Sugita, Katsushi Amano, Masanori Nakano, and Tomokazu Matsuura. 2015. Oxidative Stress Markers, Secondary Bile Acids and Sulfated Bile Acids Classify the Clinical Liver Injury Type: Promising Diagnostic Biomarkers for Cholestasis. *Chemico-Biological Interactions*, August.
- McDowell Torres, Dawn, Robert D. Stevens, and Ahmet Gurakar. 2010. Acute Liver Failure. *Gastroenterology & Hepatology* 6 (7): 444–50.
- McGill, Mitchell R., and Hartmut Jaeschke. 2013. Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharmaceutical Research* 30 (9): 2174–87.
- McGill, Mitchell R., Hui-Min Yan, Anup Ramachandran, Gordon J. Murray, Douglas E. Rollins, and Hartmut Jaeschke. 2011. HepaRG Cells: A Human Model to Study Mechanisms of Acetaminophen Hepatotoxicity. *Hepatology* 53 (3): 974–82.
- McGinnity, Dermot F., George Zhang, Jane R. Kenny, Geraldine A. Hamilton, Sara Otmani, Karen R. Stams, Suzette Haney, Patrick Brassil, David M. Stresser, and Robert J. Riley. 2009. Evaluation of Multiple in Vitro Systems for Assessment of CYP3A4 Induction in Drug Discovery: Human Hepatocytes, Pregnane X Receptor Reporter Gene, and Fa2N-4 and HepaRG Cells. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 37 (6): 1259–68.
- Megarbane, B., N. Deye, and F. Baud. 2007. Foie toxique : mécanismes lésionnels et thérapeutiques pharmacologiques spécifiques. *Réanimation* 16 (7-8): 632–42.
- Morgan, Ryan E., Michael Trauner, Carlo J. van Staden, Paul H. Lee, Bharath Ramachandran, Michael Eschenberg, Cynthia A. Afshari, Charles W. Qualls, Ruth Lightfoot-Dunn, and Hisham K. Hamadeh. 2010. Interference with Bile Salt Export Pump Function Is a Susceptibility Factor for Human Liver Injury in Drug Development. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 118 (2): 485–500.
- Morgan, Ryan E., Carlo J. van Staden, Yuan Chen, Natarajan Kalyanaraman, Jackson Kalanzi, Robert T. Dunn, Cynthia A. Afshari, and Hisham K. Hamadeh. 2013. A Multifactorial Approach to Hepatobiliary Transporter Assessment Enables Improved Therapeutic Compound Development. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 136 (1): 216–41.
- Nathanson, M. H., and J. L. Boyer. 1991. Mechanisms and Regulation of Bile Secretion. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 14 (3): 551–66.
- Nathanson, M. H., and S. F. Schlosser. 1996. Calcium Signaling Mechanisms in Liver in Health and Disease. *Progress in Liver Diseases* 14: 1–27.
- Navarro, Victor J., and John R. Senior. 2006. Drug-Related Hepatotoxicity. *The New England Journal of Medicine* 354 (7): 731–39.
- Nguyen, Deborah G., Juergen Funk, Justin B. Robbins, Candace Crogan-Grundy, Sharon C. Presnell, Thomas Singer, and Adrian B. Roth. 2016. Bioprinted 3D Primary Liver Tissues Allow Assessment of Organ-Level Response to Clinical Drug Induced Toxicity In Vitro. *PLOS ONE* 11 (7): e0158674.
- Oshio, C., and M. J. Phillips. 1981. Contractility of Bile Canaliculi: Implications for Liver Function. *Science* (New York, N.Y.) 212 (4498): 1041–42.

- Pedersen, Jenny M., Pär Matsson, Christel A. S. Bergström, Janet Hoogstraate, Agneta Norén, Edward L. LeCluyse, and Per Artursson. 2013. Early Identification of Clinically Relevant Drug Interactions with the Human Bile Salt Export Pump (BSEP/ABCB11). *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 136 (2): 328–43.
- Perez, Maria J, and Oscar Briz. 2009. Bile-Acid-Induced Cell Injury and Protection. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 15 (14): 1677–89.
- Pessayre, D., A. Mansouri, D. Haouzi, and B. Fromenty. 1999. Hepatotoxicity due to Mitochondrial Dysfunction. *Cell Biology and Toxicology* 15 (6): 367–73.
- Phillips, M. J., M. Oda, V. D. Edwards, G. R. Greenberg, and K. N. Jeejeebhoy. 1974. Ultrastructural and Functional Studies of Cultured Hepatocytes. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 31 (5): 533–42.
- Phillips, M. J., M. Oda, E. Mak, M. M. Fisher, and K. N. Jeejeebhoy. 1975. Microfilament Dysfunction as a Possible Cause of Intrahepatic Cholestasis. *Gastroenterology* 69 (1): 48–58.
- Phillips, M. J., S. Poucell, and M. Oda. 1986. Mechanisms of Cholestasis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 54 (6): 593–608.
- Popper, H., and F. Schaffner. 1970. Pathophysiology of Cholestasis. *Human Pathology* 1 (1): 1–24.
- Qiu, Xi, Yueping Zhang, Tongtong Liu, Hong Shen, Yongling Xiao, Maureen J. Bourner, Jennifer R. Pratt, et al. 2016. Disruption of BSEP Function in HepaRG Cells Alters Bile Acid Disposition and Is a Susceptive Factor to Drug-Induced Cholestatic Injury. *Molecular Pharmaceutics* 13 (4): 1206–16.
- Rafikova, Olga, Ruslan Rafikov, Sanjiv Kumar, Shruti Sharma, Saurabh Aggarwal, Frank Schneider, Danny Jonigk, Stephen M. Black, and Stevan P. Tofovic. 2013. Bosentan Inhibits Oxidative and Nitrosative Stress and Rescues Occlusive Pulmonary Hypertension. *Free Radical Biology & Medicine* 56 (March): 28–43.
- Raja, Shahzad G. 2010. Macitentan, a Tissue-Targeting Endothelin Receptor Antagonist for the Potential Oral Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)* 11 (9): 1066–73.
- Reshetnyak, Vasiliy Ivanovich. 2013. Physiological and Molecular Biochemical Mechanisms of Bile Formation. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 19 (42): 7341–60.
- Ribeiro, Mariana Ponte Cardoso, Armanda Emanuela Castro e Santos, and José Barata Antunes Custódio. 2015. Mitochondrial Dysfunction on the Toxic Effects of Anticancer Agents— From Lab Bench to Bedside. In *Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment*, edited by Ana Cristina Andrezza and Gustavo Scola. InTech.
- Richmond J. The 3Rs—Past, present and future. *Scand J Lab Anim Sci* 2000, 27, 84-92
- Ridlon, Jason M., Dae-Joong Kang, and Phillip B. Hylemon. 2006. Bile Salt Biotransformations by Human Intestinal Bacteria. *Journal of Lipid Research* 47 (2): 241–59.
- Roberts, Kari E, and Ioana R Preston. 2009. Safety and Tolerability of Bosentan in the Management of Pulmonary Arterial Hypertension. *Drug Design, Development and Therapy* 3 (September): 111–18.
- Rogue, Alexandra, Carine Lambert, Catherine Spire, Nancy Claude, and André Guillouzo. 2012. Interindividual Variability in Gene Expression Profiles in Human Hepatocytes and Comparison with HepaRG Cells. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 40 (1): 151–58.

- Rose, Kelly A., Natalie S. Holman, Angela M. Green, Melvin E. Andersen, and Edward L. LeCluyse. 2016. Co-Culture of Hepatocytes and Kupffer Cells as an In Vitro Model of Inflammation and Drug-Induced Hepatotoxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105 (2): 950–64.
- Roustit, M., X. Fonrose, D. Montani, B. Girerd, F. Stanke-Labesque, N. Gonnet, M. Humbert, and J.-L. Cracowski. 2014. CYP2C9, SLCO1B1, SLCO1B3, and ABCB11 Polymorphisms in Patients with Bosentan-Induced Liver Toxicity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 95 (6): 583–85.
- Russell, David W. 2003. The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annual Review of Biochemistry* 72: 137–74.
- Russmann, Stefan, Gerd A Kullak-Ublick, and Ignazio Grattagliano. 2009. Current Concepts of Mechanisms in Drug-Induced Hepatotoxicity. *Current Medicinal Chemistry* 16 (23): 3041–53.
- Safer, D. J., J. M. Zito, and J. E. Gardner. 2001. Pemoline Hepatotoxicity and Postmarketing Surveillance. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 40 (6): 622–29.
- Schadt, S., S. Simon, S. Kustermann, F. Boess, C. McGinnis, A. Brink, R. Lieven, et al. 2015. Minimizing DILI Risk in Drug Discovery - A Screening Tool for Drug Candidates. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 30 (1 Pt B): 429–37.
- Senior, John R. 2008. What Is Idiosyncratic Hepatotoxicity? What Is It Not? *Hepatology (Baltimore, Md.)* 47 (6): 1813–15.
- Seo, B., B. S. Oemar, R. Siebenmann, L. von Segesser, and T. F. Lüscher. 1994. Both ETA and ETB Receptors Mediate Contraction to Endothelin-1 in Human Blood Vessels. *Circulation* 89 (3): 1203–8.
- Serafim, Karla G. G., Suelen A. Navarro, Ana C. Zarpelon, Felipe A. Pinho-Ribeiro, Victor Fattori, Thiago M. Cunha, Jose C. Alves-Filho, Fernando Q. Cunha, Rubia Casagrande, and Waldiceu A. Verri. 2015. Bosentan, a Mixed Endothelin Receptor Antagonist, Inhibits Superoxide Anion-Induced Pain and Inflammation in Mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 388 (11): 1211–21.
- Sgro, Catherine, François Clinard, Kader Ouazir, Henry Chanay, Christian Allard, Christian Guilleminet, Claude Lenoir, Alain Lemoine, and Patrick Hillon. 2002. Incidence of Drug-Induced Hepatic Injuries: A French Population-Based Study. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 36 (2): 451–55.
- Shifeng, Huang, Wang Danni, Chen Pu, Yang Ping, Cao Ju, and Zhang Liping. 2013. Circulating Liver-Specific miR-122 as a Novel Potential Biomarker for Diagnosis of Cholestatic Liver Injury. *PloS One* 8 (9): e73133.
- Soldatow, Valerie Y., Edward L. LeCluyse, Linda G. Griffith, and Ivan Rusyn. 2013. In Vitro Models for Liver Toxicity Testing. *Toxicology Research* 2 (1): 23–39.
- Soroka, Carol J., Albert Mennone, Lee R. Hagey, Nazzareno Ballatori, and James L. Boyer. 2010. Mouse Organic Solute Transporter α Deficiency Enhances Renal Excretion of Bile Acids and Attenuates Cholestasis. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (1): 181–90.
- Sponholz, Christoph, Katja Matthes, Dina Rupp, Wolf Backaus, Sebastian Klammt, Diana Karailieva, Astrid Bauschke, et al. 2015. Molecular Adsorbent Recirculating System and Single-Pass Albumin Dialysis in Liver Failure – a Prospective, Randomised Crossover Study. *Critical Care* 20.

- Stavros, Fiona, William G Kramer, and Martin R Wilkins. 2010. The Effects of Sitaxentan on Sildenafil Pharmacokinetics and Pharmacodynamics in Healthy Subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology* 69 (1): 23–26.
- Stellman, Jeanne Mager. 2000. *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail*. International Labour Organization.
- Stepan, Antonia F., Daniel P. Walker, Jonathan Bauman, David A. Price, Thomas A. Baillie, Amit S. Kalgutkar, and Michael D. Aleo. 2011. Structural Alert/Reactive Metabolite Concept as Applied in Medicinal Chemistry to Mitigate the Risk of Idiosyncratic Drug Toxicity: A Perspective Based on the Critical Examination of Trends in the Top 200 Drugs Marketed in the United States. *Chemical Research in Toxicology* 24 (9): 1345–1410.
- Stieger, B., K. Fattinger, J. Madon, G. A. Kullak-Ublick, and P. J. Meier. 2000. Drug- and Estrogen-Induced Cholestasis through Inhibition of the Hepatocellular Bile Salt Export Pump (Bsep) of Rat Liver. *Gastroenterology* 118 (2): 422–30.
- Stieger, Bruno. 2010. Role of the Bile Salt Export Pump, BSEP, in Acquired Forms of Cholestasis. *Drug Metabolism Reviews* 42 (3): 437–45.
- Susukida, Takeshi, Shuichi Sekine, Mayuka Nozaki, Mayuko Tokizono, and Kousei Ito. 2015. Prediction of the Clinical Risk of Drug-Induced Cholestatic Liver Injury Using an In Vitro Sandwich Cultured Hepatocyte Assay. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 43 (11): 1760–68.
- Susukida, Takeshi, Shuichi Sekine, Mayuka Nozaki, Mayuko Tokizono, Kumiko Oizumi, Toshiharu Horie, and Kousei Ito. 2016. Establishment of a Drug-Induced, Bile Acid-Dependent Hepatotoxicity Model Using HepaRG Cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105 (4): 1550–60.
- Szabo, Monika, Zsuzsa Veres, Zolt Baranyai, Ferenc Jakab, and Katalin Jemnitz. 2013. Comparison of Human Hepatoma HepaRG Cells with Human and Rat Hepatocytes in Uptake Transport Assays in Order to Predict a Risk of Drug Induced Hepatotoxicity. *PLOS ONE* 8 (3): e59432.
- Takatsuki, Shinichi, Erika B. Rosenzweig, Warren Zuckerman, Daniela Brady, Michelle Calderbank, and D. Dunbar Ivy. 2013. Clinical Safety, Pharmacokinetics, and Efficacy of Ambrisentan Therapy in Children with Pulmonary Arterial Hypertension. *Pediatric Pulmonology* 48 (1): 27–34.
- Teng, Shirley, and Micheline Piquette-Miller. 2008. Regulation of Transporters by Nuclear Hormone Receptors: Implications during Inflammation. *Molecular Pharmaceutics* 5 (1): 67–76.
- Thibault, N., J. R. Claude, and F. Ballet. 1992. Actin Filament Alteration as a Potential Marker for Cholestasis: A Study in Isolated Rat Hepatocyte Couplets. *Toxicology* 73 (3): 269–79.
- Trauner, M. 1997. Molecular Alterations of Canalicular Transport Systems in Experimental Models of Cholestasis: Possible Functional Correlations. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 70 (4): 365–78.
- Trauner, M., P. J. Meier, and J. L. Boyer. 1998. Molecular Pathogenesis of Cholestasis. *The New England Journal of Medicine* 339 (17): 1217–27.
- Treiber, Alexander, Päivi Äänismaa, Ruben de Kanter, Stephane Delahaye, Marianne Treher, Patrick Hess, and Patricia Sidharta. 2014. Macitentan Does Not Interfere with Hepatic Bile Salt Transport. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 350 (1): 130–43.

- Treiber, Alexander, Ralph Schneiter, Stephane Delahaye, and Martine Clozel. 2004. Inhibition of Organic Anion Transporting Polypeptide-Mediated Hepatic Uptake Is the Major Determinant in the Pharmacokinetic Interaction between Bosentan and Cyclosporin A in the Rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308 (3): 1121–29.
- Treiber, A., R. Schneiter, S. Hausler, and B. Stieger. 2007. Bosentan Is a Substrate of Human OATP1B1 and OATP1B3: Inhibition of Hepatic Uptake as the Common Mechanism of Its Interactions with Cyclosporin A, Rifampicin, and Sildenafil. *Drug Metabolism and Disposition* 35 (8): 1400–1407.
- Uetrecht, Jack. 2009. *Adverse Drug Reactions*. Springer Science & Business Media.
- Valla, D-C. 2013. Cholestase. *Hépto-Gastro et Oncologie Digestive* 20 (8): 618-27
- Van Mil, Saskia W. C., Alexandra Milona, Peter H. Dixon, Roman Mullenbach, Victoria L. Geenes, Jenny Chambers, Vasylyna Shevchuk, et al. 2007. Functional Variants of the Central Bile Acid Sensor FXR Identified in Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Gastroenterology* 133 (2): 507–16.
- Vinken, Mathieu, Brigitte Landesmann, Marina Goumenou, Stefanie Vinken, Imran Shah, Hartmut Jaeschke, Catherine Willett, Maurice Whelan, and Vera Rogiers. 2013. Development of an Adverse Outcome Pathway from Drug-Mediated Bile Salt Export Pump Inhibition to Cholestatic Liver Injury. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 136 (1): 97–106.
- Wagner, Martin, Gernot Zollner, and Michael Trauner. 2009. New Molecular Insights into the Mechanisms of Cholestasis. *Journal of Hepatology* 51 (3): 565–80.
- Walgren, Jennie L., Michael D. Mitchell, and David C. Thompson. 2005. Role of Metabolism in Drug-Induced Idiosyncratic Hepatotoxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 35 (4): 325–61.
- Wang, K. 2014. Molecular Mechanisms of Hepatic Apoptosis. *Cell Death & Disease* 5 (1): e996.
- Wang, Yan-Dong, Wei-Dong Chen, Meihua Wang, Donna Yu, Barry M. Forman, and Wendong Huang. 2008. Farnesoid X Receptor Antagonizes Nuclear Factor kappaB in Hepatic Inflammatory Response. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 48 (5): 1632–43.
- Watanabe N, Tsukada N, Smith CR, and Phillips MJ (1991) Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J Cell Biol* 113:1069–1080.
- Watanabe, T., Hosoya, H. & Yonemura, S. Regulation of myosin II dynamics by phosphorylation and dephosphorylation of its light chain in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 18, 605–616 (2007).
- Watkins, Paul B., and Leonard B. Seeff. 2006. Drug-Induced Liver Injury: Summary of a Single Topic Clinical Research Conference. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 43 (3): 618–31.
- Weber, C., R. Schmitt, H. Birnboeck, G. Hopfgartner, H. Eggers, J. Meyer, S. van Marle, H. W. Viischer, and J. H. Jonkman. 1999. Multiple-Dose Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Bosentan, an Endothelin Receptor Antagonist, in Healthy Male Volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology* 39 (7): 703–14.
- Westerink, Walter M. A., and Willem G. E. J. Schoonen. 2007. Cytochrome P450 Enzyme Levels in HepG2 Cells and Cryopreserved Primary Human Hepatocytes and Their Induction in HepG2 Cells. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 21 (8): 1581–91.
- Wilke, Russell A., Debbie W. Lin, Dan M. Roden, Paul B. Watkins, David Flockhart, Issam Zineh, Kathleen M. Giacomini, and Ronald M. Krauss. 2007. Identifying Genetic Risk

- Factors for Serious Adverse Drug Reactions: Current Progress and Challenges. *Nature Reviews. Drug Discovery* 6 (11): 904–16.
- Woodhead, Jeffrey L., Kyunghye Yang, Scott Q. Siler, Paul B. Watkins, Kim L. R. Brouwer, Hugh A. Barton, and Brett A. Howell. 2014. Exploring BSEP Inhibition-Mediated Toxicity with a Mechanistic Model of Drug-Induced Liver Injury. *Frontiers in Pharmacology* 5 (November).
- Xu, Dan, Manhong Wu, Sachiko Nishimura, Toshihiko Nishimura, Sara A. Michie, Ming Zheng, Zicheng Yang, et al. 2015. Chimeric TK-NOG Mice: A Predictive Model for Cholestatic Human Liver Toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 352 (2): 274–80.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto, and T. Masaki. 1988. A Novel Potent Vasoconstrictor Peptide Produced by Vascular Endothelial Cells. *Nature* 332 (6163): 411–15.
- Zeilinger, Katrin, Nora Freyer, Georg Damm, Daniel Seehofer, and Fanny Knöspel. 2016. Cell Sources for in Vitro Human Liver Cell Culture Models. *Experimental Biology and Medicine* 241 (15): 1684–98.
- Zellers, T. M., J. McCormick, and Y. Wu. 1994. Interaction among ET-1, Endothelium-Derived Nitric Oxide, and Prostacyclin in Pulmonary Arteries and Veins. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 267 (1): H139–47.
- Zhou, Changcheng, Michelle M. Tabb, Edward L. Nelson, Felix Grün, Suman Verma, Asal Sadatrafiei, Min Lin, et al. 2006. Mutual Repression between Steroid and Xenobiotic Receptor and NF-kappaB Signaling Pathways Links Xenobiotic Metabolism and Inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* 116 (8): 2280–89.
- Zollner, Gernot, Peter Fickert, Dagmar Silbert, Andrea Fuchsbichler, Hanns Ulrich Marschall, Kurt Zatloukal, Helmut Denk, and Michael Trauner. 2003. Adaptive Changes in Hepatobiliary Transporter Expression in Primary Biliary Cirrhosis. *Journal of Hepatology* 38 (6): 717–27.
- Zollner, Gernot, and Michael Trauner. 2008. Mechanisms of Cholestasis. *Clinics in Liver Disease, Recent Advances in Cholestatic Liver Disease*, 12 (1): 1–26.
- Zollner, G., P. Fickert, R. Zenz, A. Fuchsbichler, C. Stumptner, L. Kenner, P. Ferenci, et al. 2001. Hepatobiliary Transporter Expression in Percutaneous Liver Biopsies of Patients with Cholestatic Liver Diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 33 (3): 633–46.