



HAL
open science

Maturation et trafic intracellulaire du transporteur biliaire ABCB4: effet de mutations

Julien Gautherot

► **To cite this version:**

Julien Gautherot. Maturation et trafic intracellulaire du transporteur biliaire ABCB4: effet de mutations. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PA066081 . tel-00829392

HAL Id: tel-00829392

<https://theses.hal.science/tel-00829392v1>

Submitted on 3 Jun 2013

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE



- PARIS VI-



Spécialité :
Physiologie et Physiopathologie

Présentée par :
Julien Gautherot

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

***Maturation et trafic intracellulaire du transporteur
biliaire ABCB4
-Effet de mutations-***

Soutenue le 5 avril 2012 devant le jury composé de :

Docteur Pascale Fanen, *Rapporteur*
Professeur André Guillouzo, *Rapporteur*
Docteur Patrice Codogno, *Examineur*
Professeur Emmanuel Jacquemin, *Examineur*
Professeur Marc Vigny, *Examineur*
Docteur Michèle Maurice, *Directeur de thèse*

UPMC/Inserm UMR_S 938 : *Pathologies biliaires, fibrose et cancer du foie*
CdR Saint-Antoine
Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Site Saint Antoine
27 rue Chaligny, 75012 PARIS

-TABLE DES MATIERES-

-REMERCIEMENTS-	5
-LISTE DES ABREVIATIONS-	7
-RESUME-	9
-MOTS CLES-	9
-ABSTRACT-	10
-KEYWORDS-	10
-INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE-	11
CHAPITRE I	11
La sécrétion biliaire : une fonction digestive et d'évacuation de métabolites	11
I-1. Rôles physiologiques de la bile.....	11
I-2. Le foie et les voies biliaires.....	12
I-3. Les substances sécrétées dans la bile.....	15
I-3-1. Composition de la bile.....	15
I-3-2. Les sels biliaires, les phospholipides et le cholestérol.....	16
I-3-3-1. Le diagramme d'Admirand et Small.....	16
I-3-3-2. Le cholestérol.....	18
I-3-3-3. Les acides biliaires : synthèse et cycle entéro-hépatique.....	19
I-3-3-4. La phosphatidylcholine hépatique.....	20
I-3-3. La régulation des principaux constituants biliaires.....	21
I-3-3-1. Régulation coordonnée de la synthèse des acides biliaires et du catabolisme du cholestérol.....	21
I-3-3-2. Régulation de la synthèse de la phosphatidylcholine.....	24
I-4. Les transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire.....	24
CHAPITRE II	26
Les transporteurs ABC liés aux fonctions hépatobiliaires	26
II-1. La super-famille des transporteurs ABC.....	26
II-1-2. La sous-famille ABCB (ou MDR/TAP).....	27
II-1-3. La sous-famille ABCC (ou CFTR/MRP).....	28
II-1-4. La sous-famille ABCG (ou White).....	28
II-2. Topologie des transporteurs ABC.....	29
II-2-1. Une organisation en domaines.....	29
II-2-2. Une structure adaptée à la fonction de transport.....	31
II-2-3. Modifications co- et post-traductionnelles des transporteurs ABC.....	34
II-2-3-1. Ajout de chaînes glycosylées.....	34
II-2-3-2. Formation de ponts disulfures.....	34
II-2-3-3. Rôle de la phosphorylation.....	34
II-3. Le transporteur ABCB4/MDR3 : du gène à la protéine.....	35
II-3-1. La « résistance multi-drogues » (MDR).....	35
II-3-1-1. Découverte de la P-gP.....	35
II-3-1-2. La petite famille mdr : des gènes fortement liés.....	36

II-3-1-3. Les gènes mdr codent les P-gP	38
II-3-1-4. Les P-gP sont fortement homologues entre elles	38
II-3-2. MDR3 : une protéine peu adaptée à la résistance aux drogues	38
II-3-2-1. Distribution tissulaire et cellulaire d'ABCB4	39
II-3-2-2. Un épissage alternatif à l'origine de trois isoformes	39
II-3-2-3. Une fonction de « floppase » de phospholipides	39
CHAPITRE III	42
Biosynthèse et trafic intracellulaire d'ABCB4	42
III-1. Régulation de l'expression d'ABCB4 : un contrôle transcriptionnel	42
III-2. Biosynthèse de la chaîne polypeptidique et N-glycosylation	42
III-3. Repliement et contrôle qualité	45
III-3-1. Les protéines chaperonnes	45
III-3-1-1. Les protéines chaperonnes résidentes du RE	46
III-3-1-2. Les protéines chaperonnes cytosoliques	48
III-3-2. Anomalie de repliement des protéines mutées	51
III-4. Trafic intracellulaire d'ABCB4 dans les hépatocytes	52
III-4-1. Un ciblage polarisé	52
III-4-2. Stabilité membranaire, recyclage et réservoir intracellulaire	53
III-4-3. Les protéines partenaires du trafic intracellulaire	55
III-5. Les voies de dégradation des transporteurs ABC	56
III-5-1. Le protéasome	56
III-5-2. Le système lysosomal	57
CHAPITRE IV	59
Les pathologies liées à des défauts d'ABCB4	59
IV-1. Des mutations d'ABCB4 sont à l'origine de plusieurs pathologies	59
IV-1-1. La PFIC3: <i>Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type 3</i>	59
IV-1-2. Le syndrome LPAC: <i>Low Phospholipid Associated Cholelithiasis</i>	61
IV-1-3. La cholestase gravidique ou ICP (<i>Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy</i>)	61
IV-1-4. Autres pathologies associées à ABCB4	63
IV-2. Les mutations d'ABCB4 identifiées chez les patients	64
IV-2-1. Mutations et corrélation génotype/phénotype	64
IV-2-2. Les mutations identifiées touchent généralement des motifs conservés	66
IV-2-3. Effets des mutations sur le transporteur	67
IV-3. Les approches thérapeutiques ciblant les effets d'un défaut d'ABCB4	69
IV-3-1. Les thérapies actuelles : l'UDCA et la transplantation hépatique	69
IV-3-2. Développement de thérapies alternatives	70
IV-3-2-1. Cibler les récepteurs nucléaires	70
IV-3-2-2. Les « supprimeurs » de codons-stop	71
IV-3-2-3. Les chaperonnes pharmacologiques	71
IV-3-2-4. La modulation des chaperonnes cellulaires	73
IV-3-2-5. La transplantation d'hépatocytes	74
IV-3-2-6. La thérapie génique	75
-OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE-	78

-RESULTATS-	79
PREMIERE PARTIE :	79
Effet de la mutation I541F	79
-ARTICLES-	81
<i>Article I: Delaunay, 2009</i>	82
<i>Article II: Gautherot, 2012</i>	92
Résultats complémentaires des articles présentés	101
-Matériels et Méthodes-	101
-Résultats-	102
DEUXIEME PARTIE :	108
Etude du domaine N-terminal d'ABCB4	108
Introduction	108
Matériels et Méthodes	109
Résultats	113
-DISCUSSION-	121
La mutation I541F entraîne un défaut de repliement du domaine NBD1	121
La modulation de la calnexine et d'Hsc/Hsp70 ne permet pas de rétablir le trafic du mutant I541F	123
Les chaperonnes pharmacologiques sont une voie prometteuse pour rétablir le trafic du mutant I541F	124
Le domaine N-terminal d'ABCB4 est nécessaire à sa sortie du réticulum endoplasmique	126
Le domaine N-terminal d'ABCB4 joue un rôle dans la fonction de transport de PC	127
-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES-	129
-ANNEXES-	131
Annexe 1. : Biosynthèse des acides biliaires	131
Annexe 2. : Les transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire	132
Annexe 3. : Les isoformes A, B et C d'ABCB4	133
Annexe 4. : Les mutations identifiées d'ABCB4	134
Annexe 5. : Les résidus d'ABCB4 conservés dans ABCB1 et chez quelques mammifères	138
-REFERENCES-	139

-REMERCIEMENTS-

Au terme de mon doctorat, je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Chantal Housset, en tant que directeur du laboratoire, pour son accueil dans l'équipe et pour ce qu'elle m'a permis de réaliser, ainsi que mon directeur de thèse, le Docteur Michèle Maurice, pour toute la confiance qu'elle m'a accordée et pour l'immense plaisir que j'ai eu à réaliser ce travail à ses côtés.

Je remercie respectueusement mes rapporteurs, Pascale Fanen et André Guillouzo, ainsi que les membres de mon jury de thèse qui me font l'honneur d'avoir accepté de me consacrer du temps pour m'écouter et pour lire ce document. J'espère en être digne.

Merci à Tounsia pour son encadrement et sa disponibilité depuis le jour de mon arrivée, lors de mon stage de Master. Un grand merci à Jean-Louis pour sa pédagogie, sa patience, ses nombreuses trouvailles et pour son humour quotidien. Merci à Anne-Marie et Danièle pour leur dévouement dès mon arrivée, merci Danièle pour la relecture de ce document. Merci à tous pour votre contribution à la bonne ambiance qui règne dans le groupe!

Je n'oublie pas Alegna, Claire, Quitterie et Thomas pour leurs contributions passées et futures sur l'étude de notre transporteur favori !

Merci à Chantal, Michèle et au Professeur Raoul Poupon de m'avoir permis de présenter mes travaux à l'occasion de congrès scientifiques ou à des associations de malades. Merci pour tous leurs efforts fournis pour me trouver des financements. Merci à l'association Robert Debré, à l'association pour la lutte contre les maladies inflammatoires du foie et des voies biliaires (albi), au legs Demassieux en Sciences et à l'association Vaincre la Mucoviscidose (VLM) pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions.

Merci à Véronique Barbu qui m'a aidé à étoffer la liste des mutations d'ABC4. Je remercie également tous les collègues de l'équipe de Chantal Housset du 4^{ème} et les membres de l'équipe de Jacqueline Capeau du 7^{ème} pour leurs nombreux conseils tout au long de ces années. Merci aux chers voisins de l'ER7 du 6^{ème} avec qui mon équipe a beaucoup partagé.

Merci à Marie-Anne pour son aide experte en spectrométrie de masse. Un merci particulier à Malik qui m'a offert l'opportunité de toucher à l'enseignement l'espace d'une semaine.

Je n'oublie pas l'origine de mon immersion dans les sciences du vivant en remerciant chaleureusement mes professeurs de biologie du Lycée, et en particulier M. Chesnais, qui m'a transmis une véritable passion.

Parce que cette thèse ne s'est pas faite uniquement par le travail qui suit, je tiens à remercier profondément ma famille pour les encouragements, le soutien et la confiance qu'elle m'a toujours accordés tout au long de ces années.

Bien sûr, un immense merci à mes parents qui m'ont donné la liberté de faire ce que j'aime dans les meilleures conditions.

Merci à ma mère, à ma sœur et à ma chère Laura pour m'avoir aidé à la relecture de ce manuscrit.

-LISTE DES ABREVIATIONS-

ABC: ATP Binding Cassette (gène)
ABC: ATP Binding Cassette (protéine)
ADNc : Acide DesoxyriboNucléique complémentaire
ALLN : N-Acetyl-Leu-Leu-Norleu-al, N-Acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal
AP-2: Adaptator Protein 2
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomal
ARNt : Acide RiboNucléique de transfert
ATP: Adénosine TriPhosphate
BfA: Bafilomycine A
Bsep: Bile salt export pump (gène)
BSEP: Bile Salt Export Pump (protéine)
CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CIC: oral Contraceptives-Induced Cholestasis
CMV: CytoMégaloVirus
CYP7A: 7 α -hydroxylase
Da: Dalton
EC: boucle ExtraCellulaire
EndoH: Endoglycosidase H
ER: Endoplasmic Reticulum
ERAD: Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
FIC1: Familial Intrahepatic Cholestasis 1
FXR: Farnesoid X Receptor
 γ -GT: Gamma Glutamyl Transferase
GFP: Green Fluorescent Protein
GST: Glutathione S-Transferase
HAX-1: HS1-Associated protein X-1
HDL: High Density Lipoprotein
HEK: Human Embryonic Kidney cells
HepG2: Human hepatocellular liver carcinoma cell line
IC: boucle IntraCellulaire

ICP: Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy
LDL: Low Density Lipoprotein
LPAC: Low Phospholipid Associated Cholelithiasis
LRH: Liver Receptor Homologue-1
LV: Lithiase Vésiculaire
LXR: Liver X Receptor
M: Molaire
MDCK: Madin-Darby Canine Kidney
MDR: Multi-Drug Resistance
MG132: Z-Leu-Leu-Leu-al
MLC2a: Myosin Light Chain 2a
MS/MS: Spectrométrie de Masse en Tandem
NBD: Nucleotid Binding Domain
NTCP: Na⁺ Taurocholate Co-transporting Polypeptide
OATP: Organic Anion TransPorter
PC: Phosphatidylcholine
PE : PhosphatidylEthanolamine
***Pemt* :** PE N-methyltransferase (gène)
PEMT : PE N-MethylTransferase (protéine)
P-gP : P-glycoProtein
PKA: Protéine Kinase A
PKC: Protéine Kinase C
PNGaseF: Peptide: N-Glycosidase F
PS: PhosphatidylSérine
Rab11a: Ras-related protein Rab-11A
RE: Réticulum Endoplasmique
RXR: Retinoid X Receptor
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor
SNARE: SNAp (Soluble NSF Attachment protein) REceptor) proteins
TM: segment TransMembranaire
TMD: TransMembrane Domain
UPS: Ubiquitin-Proteasom System
WT: Wild Type

-RESUME-

ABCB4 est un transporteur ABC spécialisé dans la sécrétion de phosphatidylcholine au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes. Des variations du gène *ABCB4* sont responsables de la cholestase intrahépatique familiale progressive de type 3 (PFIC3), une maladie rare, létale, qui progresse en cirrhose et insuffisance hépatique avant l'âge adulte.

Nous avons étudié l'effet de la mutation I541F décrite chez un patient. Contrairement à la forme sauvage d'ABCB4 localisée à la membrane des canalicules biliaires dans les cellules HepG2 et à la surface apicale dans les cellules MDCK transfectées, le mutant I541F n'est pas replié correctement et s'accumule dans le réticulum endoplasmique (RE). Après transfert à 27°C, le mutant est exprimé à la surface apicale sous forme mature et active. La modulation des chaperonnes cellulaires calnexine et Hsc/Hsp70 ne restaure pas le trafic intracellulaire du mutant. La cyclosporine A augmente la maturation et l'expression à la membrane plasmique d'ABCB4-I541F, ce qui ouvre des perspectives de développer de nouvelles thérapies pour le traitement de la PFIC3.

La seconde partie du travail a eu pour objectif de déterminer le rôle du domaine cytoplasmique N-terminal d'ABCB4, qui n'a pas d'homologie avec d'autres transporteurs ABC. Des délétions progressives de ce domaine ont permis d'identifier une séquence de 11 acides aminés nécessaire à la sortie du RE. Des mutations ponctuelles (T34M et R47G) identifiées chez des patients n'affectent pas la maturation ni le trafic, mais diminuent fortement l'activité d'ABCB4. Ces résultats montrent que le domaine N-terminal est nécessaire à la fois pour le trafic et l'activité d'ABCB4.

-MOTS CLES-

Transporteurs ABC, sécrétion biliaire, maladie génétique, repliement des protéines, chaperonnes

-ABSTRACT-

The ABC transporter ABCB4 is a phosphatidylcholine translocator expressed at the bile canalicular membrane of hepatocytes. Variations of the *ABCB4* gene have been recognized as causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3) in children, a rare lethal disorder which progresses to cirrhosis and liver failure before adulthood.

We studied the effect of the I541F mutation described in a PFIC3 patient. In contrast to wild-type ABCB4 which was localized at the bile canalicular membrane in HepG2 cells and at the apical surface in MDCK cells after stable transfection, the I541F mutant did not fold properly and accumulated in the endoplasmic reticulum (ER). After shifting cells to 27°C, the mutant was expressed at the apical cell surface in a mature and active form. Modulation of the cellular chaperones calnexin and Hsc/Hsp70 did not restore intracellular trafficking of the mutant. Cyclosporin A improved maturation and plasma membrane expression of ABCB4-I541F, thus opening perspectives to develop novel therapies for the treatment of PFIC3.

The second part of the study was aimed at identifying the role of the N-terminal cytoplasmic domain of ABCB4, which does not show homology with other ABC transporters. Progressive deletions of the N-terminus identified a positively charged sequence of 11 amino-acids, which is required for exit of the ER. Single point mutations (T34M and R47G) identified in patients did not affect processing and trafficking, but strongly decreased the function of ABCB4. These results show that the N-terminal domain is required for both trafficking and function of ABCB4.

-KEYWORDS-

ABC transporters, bile secretion, genetic disease, protein folding, chaperones

-INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE-

Les travaux réalisés au cours de cette thèse sont consacrés à l'étude d'ABCB4 (*ATP Binding Cassette sub-family B member 4*), une protéine de transport essentielle à la formation de la bile. L'introduction bibliographique décrit la physiologie de la sécrétion biliaire puis se focalise sur le transporteur ABCB4 et les pathologies qui y sont associées.

CHAPITRE I

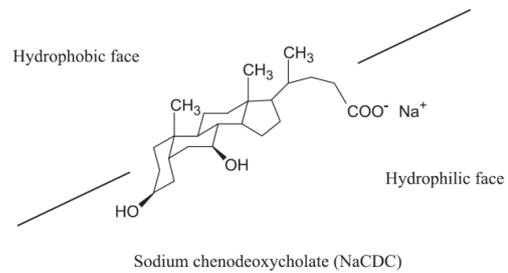
La sécrétion biliaire : une fonction digestive et d'évacuation de métabolites

La sécrétion biliaire est exclusivement réalisée par le foie et elle représente l'une de ses activités majeures. La bile est un fluide autant sécrétoire qu'excrétoire, dont la composition complexe varie en fonction de l'état nutritionnel de l'individu (Coleman 1987).

I-1. Rôles physiologiques de la bile

Au niveau digestif, le rôle prépondérant de la bile est l'assimilation des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles. L'émulsion des graisses est obtenue par l'action détergente des sels biliaires présents dans la bile. Les graisses émulsionnées peuvent alors être attaquées par les lipases pancréatiques et intestinales pour être transformées en de microscopiques "micelles" absorbables par la muqueuse intestinale. La structure tridimensionnelle des sels biliaires est particulièrement favorable à leur fonction d'émulsifiant : ils sont amphiphiles, pourvus d'une tête hydrophile et d'un large côté hydrophobe. C'est ce caractère polaire/apolaire qui leur donne la propriété de former des micelles (figure 1) (Ninomiya, Matsuoka and Moroi 2003).

Figure 1 : Structure chimique d'un sel biliaire. La structure spatiale du chénodésoxycholate de sodium montre une face hydrophile et une face hydrophobe (Ninomiya et al. 2003).



La deuxième fonction importante de la bile est d'éliminer de l'organisme une grande variété de produits (fonction de détoxification). Le flux biliaire permet d'éliminer dans les fèces l'excès de cholestérol, des catabolites (bilirubine), des ions inorganiques (fer, cuivre) ainsi que certains xénobiotiques et médicaments.

Le flux biliaire est un processus osmotique engendré à la fois par la sécrétion des acides biliaires (appelé le flux dépendant de la fraction en acides biliaires, ou BADFc) et par d'autres molécules osmotiquement actives (appelé le flux indépendant de la fraction en acides biliaires ou BAIFc), comme le glutathion (Ballatori and Truong 1992, Esteller 2008). Les mouvements de l'eau et des électrolytes se font essentiellement par voie paracellulaire, à travers les jonctions serrées intercellulaires. La sécrétion moyenne de bile chez l'homme est de 620 ml par jour (Esteller 2008).

I-2. Le foie et les voies biliaires

La sécrétion de la bile est assurée par les hépatocytes qui constituent les principales cellules du foie. Parenchymateuses et de type épithélial, elles représentent 85 % du volume hépatique. Les hépatocytes s'organisent en une unité morphologique fonctionnelle appelée lobule hépatique (figure 2). Pour assurer leurs fonctions exocrines et endocrines, ils sont disposés en travées orientées de façon radiaire qui débouchent vers la veine hépatique centrolobulaire. L'espace situé en périphérie des lobules est occupé par les vaisseaux sanguins (issus de la veine porte ou de l'artère hépatique) et les canaux biliaires. Le sang circule de façon centripète dans les capillaires sinusoides situés entre les lames d'hépatocytes : il passe de l'espace porte à la veine centrolobulaire. A l'inverse, la bile progresse de façon centrifuge : elle se dirige vers les canaux biliaires situés dans les espaces portes.

Les hépatocytes ont un caractère bipolaire. Ils reçoivent les constituants plasmatiques depuis les capillaires fenestrés au niveau du pôle basolatéral (ou pôle sinusoidal) et les

rejetent, avec d'autres constituants qu'ils synthétisent, au niveau du pôle apical (ou pôle canaliculaire). Ils sont aussi capables de sécréter des composants vers les capillaires sinusoides. Ils assurent donc différentes sécrétions dans les deux directions. Les hépatocytes sont ainsi disposés en monocouche cellulaire sur un capillaire sinusoides ce qui favorise les échanges avec le sang. La membrane latérale des hépatocytes occupe 50 % de leur surface. Elle comporte les structures d'adhérence (desmosomes et jonctions serrées) et de communication (jonctions gap). La membrane canaliculaire forme un conduit entre deux hépatocytes et occupe une petite fraction de la surface membranaire (figure 3A).

Les capillaires sanguins, de type sinusoidal fenestrés, laissent passer des molécules jusqu'à 250 kilodaltons (kDa) dans l'espace de Disse directement en contact de la membrane basale (ou sinusoidale) des hépatocytes qui représente 37 % de leur surface.

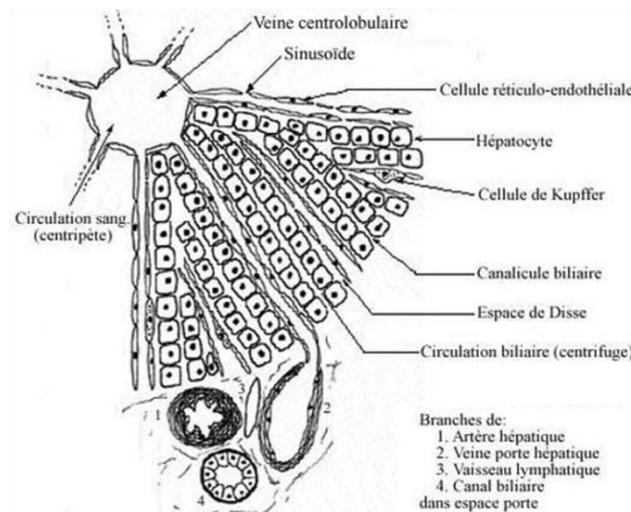


Figure 2 : Portion d'un lobule hépatique. Le lobule hépatique se présente comme une structure hexagonale, centrée par une veine centrolobulaire et limitée en périphérie par une ligne imaginaire joignant plusieurs espaces portes voisins. Les travées d'hépatocytes sont parallèles aux sinusoides qui convergent vers la veine centrolobulaire. L'espace de Disse est situé entre les travées d'hépatocytes et les sinusoides. Chaque travée d'hépatocytes est flanquée d'un canalicule biliaire qui n'a pas de paroi propre, celle-ci est formée en réalité par les membranes apicales des hépatocytes adjacents. Les canalicules biliaires ont une orientation radiale dans le lobule, entre les travées hépatocytaires. Source : www.mapageweb.umontreal.ca/cabanat/bio2412/intro.

Les cellules endothéliales tapissent le capillaire sinusoides et empêchent le sang de s'immiscer dans l'espace de Disse tout en autorisant, par un système de pores, les échanges entre le plasma et l'hépatocyte.

Les cellules épithéliales du conduit biliaire intrahépatique, les cholangiocytes, qui constituent 3 à 5 % des cellules du foie, font le lien entre le conduit intrahépatique et le

conduit extrahépatique. Elles contribuent au flux biliaire en rejetant de l'eau, des bicarbonates et d'autres électrolytes dans la bile. La bile subit des modifications de composition tout au long de son parcours au contact des cholangiocytes par un processus de sécrétion/absorption. Les cholangiocytes sont responsables d'environ 30 % du volume biliaire. L'appareil biliaire est un système convergent où la bile est dirigée progressivement et de façon continue des canalicules biliaires vers les ductules et les canaux biliaires, le canal hépatique commun puis la vésicule biliaire. La vésicule biliaire n'existe pas chez toutes les espèces (elle est absente chez le rat par exemple) et elle constitue la voie biliaire accessoire. Elle est reliée au foie, au duodénum et au canal cholédoque par le canal cystique. Lors de la prise alimentaire le sphincter d'Oddi se relâche et lorsque le bol gastrique arrive dans le duodénum, la vésicule biliaire se contracte pour libérer la bile dans le canal cholédoque puis dans l'intestin, au niveau du duodénum (figure 3B). La fonction de la vésicule biliaire est principalement limitée au stockage et à la concentration de la bile. La bile vésiculaire n'a donc pas la même composition que la bile hépatocytaire.

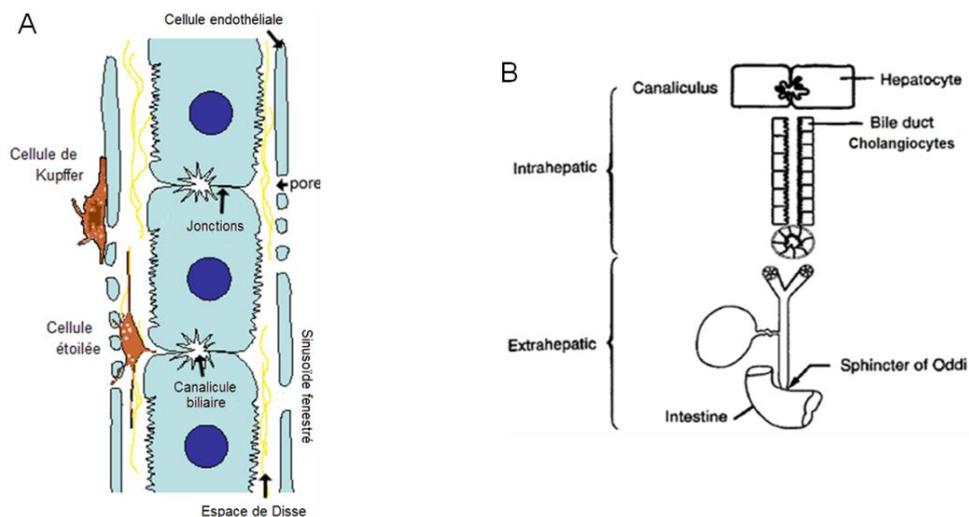


Figure 3 : (A) Les cellules au sein du lobule hépatique. Le canalicule biliaire est formé par les membranes d'hépatocytes adjacents. D'autres cellules sont présentes dans le foie. Les cellules de Kupffer représentent 10 % du poids hépatique et jouent le rôle de macrophage. Les cellules étoilées stockent la vitamine A et synthétisent la matrice extracellulaire hépatique. Source : *The Histology Guide/University of Leeds*, modifié. **(B) Le système ductulaire biliaire intra et extra-hépatique.** Les cholangiocytes forment un épithélium qui tapisse un vaste réseau de conduits intra- et extrahépatique qui s'étend d'une position juxta-hépatocytaire jusqu'à la jonction avec le duodénum (LaRusso 1996).

I-3. Les substances sécrétées dans la bile

La bile est un fluide complexe contenant de l'eau, des électrolytes et de nombreuses molécules organiques.

I-3-1. Composition de la bile

La bile primaire élaborée par les hépatocytes est une solution aqueuse iso-osmotique composée d'environ 84 % d'eau, 11.5 % d'acides biliaires, 3 % de phospholipides, 0.5 % de cholestérol et de seulement 1 % d'autres composés (Holzbach et al. 1973). Elle contient des électrolytes à des concentrations équivalentes à celles du plasma (sodium, potassium, calcium, magnésium) et d'autres à des concentrations variables (chlore, bicarbonates), tableau I.

Les principales molécules organiques présentes sont les sels biliaires, le cholestérol, les phospholipides (sous forme de phosphatidylcholine), des protéines et des peptides (glutathion), les pigments biliaires et d'autres anions organiques (figure 4). Les protéines incluent les protéines plasmatiques qui traversent les hépatocytes par transcytose (albumine, IgA) et les protéines hépatiques (5'-nucléotidase, enzymes lysosomales etc.). Les acides biliaires sont majoritaires avec une concentration située entre 2 et 45 mM. Le principal pigment biliaire est la bilirubine (50 à 200 mg/100 ml) qui provient de la dégradation de l'hémoglobine. La bile humaine est très riche en lipides. La concentration en phospholipides varie de 25 à 810 mg/100ml et celle du cholestérol de 60 à 320 mg/100ml avec un ratio phospholipides/acides biliaires de 0,3 et cholestérol/acides biliaires de 0,07 (Esteller 2008).

Composition	Hepatic bile	Gallbladder bile
Water		
Bile salts	11 mg/mL	60 mg/mL
Bilirubin	0.4 mg/mL	3 mg/mL
Cholesterol	1 mg/mL	9 mg/mL
Fatty acids	1.2 mg/mL	12 mg/mL
Lecithin	0.4 mg/mL	3 mg/mL
Na ⁺	145 mM	130 mM
K ⁺	5 mM	12 mM
Ca ²⁺	2.5 mM	12 mM
Cl ⁻	100 mM	25 mM
HCO ₃ ⁻	28 mM	10 mM

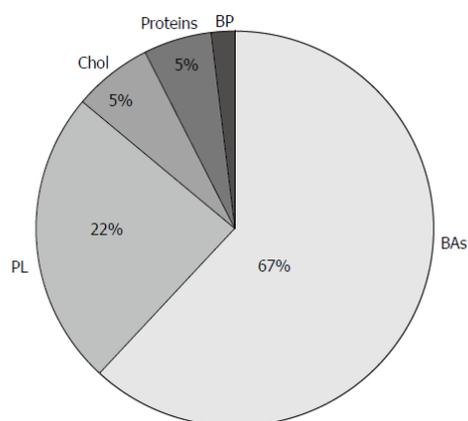


Tableau I et Figure 4 : Composition générale de la bile hépatique et de la vésicule biliaire (Zakarias Kristiansen, Maitra and Pandey 2007). Proportions des composés organiques. BA : acides biliaires, PL : phospholipides, Chol : cholestérol, BP : pigments biliaires (Esteller 2008)

En progressant dans les canaux biliaires, la bile subit des modifications. Les cholangiocytes réabsorbent et sécrètent des substances qui vont diluer et alcaliniser la bile. Ils sécrètent de l'eau, du bicarbonate, du chlore, des IgA et réabsorbent du glucose, des acides biliaires, de la bilirubine conjuguée et des acides aminés. Ces processus sont régulés par le système nerveux et les hormones (Strazzabosco 1997a, Esteller 2008). Par exemple, la sécrétine régule l'expression membranaire de plusieurs transporteurs (AE2/SLC4A2, ABCC7/CFTR et l'aquaporine-1/AQ1) à partir d'un réservoir intracellulaire, via une augmentation intracellulaire d'AMPc (Tietz et al. 2003).

La bile est stockée et concentrée cinq à dix fois dans la vésicule biliaire par absorption d'eau et d'électrolytes. Elle y subit quelques dernières modifications : addition de mucines, actions enzymatiques etc. (Coleman 1987).

I-3-2. Les sels biliaires, les phospholipides et le cholestérol

I-3-3-1. Le diagramme d'Admirand et Small

La bile est une solution constituée essentiellement d'eau (80 à 90 %) dans laquelle des lipides biliaires se trouvent en solution sursaturée, en particulier au niveau de la vésicule biliaire où se concentre la bile hépatique. Ces lipides biliaires sont constitués principalement d'un mélange ternaire de sels biliaires, de phospholipides (>96 % diacylphosphatidylcholine) et de cholestérol non-estérifié. Les phospholipides et le cholestérol sont insolubles en solution aqueuse. Ils forment avec les sels biliaires des micelles ou des vésicules mixtes et stables à la seule condition que la quantité de chacun de ces composants soit respectée. La bilirubine conjuguée entre aussi dans la composition de ces micelles (Wang, Cohen and Carey 2009). La proportion entre les trois constituants principaux de la bile a été clairement établie par des études menées dans les années 1960 (Admirand and Small 1968). La bile d'une cohorte de patients a été prélevée. Certains patients souffraient de calculs biliaires et les autres n'avaient pas de problème de tractus biliaire. Le taux de sels biliaires, de phosphatidylcholine (lécithine) et de cholestérol a été déterminé et rapporté sur des coordonnées triangulaires. La figure 5A montre que la bile « normale » contient en moyenne 80 % de sels biliaires, 15 % de phosphatidylcholine et 5 % de cholestérol. En rapportant sur ce triangle le taux moyen des trois constituants pour les patients souffrant de calculs biliaires, les auteurs ont déterminé trois zones où l'état physique de la bile diffère (figure 5B). Une augmentation de la quantité relative de cholestérol par rapport aux sels biliaires et à la phosphatidylcholine explique ainsi l'apparition de calculs de cholestérol. L'index lithogénique de la bile peut ainsi être calculé.

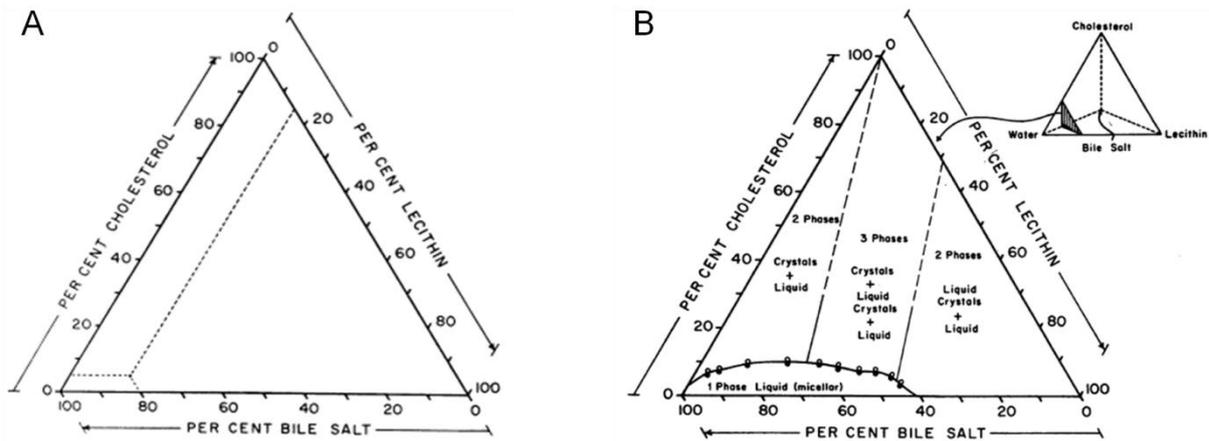


Figure 5 : (A) Les proportions de sels biliaires, phosphatidylcholine (lécithine) et cholestérol de la bile. Chaque côté du triangle correspond au pourcentage de sels biliaires, de phosphatidylcholine et de cholestérol. La bile normale contient 80 % de sels biliaires, 15 % de phosphatidylcholine et 5 % de cholestérol. (B) Diagramme des trois phases. Le tétraèdre en haut à droite montre les états physiques possibles des différentes combinaisons de sels biliaires, de lécithine, de cholestérol et d'eau. La section représentée est prise à 90 % d'eau et 10 % de solides (concentration moyenne des 91 biles étudiées). Les cercles vides représentent la zone formée de deux ou trois phases (liquides, cristaux, cristaux liquides), les cercles pleins représentent la zone formée d'une seule phase liquide (Admirand and Small 1968).

Les études menées *in vitro* par ces auteurs confirment que la formation de cristaux de cholestérol est liée à une répartition déséquilibrée des trois constituants majeurs de la bile. L'état physique de la bile est donc déterminé par les concentrations relatives en sels biliaires, phosphatidylcholine et cholestérol. Les autres constituants de la bile ne semblent pas avoir d'effets significatifs sur la solubilisation du cholestérol.

Le système modèle d'Admirand et Small montre la zone de solubilisation maximale du cholestérol, correspondant à la phase liquide (figure 5B, zone inférieure gauche du triangle). En dehors de cette zone, la bile est sursaturée en cholestérol et devient lithogène : le cholestérol précipite et forme des cristaux. La lithiase biliaire est à l'origine de diverses pathologies (irritations du tractus biliaire avec cholangites, cholestase chronique et cirrhoses biliaires).

Les acides biliaires, les phospholipides et le cholestérol s'associent dans la bile sous forme de micelles mixtes et de vésicules unilamellaires pour être maintenus en solution. L'effet détergent de telles associations sur les membranes cellulaires est moindre que celui des micelles simples qui se forment lorsque la concentration en sels biliaires excède la concentration micellaire critique. Les micelles simples sont petites (≈ 3 nm de diamètre) et peuvent solubiliser de petites quantités de cholestérol. Les micelles mixtes sont plus larges (≈ 4 à 8 nm de diamètre) et sont capables de solubiliser de grandes quantités de cholestérol. Les

vésicules sont des structures sphériques (40 à 100 nm de diamètre) composées de phospholipides unilamellaires et de cholestérol mais de peu de sels biliaries (figure 6). Les cristaux liquides (> 500 nm de diamètre), mentionnés en figure 5B, sont des vésicules multilamellaires résultant de la fusion de vésicules unilamellaires. Ils se trouvent principalement dans la vésicule biliaire (Wang et al. 2009).

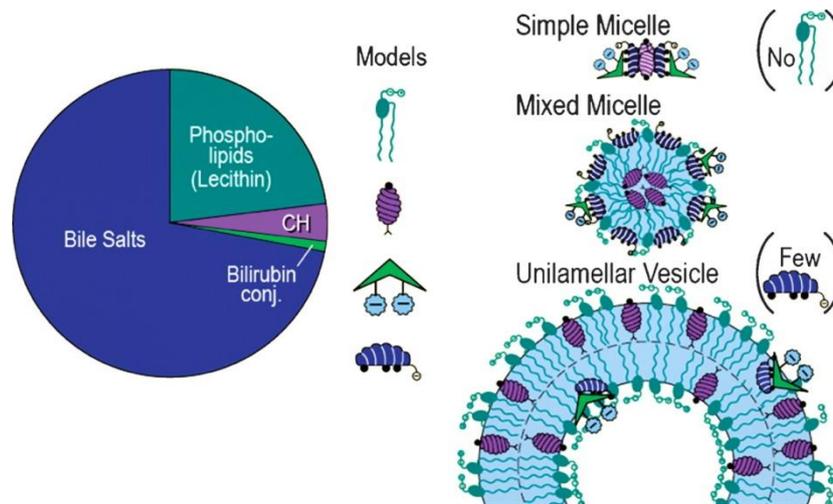


Figure 6 : Proportions relatives des lipides biliaries et des trois structures macromoléculaires qu'ils forment dans la bile. Les molécules de bilirubine conjuguée, bien que solubles dans le milieu aqueux, se fixent à la face hydrophile des acides biliaries. CH : cholestérol (Wang et al. 2009).

1-3-2-2. Le cholestérol

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme du cholestérol (Dijkers and Tietge 2010). Les hépatocytes expriment les récepteurs des HDL (*High Density Lipoprotein*) et LDL (*Low Density Lipoprotein*) et sont aussi capables de synthétiser *de novo* et de façon régulée le cholestérol. La principale source de cholestérol de la bile dérive des lipoprotéines plasmatiques (HDL, LDL) en provenance de l'alimentation. La synthèse *de novo* ou l'hydrolyse des stocks de cholestérol estérifié est une voie quantitativement moins importante. Le foie utilise deux voies pour la sécrétion du cholestérol. La première utilise les VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) pour distribuer le cholestérol aux cellules périphériques. La seconde est la sécrétion directe dans la bile du cholestérol libre ou après sa conversion en acides biliaries. Cette seconde voie constitue le moyen d'éliminer le cholestérol de l'organisme dans les fèces. Environ 50 % de la dégradation du cholestérol se fait par son

catabolisme en acides biliaires (Redinger 2003). La synthèse des acides biliaires et l'homéostasie du cholestérol sont donc directement interconnectées.

I-3-2-3. Les acides biliaires : synthèse et cycle entéro-hépatique

Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol. Ils sont conjugués à un acide aminé : la glycine ou la taurine. Au pH physiologique, ils sont chargés négativement. Ils forment des anions qui se couplent avec un ion sodium. Ils prennent ainsi le nom de « sels biliaires ».

Les acides biliaires sécrétés dans la bile proviennent soit de la synthèse *de novo* à partir du cholestérol, soit du recyclage via le cycle entéro-hépatique. Cette dernière voie est quantitativement la plus importante. Chez l'homme, la masse de cholestérol convertie chaque jour en acides biliaires par le foie est d'environ 500 mg. Les réactions enzymatiques qui aboutissent à la formation des acides biliaires se produisent dans plusieurs compartiments subcellulaires de l'hépatocyte : réticulum endoplasmique, cytosol, mitochondrie et peroxyosome (Russell 2003). La synthèse *de novo* nécessite au moins 16 enzymes différentes pour obtenir un acide biliaire complet, c'est-à-dire conjugué avec une glycine ou une taurine (Russell 2003, Jansen and Faber 2007). La plupart des enzymes impliquées font partie de la famille du P450. Deux voies principales de conversion du cholestérol en acides biliaires primaires existent : la voie neutre et la voie acide (annexe 1, page 131). La voie neutre (ou classique) commence par l'hydroxylation du cholestérol par une enzyme clé : la 7 α -hydroxylase (ou cytochrome P450 7A1/CYP7A1). La voie acide (ou alternative) commence par l'hydroxylation du cholestérol par la stérol 27-hydroxylase (CYP27) qui produit le 5-cholesten-3 β -27-diol.

Après plusieurs modifications faisant intervenir différentes enzymes, deux acides biliaires primaires sont synthétisés : l'acide cholique (70 %) et l'acide chénodésoxycholique (30 %). Ces deux acides biliaires primaires sont ensuite glyco- ou tauro-conjugués pour devenir le glycocholate, le taurocholate, le glycochénodésoxycholate ou le taurochénodésoxycholate. Les acides biliaires primaires sont stockés et concentrés temporairement dans la vésicule biliaire. Lors d'un repas, ils rejoignent le haut de l'intestin (le jéjunum) où ils débiteront la digestion et l'absorption des graisses. Le glycocholate et le taurocholate sont déconjugués par les bactéries intestinales. L'acide cholique libéré est réabsorbé ou transformé par les bactéries en déoxycholate par réduction de la fonction alcool en 7 α . Le glycochénodésoxycholate et le taurochénodésoxycholate sont aussi déconjugués par les bactéries intestinales. L'acide chénodésoxycholique libéré est réabsorbé ou transformé en

lithocholate par réduction de la fonction alcool en 7α . Les acides biliaires transformés par les bactéries intestinales deviennent des acides biliaires secondaires. Au final, de nombreux dérivés des acides biliaires primaires composent la bile et certains seront aussi conjugués avec un glucuronide ou avec un sulfate (tableau II).

Les acides biliaires sont réabsorbés dans l'intestin, au niveau de l'iléum, par un mécanisme de transport actif. Ils sont transportés dans le sang sous forme de complexes liés à l'albumine (Alrefai and Gill 2007). Ils rejoignent le foie par la veine porte bouclant ainsi le cycle entero-hépatique. La réabsorption intestinale des acides biliaires est très efficace : de l'ordre de 98 % des acides biliaires totaux circulant chaque jour, figure 7 (Dowling 1973).

Bile salts	% of total bile salt pool
Sulfoglycolithocholates	2
Taurodeoxycholates	4
Glycochenodeoxycholate	25
Glycodeoxycholates	13
Chenodeoxycholates	37
Deoxycholates	17
Sulfolithocholates	2

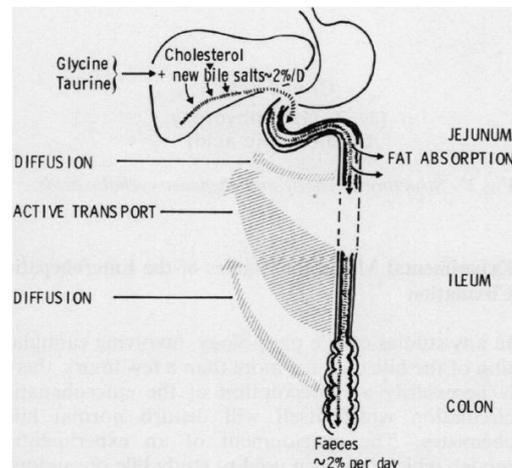


Tableau II et figure 7 : La composition en sels biliaires de la bile (Zakarias Kristiansen et al. 2007) et le cycle entérohépatique des acides biliaires (Dowling 1973).

I-3-2-4. La phosphatidylcholine hépatique

Les phospholipides biliaires sont constitués à plus de 95 % de phosphatidylcholine (PC) (Alvaro et al. 1986), un constituant majeur de la membrane plasmique. La PC hépatique est sécrétée dans la bile par le transporteur ABCB4 (Smit et al. 1993b). La quantité de PC sécrétée dans la bile est énorme : elle est estimée à la quantité totale de PC contenue dans le foie toutes les 24 h (Walkey et al. 1998). La PC est synthétisée de façon prédominante *de novo* dans le foie, bien qu'une proportion significative dérive du manteau phospholipidique des particules HDL (Cohen 1999).

Deux voies métaboliques conduisent à la synthèse de la PC membranaire : la voie ubiquitaire qui passe par la condensation de CDP-choline avec un diglycéride (voie de Kennedy) et une voie auxiliaire spécifique au foie qui transméthyle la PE grâce à l'enzyme

PEMT (*PE N-MethylTransferase*) (figure 8) (Vance and Walkey 1998, Li, Agellon and Vance 2005).

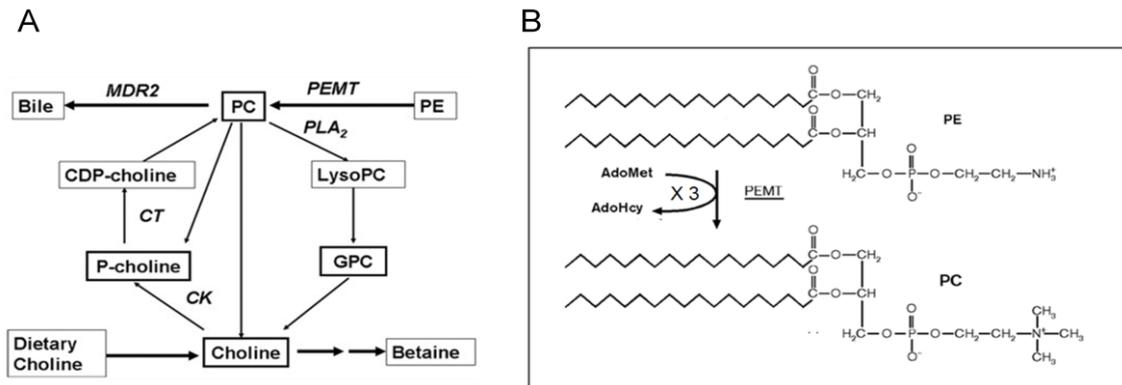


Figure 8 : Synthèse et homéostasie de la phosphatidylcholine (PC) dans le foie. (A) La choline est un nutriment essentiel apporté par l'alimentation. Elle est convertie en PC via la voie CDP-choline ou oxydée en bétaine. Dans le foie, la PC peut être générée aussi par la méthylation de la phosphatidyléthanolamine (PE) par la PE N-Methyltransferase (PEMT). P-choline : phospho-choline, CT : CTP -phosphocholine cytidyltransferase, PLA₂ : phospholipase A2, CK : choline kinase, GPC : glycerophosphocholine (Li et al. 2005). (B) Conversion de la PE en PC par la PEMT. AdoMet : S-adenosylmethionine, AdoHcy: S-adenosylhomocysteine (Vance and Walkey 1998), modifié.

PEMT est majoritairement exprimée dans le foie. Elle est responsable d'environ 30 % de la production de PC, les 70 % restants étant produits par la voie GDP-choline (Reo, Adinehzadeh and Foy 2002). La PMET est aussi couplée au catabolisme de la PC qui est l'unique voie de biosynthèse de la choline endogène (figure 8A). Lorsque des souris *Pemt* ^{-/-} sont privées de choline dans leur alimentation, la PC hépatique diminue de moitié et les souris meurent en 5 jours. Lorsque des souris à la fois *Pemt* ^{-/-} et *Abcb4* ^{-/-} sont soumises à ce régime, elles survivent au-delà de 90 jours, ce qui suggère que les souris uniquement *Pemt* ^{-/-} sont rapidement déplétées en PC en raison de l'activité d'*Abcb4* (Li et al. 2005).

I-3-3. La régulation des principaux constituants biliaries

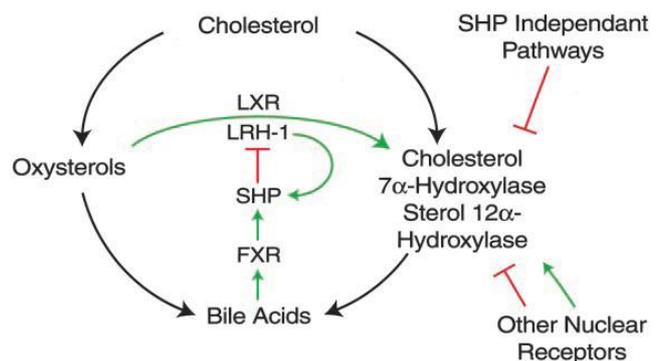
I-3-3-1. Régulation coordonnée de la synthèse des acides biliaries et du catabolisme du cholestérol

Le CYP7A1 intervient dans la première étape de la voie neutre de la biosynthèse des acides biliaries à partir du cholestérol. Cette étape est l'étape limitante (Russell and Setchell 1992). Les patients ayant un CYP7A1 muté ont un pool d'acides biliaries réduit (Pullinger et

al. 2002). La synthèse des acides biliaires est régulée par la quantité d'acides biliaires disponible. Lorsque les rats sont nourris avec des résines fixant les acides biliaires, le cycle entéro-hépatique est interrompu. Il en résulte une augmentation de l'expression du CYP7A1 et une synthèse des acides biliaires *de novo* (Jelinek et al. 1990). Inversement, quand les rats sont nourris avec un régime riche en acides biliaires, le CYP7A1 est réprimé (Heuman et al. 1988). De façon coordonnée, l'accumulation du cholestérol induit la synthèse d'acides biliaires par activation du CYP7A1. En fonction du taux relatif de cholestérol plasmatique et de la quantité d'acides biliaires dans l'organisme, le CYP7A1 est régulé négativement ou positivement grâce à différents facteurs de transcription (figure 9).

Dans les années 1980, un certain nombre de facteurs de transcription régulant l'expression des gènes des CYP7A1 et CYP8B1 (12 α -hydroxylase) ont été identifiés. Ces facteurs de transcription sont des récepteurs nucléaires.

Figure 9 : Régulation de la synthèse des acides biliaires par les récepteurs nucléaires. Les flèches noires indiquent les différentes voies par lesquelles le cholestérol est converti en acides biliaires. Les flèches vertes indiquent la régulation positive et les barres rouges indiquent la régulation négative de leur synthèse (Russell 2003).



La régulation négative de la synthèse des acides biliaires prévient leur accumulation toxique dans les voies biliaires. Elle est assurée par la fixation des acides biliaires en excès, principalement l'acide chénodésoxycholique (CDCA) (Makishima et al. 1999), sur FXR (*Farnesoid X Receptor*). Celui-ci active la transcription d'un second récepteur nucléaire : SHP-1 (*Short Heterodimeric Partner-1*). SHP se fixe et inhibe un troisième récepteur nucléaire, LRH-1 (*Liver Receptor Homologue-1*) qui active normalement l'expression des gènes des CYP7A1 et CYP8B1 (Goodwin et al. 2000). L'augmentation de la synthèse des acides biliaires est régulée par l'accumulation du cholestérol. Cette régulation positive est médiée par LXR α (*Liver X Receptor α*), un récepteur nucléaire activé après avoir fixé des

oxystérols dérivés du cholestérol (Janowski et al. 1996). Conjointement à LRH-1, LXR α stimule la transcription des CYP7A1 et CYP8B1 (figure 9).

LXR α et FXR doivent obligatoirement se dimériser avec RXR (*Retinoid X Receptor*) (figure 10). RXR est un partenaire commun d'hétérodimérisation avec de nombreux récepteurs. Il génère ainsi une grande diversité de réponses. Dans le foie, l'isoforme α de RXR est majoritaire (Russell 2003). Sa dimérisation avec divers récepteurs nucléaires permet d'exercer un contrôle transcriptionnel des gènes cibles en se fixant au niveau de leurs promoteurs respectifs, sur les éléments de réponse aux hormones (HRE). Ces HRE contiennent des régions répétées directes (DR) ou inversées (IR) reconnues directement par l'hétérodimère. Dans le cas du dimère FXR-RXR, il s'agit d'une IR-1, une séquence répétée inversée séparée d'un nucléotide (Laffitte et al. 2000). L'hétérodimère LXR α -RXR se fixe sur un élément de réponse distinct, le LXRE (*LXR Response Element*), contenant une région de type DR (Willy et al. 1995).

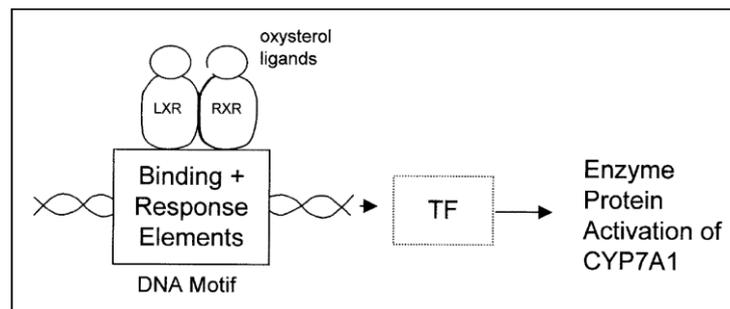


Figure 10 : L'hétéro-récepteur nucléaire LXR-RXR : lors de la fixation d'un oxystérol, LXR et RXR forment un hétérodimère pour permettre la transmission du signal. Un élément de réponse génique est reconnu, permettant au facteur de transcription (TF) d'activer la transcription du gène du CYP7A1 (Redinger 2003).

Le contrôle du catabolisme du cholestérol et de la synthèse des acides biliaires dépend donc des régulations coordonnées assurées par des récepteurs nucléaires et par la circulation entero-hépatique. Un pool constant et tolérable de sels biliaires dans les hépatocytes est ainsi maintenu. Cette régulation fine protège donc les hépatocytes des dommages que pourrait provoquer un excès de sels biliaires. Lorsqu'il y a une quantité toxique d'acides biliaires dans les hépatocytes, un autre récepteur, le SXR (*Steroid and Xenobiotic Receptor*) est activé. Il va induire l'expression du gène d'une autre enzyme de la famille P450, le CYP3A, qui peut hydroxyler et ainsi détoxiquer les acides biliaires en excès (Xie et al. 2001).

I-3-3-2. Régulation de la synthèse de la phosphatidylcholine

La régulation de l'expression des enzymes responsables de la production de PC est assez mal connue. La voie CDP-choline, majoritaire, est régulée par l'activité de la CTP-phosphocholine cytidyltransferase (CT). La CT serait modulée de façon physique par son interaction directe avec les bicouches lipidiques et jouerait ainsi un rôle clé dans le contrôle de la synthèse des lipides membranaires (Attard et al. 2000). L'expression de la PEMT serait sous contrôle oestrogénique. L'expression de la PEMT et son activité augmentent de façon dose-dépendante lorsque des hépatocytes en culture primaire sont traités avec du 17-beta-oestradiol (Resseguie et al. 2007). Au contraire, son expression est réprimée au niveau transcriptionnel par le facteur de transcription Sp1 (Cole and Vance 2010).

I-4. Les transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire

L'identité moléculaire des transporteurs des membranes des hépatocytes et des cholangiocytes est maintenant bien connue (annexe 2, page 132). Ces transporteurs, ainsi que ceux de la muqueuse intestinale, assurent le transfert des composants biliaires entre la lumière de l'intestin, le sang, les hépatocytes et la bile (Jansen and Faber 2007) (figure 11). Bien que les sels biliaires puissent diffuser à travers les membranes, les hépatocytes et les cellules de la muqueuse iléale expriment des protéines qui les pompent de façon active. Le NTCP (*Na⁺ Taurocholate Co-transporting Polypeptide*) est le principal transporteur des sels biliaires exprimé à la membrane sinusoidale des hépatocytes. Il utilise le gradient de sodium pour faciliter l'entrée des acides biliaires, principalement conjugués. ASBT (*Apical Sodium-dependent Bile salt Transporter*) assure la même fonction au niveau de la muqueuse iléale. Il transporte les sels biliaires présents dans la lumière intestinale et ouvre ainsi la voie du cycle entéro-hépatique. OST α et β (*Organic Solute Transporter*) forment des hétérodimères qui transportent les sels biliaires à travers la membrane de l'iléum, au pôle basal, et les libèrent dans la circulation portale. Au pôle sinusoidal, les hépatocytes disposent d'autres transporteurs indépendants du transport de sodium, les OATPs (*Organic Anion Transporter*), qui transportent les acides biliaires non-conjugués mais aussi la bilirubine et d'autres composés. Les acides biliaires sont ensuite sécrétés dans le canalicule biliaire par les transporteurs ABCB11/BSEP (*Bile Salt Export Pump*) pour les sels biliaires monovalents et ABCC2/MRP2 pour les sels biliaires divalents (Trauner and Boyer 2003). La PC est transportée par ABCB4 et le cholestérol par ABCG5/G8. ABCC2/MRP2 transporte les anions

inorganiques, en particulier la bilirubine. FIC1/ATP8B1 transloque des aminophospholipides, en particulier la phosphatidylsérine (PS). Il permet d'enrichir le feuillet interne de la membrane plasmique en PS et améliore ainsi la stabilité membranaire vis-à-vis des sels biliaires (Paulusma et al. 2006).

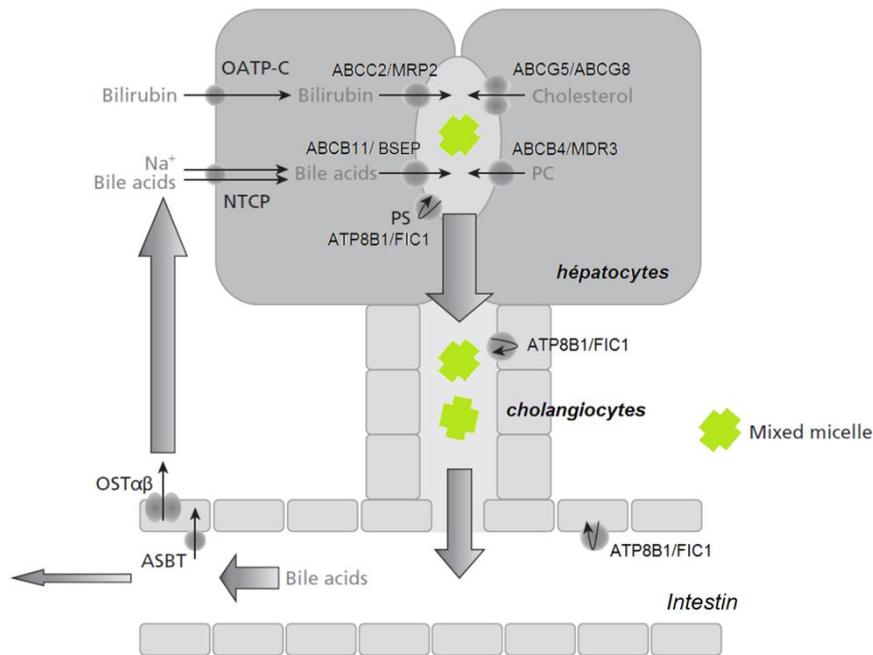


Figure 11 : Les principaux transporteurs impliqués dans la formation de la bile. Au niveau de la membrane sinusoïdale des hépatocytes, le transport des sels biliaires en provenance du sang est assuré par NTCP (Na^+ Taurocholate Co-transporting Polypeptide) et les OATPs (*Organic Anion TransPorter*). Depuis le cytosol, les acides biliaires sont sécrétés dans le canalicule biliaire par BSEP (*Bile Salt Export Pump*). Pour réaliser des micelles mixtes non toxiques, les transporteurs ABCB4 et ABCG5/G8 sécrètent respectivement la phosphatidylcholine et le cholestérol. Les micelles sont délivrées à la lumière intestinale par les canaux biliaires où ils émulsifient les lipides alimentaires pour faciliter leur absorption. Les cellules épithéliales intestinales réabsorbent la majorité des sels biliaires par le transporteur ABST (*Apical Sodium-dependent Bile salt Transporter*). Les sels biliaires ressortent des cellules grâce aux transporteurs OST (*Organic Solute Transporteur*) pour rejoindre le sang et boucler ainsi le cycle entéro-hépatique. PC : phosphatidylcholine, PS : phosphatidylsérine (Jansen and Faber 2007), modifié.

CHAPITRE II

Les transporteurs ABC liés aux fonctions hépatobiliaires

La sécrétion de la majorité des constituants de la bile est assurée par un système de transport actif à travers la membrane canaliculaire des hépatocytes. Ces pompes font partie de la super-famille des protéines à cassette fixant l'ATP : les transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*)

II-1. La super-famille des transporteurs ABC

ABCB4, le transporteur de phosphatidylcholine biliaire, appartient à la super-famille des transporteurs ABC et il est le quatrième membre de la sous-famille B. Les gènes ABC sont classés en sept sous-familles distinctes allant d'ABCA à ABCG. Cette classification est faite en fonction des similarités structurales entre les gènes, des homologies de séquences protéiques et d'analyses phylogénétiques (Dean, Rzhetsky and Allikmets 2001). Les transporteurs ABC sont des protéines transmembranaires retrouvées dans l'ensemble du monde du vivant. Certaines espèces possèdent de très nombreux représentants. Il existe par exemple 69 transporteurs ABC connus chez la bactérie *Escherichia coli* ce qui représentent 5 % de son génome codant (Linton and Higgins 1998) ; 28 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, 58 chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, 51 chez la mouche *Drosophila melanogaster* et 129 chez la plante *Arabidopsis thaliana*. Chez l'homme, 48 transporteurs ABC sont référencés (tableau III). Tous utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP (*Adenosine TriPhosphate*) pour transporter activement (c'est-à-dire dans des conditions thermodynamiquement défavorables) une large variété de molécules endogènes ou exogènes à travers les membranes de la cellule. Leur rôle est fondamental dans beaucoup d'aspects de la physiologie cellulaire : importation de nutriments, exportation de nombreux métabolites, génération d'énergie ou encore signalisation cellulaire (Linton 2007).

Les transporteurs ABC jouant un rôle majeur dans les fonctions hépatobiliaires font principalement partie des sous-familles ABCB (ABCB4 et ABCB11), ABCC (ABCC2) et ABCG (ABCG5/G8).

Tableau III : Les sept familles de gènes des transporteurs ABC humains : localisation chromosomique, lieux d'expression et fonction. D'après Dean et al (2001), modifié.

Gene	Alias	Location	Subfamily	Expression	Function
ABCA1	ABC1	9q31.1	ABC1	Ubiquitous	Cholesterol efflux onto HDL
ABCA2	ABC2	9q34	ABC1	Brain	Drug resistance
ABCA3	ABC3, ABCC	16p13.3	ABC1	Lung	
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	ABC1	Photoreceptors	N-retinylidene-PE efflux
ABCA5		17q24	ABC1	Muscle, heart, testes	
ABCA6		17q24	ABC1	Liver	
ABCA7		19p13.3	ABC1	Spleen, thymus	
ABCA8		17q24	ABC1	Ovary	
ABCA9		17q24	ABC1	Heart	
ABCA10		17q24	ABC1	Muscle, heart	
ABCA12		2q34	ABC1	Stomach	
ABCA13		7p11-q11	ABC1	Low in all tissues	
ABCB1	PGY1, MDR	7p21	MDR	Adrenal, kidney, brain	Multidrug resistance
ABCB2	TAP1	6p21	MDR	All cells	Peptide transport
ABCB3	TAP2	6p21	MDR	All cells	Peptide transport
ABCB4	PGY3	7q21.1	MDR	Liver	PC transport
ABCB5		7p14	MDR	Ubiquitous	
ABCB6	MTABC3	2q36	MDR	Mitochondria	Iron transport
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	MDR	Mitochondria	Fe/S cluster transport
ABCB8	MABC1	7q36	MDR	Mitochondria	
ABCB9		12q24	MDR	Heart, brain	
ABCB10	MTABC2	1q42	MDR	Mitochondria	
ABCB11	BSEP, SPGP	2q24	MDR	Liver	Bile salt transport
ABCC1	MRP1	16p13.1	CF/MRP	Lung, testes, PBMC	Drug resistance
ABCC2	MRP2	10q24	CF/MRP	Liver	Organic anion efflux
ABCC3	MRP3	17q21.3	CF/MRP	Lung, intestine, liver	Drug resistance
ABCC4	MRP4	13q32	CF/MRP	Prostate	Nucleoside transport
ABCC5	MRP5	3q27	CF/MRP	Ubiquitous	Nucleoside transport
ABCC6	MRP6	16p13.1	CF/MRP	Kidney, liver	
CFTR	ABCC7	7q31.2	CF/MRP	Exocrine tissue	Chloride ion channel
ABCC8	SUR	11p15.1	CF/MRP	Pancreas	Sulfonylurea receptor
ABCC9	SUR2	12p12.1	CF/MRP	Heart, muscle	
ABCC10	MRP7	6p21	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCC11	MRP8	16q11-q12	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCC12	MRP9	16q11-q12	CF/MRP	Low in all tissues	
ABCD1	ALD	Xq28	ALD	Peroxisomes	VLCFA transport regulation
ABCD2	ALDL1, ALDR	12q11-q12	ALD	Peroxisomes	
ABCD3	PXMP1, PMP70	1p22-p21	ALD	Peroxisomes	
ABCD4	PMP69, P70R	14q24.3	ALD	Peroxisomes	
ABCE1	OABP, RNS41	4q31	OABP	Ovary, testes, spleen	Oligoadenylate binding protein
ABCF1	ABC50	6p21.33	GCN20	Ubiquitous	
ABCF2		7q36	GCN20	Ubiquitous	
ABCF3		3q25	GCN20	Ubiquitous	
ABCG1	ABC8, White	21q22.3	White	Ubiquitous	Cholesterol transport ?
ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	4q22	White	Placenta, intestine, breast, gut	Toxin efflux, drug resistance
ABCG4	White2	11q23	White	Liver	
ABCG5	White3	2p21	White	Liver, intestine	Sterol transport
ABCG8		2p21	White	Liver, intestine	Sterol transport

II-1-2. La sous-famille ABCB (ou MDR/TAP)

La sous-famille B regroupe 11 transporteurs dont les protéines de type MDR (*MultiDrug Resistance*) et TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*). Les transporteurs ABC se structurent en deux modules répétés en tandem. La sous-famille ABCB est unique dans le sens où elle comprend à la fois des transporteurs entiers et des hémis-transporteurs (qui s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent pour être fonctionnels). Quatre transporteurs entiers et sept demi-transporteurs y sont répertoriés. Le premier transporteur ABC humain à avoir été cloné est ABCB1. Il est aussi nommé MDR1 (*MultiDrug Resistance protein 1*) ou encore plus couramment P-gP (*Permease glycoProtein*) car il affecte la

perméabilité des cellules vis-à-vis des drogues. Il a été caractérisé comme responsable du phénotype de résistance aux drogues dans les cellules cancéreuses (Juliano and Ling 1976), d'où son nom de «MDR». Dans le foie, il est impliqué dans l'excrétion biliaire de xénobiotiques. Il est aussi particulièrement exprimé au niveau de la barrière hémato-encéphalique. ABCB1 sert souvent de protéine modèle dans l'étude des transporteurs ABC.

ABCB4 (MDR3) et ABCB11 (*Bile Salt Export Pump* ou BSEP) sont elles aussi des protéines exprimées dans le foie et jouent un rôle essentiel dans la sécrétion biliaire. Elles sont responsables de pathologies comme les PFIC (*Progressive Familial intrahepatic cholestasis*). Les gènes de catégorie TAP comme ABCB2 et ABCB3 sont des hémi-transporteurs qui forment des hétérodimères. Ils jouent un rôle dans le système immunitaire en transportant des peptides dans le réticulum endoplasmique pour leur présentation aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.

II-1-3. La sous-famille ABCC (ou CFTR/MRP)

La sous-famille ABCC contient 12 transporteurs entiers incluant les MRP (*Multidrug Resistance-associated Protein*), les SUR (*SulfonylUrea Receptor*), et CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). Ces protéines jouent un rôle clé dans la détoxification, le transport ionique, ou en tant que récepteur. ABCC7/CFTR, par exemple, est un canal chlore dont les mutations sont à l'origine de la mucoviscidose (Riordan et al. 1989). Dans le foie, CFTR est exprimé dans l'épithélium biliaire, au niveau des cholangiocytes, où il stimule le flux biliaire par le passage d'ions chlorures (Strazzabosco 1997b).

Parmi les MRP, ABCC2/MRP2 est un transporteur du canalicule biliaire impliqué dans le transport des sels biliaires divalents tels que le tauro- et le glycolithocholate sulfaté (Trauner and Boyer 2003). Il tient aussi un rôle important de détoxification : il exporte des substances lipophiles conjuguées avec le glutathion, le sulfate ou le glucuronate comme la bilirubine et diverses toxines ou drogues endogènes et exogènes. Il participe ainsi au flux biliaire (Keppler, König and Büchler 1997). Des défauts de MRP2 sont à l'origine du syndrome de Dubin-Johnson.

II-1-4. La sous-famille ABCG (ou White)

La sous-famille ABCG contient 6 hémi-transporteurs inversés : le domaine de liaison de l'ATP se trouve du côté N-terminal et le domaine transmembranaire du côté C-terminal. Celle-ci se nomme aussi « White » car la plupart des gènes des transporteurs ABCG étudiés à

l'origine se trouvait sur le locus *white* de la mouche *Drosophila*, où la protéine *white* est impliquée dans le transport des précurseurs de pigments des yeux à facettes de l'insecte.

Les principaux membres impliqués dans la physiologie biliaire sont ABCG5 et ABCG8. Ils forment des hétérodimères et transportent des stérols. Ils permettent la sécrétion biliaire du cholestérol et contrôlent l'absorption intestinale des stérols (Yu et al. 2002). Un défaut de l'un ou de l'autre entraîne une systérolémie.

ABCG2/BCRP (*Breast Cancer Related Protein*) est aussi exprimé au niveau du canalicule biliaire (Maliapaard et al. 2001) et il forme un homodimère. Comme ABCB1 et ABCC2, il est impliqué dans l'excrétion biliaire de xénobiotiques (Elferink and Groen 2002).

II-2. Topologie des transporteurs ABC

II-2-1. Une organisation en domaines

Les transporteurs ABC ont une organisation structurale de base commune. Pour permettre l'exportation d'un ligand, les transporteurs ABC ont besoin d'au moins quatre domaines généralement organisés en deux moitiés homologues. Deux domaines hydrophobes et transmembranaires, les TMDs (*TransMembrane Domains*), forment la partie qui reconnaît le ligand. Deux domaines de liaison à l'ATP, les NDBs (*Nucleotide Binding Domains*), fournissent l'énergie nécessaire à la translocation du substrat grâce à l'hydrolyse des liaisons riches en énergie de l'ATP (figure 12). Certains transporteurs comportent des domaines auxiliaires, comme le domaine régulateur (R) d'ABCC7/CFTR ou le domaine transmembranaire supplémentaire (TMD0) localisé en N-terminal de la plupart des autres transporteurs ABCC.

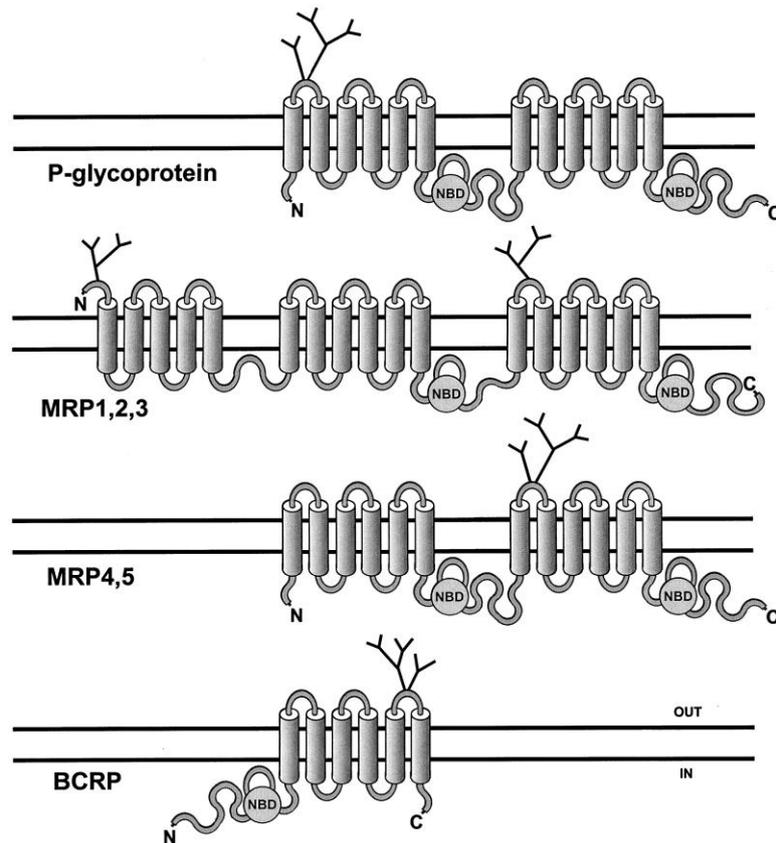


Figure 12 : Structure secondaire prédictive de quelques membres de la superfamille des transporteurs ABC. Quatre classes sont ici représentées. Elles sont basées à la fois sur la structure prédite et sur l'homologie des séquences d'acides aminés. (1) La P-glycoprotéine (ABCB1), comme ABCB4, est composée de deux domaines transmembranaires contenant chacun 6 segments transmembranaires, et deux *Nucleotide Binding Domains* (NBDs). Elle est N-glycosylée sur sa première boucle extracellulaire. (2) Les MRPs 1, 2 et 3 (ABCC1, 2 et 3) ont un domaine supplémentaire de 5 segments transmembranaires du côté N-terminal (TMD0). (3) Les MRPs 4 et 5 (ABCC4 et 5) n'ont pas ce domaine supplémentaire. (4) BCRP (ABCG2) est un héli-transporteur inversé, comme ABCG5 et ABCG8. Il est N-glycosylé sur la troisième boucle extracellulaire. Au contraire des autres transporteurs, le domaine NBD est du côté N-terminal et le domaine TMD est du côté C-terminal (Schinkel and Jonker 2003).

Les TMDs sont par nature très variables car ils sont spécifiques du substrat. Au contraire, les NBDs sont largement homologues entre les différents transporteurs ABC. Ces derniers possèdent trois motifs (séquences consensus) caractérisant la « cassette » de fixation de l'ATP :

- Les motifs Walker A et Walker B, communs à toutes les protéines liant l'ATP. Ils sont séparés l'un de l'autre par 90 à 120 acides aminés. C'est à ce niveau que se fixe et qu'est hydrolysé l'ATP. La séquence consensus du motif Walker A est G-(X)4-G-K-(T/S)-(X)6-I/V et celle du motif Walker B est R/K-(X)3-G-(X)3-L-(hydrophobe)4-D où X symbolise un acide aminé quelconque (Walker et al. 1982).

- La signature « C », exclusive de la famille des transporteurs ABC. Elle est toujours localisée entre les motifs Walker A et B : c'est la séquence « LSGGQ » (figure 13). Il existe aussi les boucles (riches en résidus aromatiques) D, H et Q qui sont spécifiques de cette famille (Linton 2007).

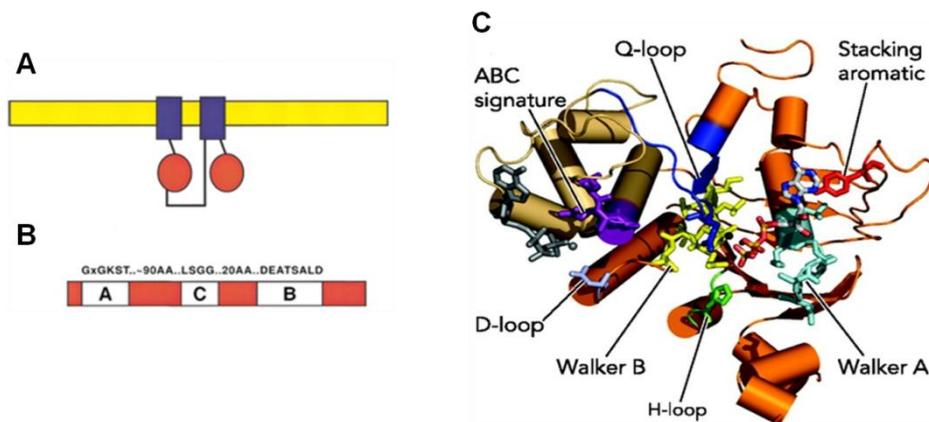


Figure 13 : Diagramme d'un transporteur ABC typique et disposition des motifs au sein d'un NBD. (A) Transporteur ABC représentatif disposé dans la bicouche lipidique. Les TMDs sont en bleu et les NBD en rouge. (B) Les NBDs contiennent les motifs Walker A et B communs à toutes les protéines fixant l'ATP. La signature « C » est spécifique des transporteurs ABC (Dean et al. 2001). (C) Les motifs disposés dans la structure d'un NBD. Deux NBDs doivent être face-à-face pour permettre la fixation de deux molécules d'ATP (Linton 2007).

II-2-2. Une structure adaptée à la fonction de transport

Les transporteurs ABC forment une grande famille de protéines transmembranaires très difficile à cristalliser pour des analyses structurales aux rayons-X. Ce problème a d'abord été résolu pour un transporteur ABC de la bactérie *Escherichia coli*, le MsbA. Celui-ci forme un homodimère et est homologue des MDRs. Il est impliqué dans le transport de la partie lipidique des lipopolysaccharides au niveau de la membrane externe. Les domaines transmembranaires ont chacun 6 segments en hélices- α qui traversent la bicouche lipidique et les deux NBDs forment une interface homodimérique dans le cytoplasme. La distribution asymétrique des résidus chargés forme une sorte de « poche » ou « cavité interne » qui suggère implicitement le mécanisme général de translocation du substrat des transporteurs ABC de catégorie MDR (Chang and Roth 2001).

Plus récemment, la structure de la P-gP de souris (qui partage 87 % d'identité de séquence avec la P-gP humaine et qui est aussi très proche d'ABCB4) a été obtenue aux rayons-X avec une résolution bien meilleure que les précédentes déjà réalisées au microscope électronique. La P-gP adopte une structure symétrique. La large cavité interne, qui accueille le

substrat, s'ouvre depuis le cytoplasme jusqu'au feuillet interne de la membrane plasmique (figure 14). La conformation structurale de la P-gP a aussi été étudiée en interaction avec des drogues. Il a été démontré l'existence de sites distincts pour la fixation des drogues au niveau de la cavité interne. La fixation des drogues est basée sur une stéréo-sélectivité qui met en jeu des interactions avec les résidus hydrophobes et aromatiques qui tapissent une cavité interne d'un volume de 6000 \AA^3 . Plusieurs de ces résidus sont très conservés, ce qui suggère un mécanisme commun de reconnaissance « multi-drogue » (Aller et al. 2009, Lee et al. 2002). Les deux NBDs sont séparés d'environ 30 \AA : cette interface suffit à la fixation de deux molécules d'ATP.

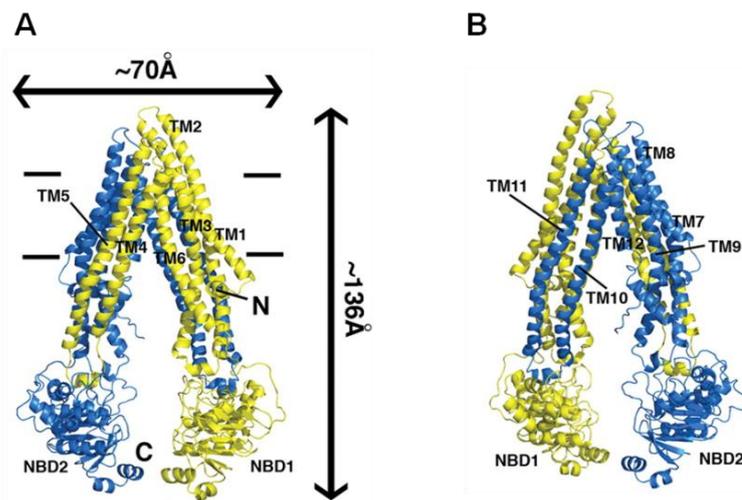


Figure 14 : Structure de la P-gP (ABCB1) de souris. (A) et (B) sont deux faces de la P-gP. La moitié N-terminale est en jaune, la moitié C-terminale en bleu. Les segments transmembranaires TM4-5 et TM10-11 se croisent pour former des interfaces combinées qui stabilisent la conformation de la face intérieure. Les traits horizontaux symbolisent la bicouche lipidique (Aller et al. 2009).

La disposition de la face interne de la P-gP ne permet pas un accès du substrat depuis le feuillet externe de la membrane plasmique (figure 15A). Le modèle proposé ici représente la conformation de la molécule avant la fixation du substrat. Le substrat peut accéder à la cavité par le feuillet interne de la membrane plasmique ou par le cytoplasme, ce qui va stimuler ensuite la fixation de l'ATP. L'ATP provoque la dimérisation des NBDs et un changement de conformation du transporteur. La cavité interne se trouve présentée vers l'extérieur, réduisant les contacts entre les résidus de la P-gP et le substrat. Cela provoque une diminution d'affinité et donc la libération du substrat vers l'extérieur de la cellule (figure

15B). La libération de l'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi) par hydrolyse de l'ATP assure enfin la réinitialisation du cycle de transport (Aller et al. 2009).

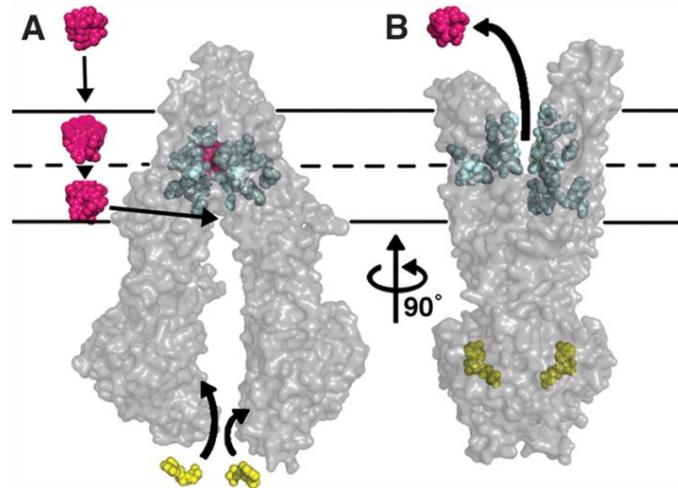


Figure 15 : Modèle du transport du substrat par la P-gP (ABCB1). (A) Le substrat (en magenta) traverse le feuillet externe de la membrane plasmique et entre dans la cavité interne au niveau du feuillet interne. Les résidus de la cavité interne (en bleu) interagissent avec le substrat. (B) L'ATP (en jaune) se fixe aux NBDs provoquant un important changement de conformation. La cavité interne ainsi que le substrat se retrouvent exposés du côté du feuillet externe de la membrane plasmique et de l'espace extracellulaire. Le substrat est expulsé (Aller et al. 2009).

L'inactivation de l'un des deux NBDs par la substitution d'un acide aminé ou par le piégeage à l'orthovanadate de l'ATP hydrolysé pendant le cycle catalytique inhibe la P-gP. Ceci montre que les deux NBDs interagissent fortement et qu'ils ne peuvent hydrolyser l'ATP indépendamment l'un de l'autre. L'hydrolyse des deux molécules d'ATP se fait alternativement, les deux NBDs ayant une affinité similaire pour l'ATP (Senior, al-Shawi and Urbatsch 1995). Ce modèle où les deux NBDs hydrolysent de façon alternative l'ATP durant le cycle catalytique a été généralisé pour d'autres transporteurs ABC, notamment CFTR (Senior and Gadsby 1997). Il existe malgré tout des exceptions à ce mécanisme : dans le cas de MRP1 par exemple, les deux NBDs ne sont pas équivalents. Une différence importante avec la P-gP est que l'inactivation du NBD1 (contrairement au NBD2) n'inactive pas totalement le transport des drogues (Gao et al. 2000).

II-2-3. Modifications co- et post-traductionnelles des transporteurs ABC

II-2-3-1. Ajout de chaînes glycosylées

La glycosylation commence dans le réticulum endoplasmique et se poursuit dans l'appareil de Golgi. ABCB1/P-gP est un transporteur glycosylé, comme beaucoup d'autres transporteurs ABC. Il possède 3 sites prédictifs de N-glycosylation dans la première boucle extracellulaire (les asparagines N-91, N-94 et N-99). La perte de cette glycosylation n'affecte pas l'activité de la protéine mais semble perturber son adressage ou sa stabilité à la membrane (Schinkel et al. 1993). Pour ABCC7/CFTR, la glycosylation ne semble affecter ni son trafic vers la membrane plasmique ni sa fonction, mais sa stabilité membranaire semble altérée (Chang et al. 2008). La N-glycosylation des transporteurs ABC est traitée de façon plus détaillée dans la partie III-2.

II-2-3-2. Formation de ponts disulfures

Les ponts disulfures intra- et intermoléculaires ont été principalement étudiés pour les hémi-transporteurs. La formation d'un pont disulfure entre deux résidus cystéines est catalysée par des oxydoréductases dans le réticulum endoplasmique. Elle a lieu en même temps que la glycosylation. ABCG2/BCRP est un des transporteurs les plus étudiés. Il se présente à la membrane plasmique sous forme d'un homodimère dont les deux sous-unités sont reliées entre elles par des ponts disulfures. La troisième boucle extracellulaire présente aussi un pont disulfure intrachaine. La formation des ponts disulfures ainsi que la N-glycosylation sont nécessaires pour assurer la stabilité du transporteur. La mutation des cystéines impliquées entraîne sa dégradation (Wakabayashi-Nakao et al. 2009).

II-2-3-3. Rôle de la phosphorylation

ABCB1/P-gP est phosphorylée dans plusieurs lignées cellulaires humaines ou de rongeurs, même sous sa forme recombinée, suggérant que cette phosphorylation est réalisée par une protéine kinase ubiquitaire. Une phosphorylation a lieu au niveau du « *linker* » faisant le lien entre le NBD1 et le TMD2. Celle-ci pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité de la P-gP, mais des difficultés liées au caractère aspécifique des activateurs et inhibiteurs des protéines kinases donnent des résultats difficilement interprétables (Germann 1996). La phosphorylation d'ABCC7/CFTR est mieux connue. Les phosphorylations sont réalisées au niveau des séquences consensus de phosphorylation du domaine régulateur (R), à la fois par la PKA (protéine kinase A) et par la PKC (protéine kinase C). La phosphorylation

de ce domaine régulateur et la fixation des molécules d'ATP contrôlent l'ouverture du canal (Seibert et al. 1997). La régulation de cette phosphorylation reste néanmoins complexe.

La phosphorylation peut aussi avoir un rôle dans le trafic intracellulaire, en particulier au moment de la réinternalisation du transporteur. Il a été montré que le motif « YYKLV » d'ABCB11/BSEP est nécessaire à son endocytose (Lam et al. 2011). De même la tyrosine 1424 de CFTR est importante pour l'endocytose car sa mutation en alanine ralentit considérablement la réinternalisation de la protéine (Prince et al. 1999). Des régulations impliquant la phosphorylation de tyrosines pourraient donc être importantes.

II-3. Le transporteur ABCB4/MDR3 : du gène à la protéine

Nommée à l'origine MDR3 (pour *MultiDrug Resistance protein 3*), la protéine ABCB4 est exprimée à la membrane canaliculaire des hépatocytes où elle permet la sécrétion biliaire de la phosphatidylcholine (PC). L'identification de ce transporteur a été faite grâce à l'étude de son très proche homologue ABCB1 (ou MDR1/P-gP), dont la fonction est tout à fait différente.

II-3-1. La « résistance multi-drogues » (MDR)

II-3-1-1. Découverte de la P-gP

Les études ont porté sur la compréhension des mécanismes de résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis des drogues utilisées en chimiothérapie. En effet, ces cellules deviennent résistantes aux traitements ce qui constitue un obstacle majeur pour les thérapies anticancéreuses. Afin d'élucider le phénomène de « *MultiDrug Resistance* » ou MDR, les premiers travaux se sont portés sur l'analyse d'une série de lignées cellulaires de hamster résistantes aux drogues. Il s'est avéré que, dans ces cellules, les concentrations intracellulaires en drogues diminuaient et que ce processus nécessitait de l'énergie. L'analyse des polypeptides membranaires a mis en évidence la forte expression d'une glycoprotéine membranaire de haut poids moléculaire (170 kDa) (Ling 1975, Ling, Carlsen and See 1977) et le lien entre la résistance aux drogues et cette protéine, baptisée gp170 ou P-gP (pour *Permease glycoProtein*), a été établi (Juliano and Ling 1976).

II-3-1-2. La petite famille mdr : des gènes fortement liés

Outre les modifications membranaires, le phénomène de résistance aux drogues entraîne un curieux changement au niveau du caryotype des cellules cancéreuses. En effet, leur noyau contient de l'ADN amplifié sous forme de chromosomes supplémentaires miniatures (aussi appelé « chromosome double minute ») ou de régions de fixation homogène (les « bandes » des chromosomes qui apparaissent après coloration). Ces aberrations chromosomiques augmentent massivement le nombre de copies d'un petit segment du génome (Schimke 1984). Grâce à la technique de renaturation de l'ADN sur gel d'agarose (Roninson 1983), les fragments d'ADN amplifiés ont été comparés sur des lignées de cellules de hamster indépendantes devenues résistantes aux drogues. Une région d'ADN commune d'environ 120 kilobases (kb) a été détectée et, fait remarquable, le nombre de copies de cette portion d'ADN était proportionnel à la résistance des cellules aux drogues (Roninson et al. 1984). Un gène d'environ 75 kb trouvé dans cette région a été classé dans le petit groupe de gènes nommé *pgp*. Le clonage de ce gène de hamster a montré qu'il codait pour un acide ribonucléique messager (ARNm) d'environ 5 kb et que le degré d'expression de cet ARNm était aussi proportionnel à la résistance des cellules aux drogues (Gros et al. 1986b, Gros et al. 1986a). En se servant d'une sonde dérivant du *pgp* de hamster, deux homologues de ce gène ont été mis en évidence dans des banques d'ADN complémentaire (ADNc) de souris et nommés *mdr1* et *mdr2*. Seul *mdr1* confère le phénotype MDR lorsqu'il est introduit dans des cellules sensibles aux drogues (Gros et al. 1986a, Gros et al. 1986c). De la même manière, deux gènes *mdr* homologues, d'abord appelés *MDR1* et *MDR2*, ont été identifiés dans les lignées cancéreuses humaines sélectionnées pour leur résistance aux drogues. Seul l'ARNm correspondant à *MDR1* était exprimé dans les lignées cellulaires résistantes. *MDR2* était co-amplifié avec *MDR1* dans quelques lignées sans que son expression ne soit détectée. Les deux gènes suivaient des réarrangements géniques très similaires sans que *MDR2* ne soit impliqué directement dans la résistance aux drogues. (Roninson et al. 1986).

L'utilisation d'une sonde très conservée dérivant de l'ADNc du *PgP* de hamster a permis de préciser le nombre de gènes *mdr* chez les rongeurs et chez l'homme. Il existe donc trois membres chez le hamster (nommés *pgp1* à 3), trois membres chez la souris (nommés *mdr1* à 3 avec éventuellement un « m » majuscule) et seulement deux membres chez l'homme (nommés *MDR1* et *MDR3*). Chez l'homme, il n'existe pas d'équivalent à *pgp2*. *MDR2* humain change de nom pour devenir *MDR3* car il partage plus de similarités avec *pgp3*. Ces différents gènes sont triés dans trois classes selon leur homologie. Il est intéressant de retenir que les gènes de la classe III n'apportent pas le phénotype MDR (Ng et al. 1989) (tableau IV).

Tableau IV : Classification des gènes *mdr/pgp*.

Espèce	P-glycoprotéine		
	Classe I	Classe II	Classe III
<i>Hamster</i>	<i>pgp1</i>	<i>pgp2</i>	<i>pgp3</i>
<i>Souris</i>	<i>mdr3 (mdr1a)</i>	<i>mdr1 (mdr1b)</i>	<i>mdr2</i>
<i>Homme</i>	<i>MDR1</i>	—	<i>MDR3 (MDR2)</i>

Les gènes des classes I et II sont impliqués dans la résistance des cellules aux drogues, contrairement aux gènes de la classe III. Les noms entre parenthèse sont les désignations alternatives, d'après (Ng et al. 1989, Juranka, Zastawny and Ling 1989, Lincke et al. 1991).

La co-amplification des gènes *mdr* dans des lignées de cellules résistantes aux drogues suggère que ces gènes sont apparus après un ou plusieurs événements de duplication au cours de l'évolution. Une observation supplémentaire renforce cette hypothèse : la structure intron/exon de *MDR1* et *MDR3* est identique (28 exons dont 27 qui codent pour la protéine fonctionnelle). Cette organisation structurale a été certainement fixée avant les événements de duplication (Lincke et al. 1991).

Ces gènes sont fortement liés sur le même chromosome (figure 16): chez la souris, le locus *mdr* occupe un fragment de 625 kb (Dhir, Buschman and Gros 1990) et chez l'homme il occupe entre 230 kb (Lincke et al. 1991) et 330 kb (Chin et al. 1989). Cette promiscuité entre les gènes explique qu'ils soient amplifiés ensemble lors du processus de sélection par les drogues, même si certains, comme *MDR3* humain, n'apportent pas le phénotype de résistance aux drogues (Gros et al. 1988, Juranka et al. 1989, Van der Bliet et al. 1988).

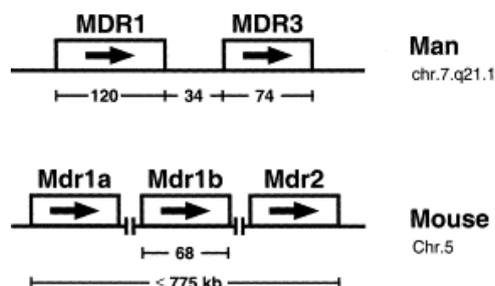


Figure 16 : Les locus *mdr* humain et murin. Les gènes sont très proches les uns des autres : ils sont amplifiés ensemble lors du processus de sélection par les drogues (Borst, Zelcer and van Helvoort 2000).

II-3-1-3. Les gènes *mdr* codent les P-gP

Les recherches menées sur la résistance des cellules aux drogues ont montré de façon indépendante que ce phénotype était lié à la fois à la surexpression de la protéine P-gP et à l'amplification des gènes *mdr*. La séquence peptidique prédite des gènes *mdr* correspondant à une glycoprotéine membranaire, il devenait évident que les gènes *mdr* codaient pour les P-gP. Le criblage des ADNc d'une lignée de cellule de hamster résistante aux drogues a permis d'isoler un clone codant la P-gP (Riordan et al. 1985). Ce clone s'hybride à une région de fixation homogène et le degré de l'amplification dans le génome correspond au degré de résistance aux drogues. La production d'un anticorps monoclonal (C219) permettant de détecter la P-gP a montré la corrélation entre la quantité d'expression de la protéine et le degré de résistance aux drogues (Kartner et al. 1985). De plus, dans une lignée cancéreuse humaine, l'expression conjointe du gène *MDR1* et de la protéine P-gP a permis d'établir que ce gène code pour cette protéine, l'ADNc de la P-gP s'hybridant avec l'ADNc de *MDR1* (Ueda et al. 1986).

II-3-1-4. Les P-gP sont fortement homologues entre elles

Les protéines codées par les gènes *mdr* sont hautement conservées et apparaissent dupliquées en tandem : chaque moitié consiste en six segments transmembranaires et un site de fixation de l'ATP. Chez la souris, l'analyse des séquences protéiques correspondant aux produits des gènes *mdr1*, *mdr2* et *mdr3* montre qu'elles sont fortement homologues (entre 85 et 92 % d'homologie). Chez l'homme la protéine MDR3 présente 77 % d'identité de séquence avec MDR1, les plus fortes homologues se situant au niveau des domaines TMDs et NBDs, les plus faibles au niveau de l'extrémité N-terminale et de la région de 60 acides aminés faisant le lien entre les deux moitiés de la protéine (la région « *linker* »).

II-3-2. MDR3 : une protéine peu adaptée à la résistance aux drogues

MDR3 porte donc son nom en référence à sa protéine sœur MDR1 même si elle n'apporte pas le phénotype de résistance aux drogues. Certains travaux montrent toutefois que MDR3 est capable de transporter de façon significative certaines drogues (Smith et al. 2000). Les multiples noms des P-glycoprotéines ABCB1/(MDR1)/Abcb1a(Mdr1a), Abcb1b(Mdr1b) et ABCB4(MDR3)/Abcb4(Mdr2) peut porter à confusion. Ces noms ont été donnés aux différents orthologues dans différentes espèces avant que la fonction protéique ne soit établie. La nomenclature ABC, plus limpide, sera dorénavant utilisée.

II-3-2-1. Distribution tissulaire et cellulaire d'ABCB4

Le produit des gènes *ABCB1* et *ABCB4* a des distributions tissulaires différentes. Au contraire d'*ABCB1*, qui est exprimé dans de nombreux tissus, *ABCB4* a une distribution plus spécifique. Les transcrits d'ARNm ainsi que la protéine *ABCB4* ont été quantifiés dans les différents organes. Son expression est largement restreinte au niveau du foie. Une forte expression y est retrouvée et la protéine est détectée par immuno-marquage au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes (Keitel et al. 2005, Buschman et al. 1992). Toutefois, une faible expression des transcrits ARNm est détectée dans les glandes surrénales, le cœur, les muscles striés, la rate, les amygdales, le placenta et le cerveau, mais les analyses en Western blot ne permettent pas de détecter la protéine (Cui et al. 2009, Smit et al. 1994, Kim, Weickert and Garner 2008, Patel et al. 2003, Augustine et al. 2005). Des anticorps de haute affinité (P₃II-26) ont permis de détecter *ABCB4* dans les glomérules rénaux (Scheffer et al. 2000).

II-3-2-2. Un épissage alternatif à l'origine de trois isoformes

Le transcrit du gène *ABCB4* humain comporte 4100 nucléotides (400 de moins que celui du gène *ABCB1*). Les trois ADNc correspondant à la protéine *ABCB4* identifiés dans une banque d'ADNc de foie témoignent d'épissages alternatifs de l'ARN pré-messager (Van der Blik et al. 1987). Au niveau peptidique, les longueurs diffèrent : l'isoforme A comporte 1279 acides aminés, l'isoforme B, 1286 acides aminés et l'isoforme C, 1232 acides aminés. Comparée à l'isoforme A prédominante, l'isoforme B possède un insert de sept acides aminés au niveau du NBD2. L'isoforme C comporte une délétion de 47 acides aminés au niveau du segment transmembranaire prédictif TM11, l'amputant donc en théorie de ce segment (annexe 3, page 133). Pour les isoformes B et C, l'existence de la protéine reste inconnue.

II-3-2-3. Une fonction de « floppase » de phospholipides

Les études d'hybridation avec des sondes spécifiques dans des lignées de cellules « MDR » ainsi que des expériences de transfection démontrent que, chez la souris, seule la surexpression d'*Abcb1a* ou d'*Abcb1b* est responsable du phénotype de résistance, contrairement à *Abcb4*. La réalisation de protéines chimériques entre les domaines transmembranaires d'*Abcb1* et les domaines de liaison à l'ATP d'*Abcb4* a montré que ce sont les domaines transmembranaires d'*Abcb1* qui confèrent à la protéine sa fonction de résistance aux drogues (Dhir et al. 1990). Les domaines cytoplasmiques ont pour rôle d'apporter l'énergie au transport. *Abcb4* est donc une pompe énergie-dépendante mais n'est pas un transporteur de drogues anticancéreuses. Sa distribution tissulaire (membrane canaliculaire

des hépatocytes, cellules B, cœur et muscle) suggérait qu'elle avait une fonction métabolique spécialisée. La génération de souris homozygotes *Abcb4* ^{-/-} a montré que ces souris développaient une maladie hépatique (ictère) causée par l'incapacité totale pour le foie de sécréter des phospholipides dans la bile. De plus, les souris hétérozygotes *Abcb4* ^{-/+} avaient un taux de phospholipides réduit de moitié. La fonction de ce transporteur était donc établie : il s'agit d'un transporteur de phospholipides (Smit et al. 1993b) (figure 17). Les capacités de floppase lipidique ont été confirmées chez les levures exprimant ABCB4 dans des vésicules sécrétoires (SVs). Dans ces levures, un analogue fluorescent de la phosphatidylcholine était capable d'être transloqué d'un feuillet de la bicouche lipidique à l'autre (Ruetz and Gros 1994). De la même façon, la translocation de la phosphatidylcholine a été étudiée sur des vésicules de la membrane canaliculaire d'hépatocytes de rat. La translocation de PC vers le feuillet externe des vésicules est ATP-dépendante et augmente en présence de taurocholate, un acide biliaire capable de former des micelles (Nies, Gatmaitan and Arias 1996).

En microscopie électronique, le foie des souris *Abcb4* ^{+/+} montre d'abondantes vésicules unilamellaires (cf figure 6) dans la lumière du canalicule biliaire. La quantité de vésicules chute à 55 % pour les souris *Abcb4* ^{+/-} et à 12 % pour les souris *Abcb4* ^{-/-} par rapport au niveau normal. De plus, lorsque la lignée de souris *Abcb4* ^{-/-} est « rétablie » avec l'insertion hétérozygote du gène ABCB4 humain, le nombre de vésicule redevient quasiment normal. La formation de ces vésicules dépend donc bien des phospholipides sécrétés par ABCB4/*Abcb4* (Crawford et al. 1997).

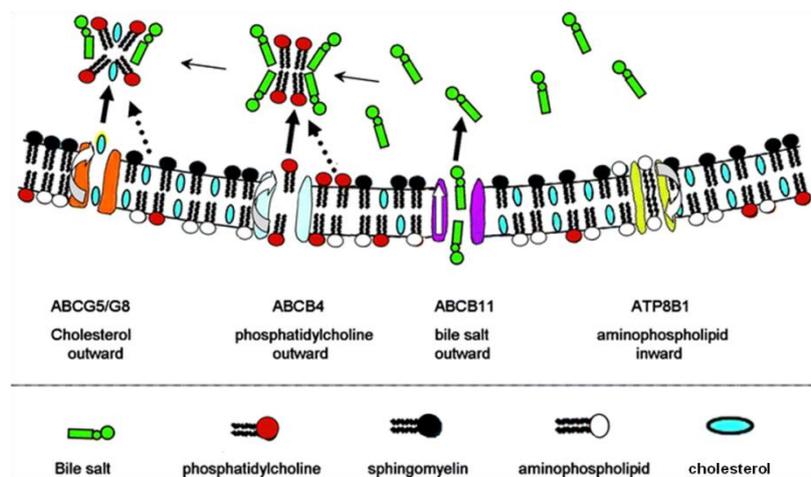


Figure 17 : Rôle d'ABCB4 dans la formation de la bile et mécanisme hypothétique de l'excrétion lipidique. La phosphatidylcholine est « floppée » du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane canaliculaire par ABCB4 et devient accessible pour l'extraction par les sels biliaires. Les autres transporteurs principaux impliqués dans la formation de la bile sont aussi représentés (Oude Elferink and Paulusma 2007), complété.

La sécrétion de phosphatidylcholine engendrée par ABCB4 dépend aussi de la présence de sels biliaires qui permettent l'extraction de la PC des membranes. En effet, dans des cellules HEK (*Human Embryonic Kidney*) transfectées de façon stable avec ABCB4, la sécrétion de PC augmente de façon importante en présence de taurocholate. ABCB4 permettrait la formation de micelles mixtes entre la phosphatidylcholine et le taurocholate (Morita et al. 2007). ATP8B1/FIC1 a une fonction complémentaire à celle d'ABCB4. En flippant la PS vers le feuillet interne, il contrecarre la déstabilisation membranaire provoquée par ABCB4 (figure 17) (Groen et al. 2011).

CHAPITRE III

Biosynthèse et trafic intracellulaire d'ABCB4

III-1. Régulation de l'expression d'ABCB4 : un contrôle transcriptionnel

Les mécanismes de régulation de l'expression d'ABCB4 sont très peu connus. Chez les rongeurs l'expression d'*Abcb4* au niveau transcriptionnel et protéique est fortement induite par les sels biliaires, en particulier le taurocholate et le taurodeoxycholate. A l'inverse, elle est diminuée par le cholestérol (Gupta et al. 2000). Ces observations suggèrent que l'expression d'ABCB4 pourrait être régulée au niveau transcriptionnel par le récepteur nucléaire FXR. Le cholate et le chénodésoxycholate sont aussi de forts activateurs du FXR. Dans le foie, FXR induit l'expression des gènes impliqués dans l'élimination des sels biliaires, en particulier d'ABCB11/BSEP, le transporteur canaliculaire des sels biliaires. A l'inverse, il inhibe l'expression de gènes impliqués dans la synthèse et la récupération des sels biliaires du cycle entéro-hépatique. Le rôle de FXR est montré par le GW4064, un agoniste artificiel de FXR, qui induit l'expression d'*Abcb4* dans les hépatocyte de rats en culture (Liu et al. 2003). De plus, une séquence répétée inversée du FXRE (*FXR Response Element*) est située en position distale du promoteur du gène ABCB4 humain, en position -1970 à -1958 (Huang et al. 2003).

FXR est donc un régulateur majeur du métabolisme biliaire en régulant l'expression du transporteur des sels biliaires ABCB11/BSEP et d'ABCB4.

III-2. Biosynthèse de la chaîne polypeptidique et N-glycosylation

La biosynthèse des transporteurs ABC destinés à la membrane des canalicules biliaires commence dans le réticulum endoplasmique (RE) où les molécules nouvellement synthétisées sont soumises à un contrôle qualité, puis traversent différents compartiments pour atteindre la membrane plasmique (figure 18). Le RE fournit un environnement optimal pour le repliement et la maturation des protéines naissantes. Les transporteurs ABC y sont cotranslationnellement transloqués par le complexe Sec61. Ce dernier forme le translocon sur lequel le ribosome vient se placer, à l'aide de la SRP (*Signal Recognition Particule*) et de son

récepteur, assurant ainsi le passage de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse à travers la membrane du RE (Matlack, Mothes and Rapoport 1998).

Avec leurs nombreux segments transmembranaires, les transporteurs ABC sont de type polytopique. La synthèse peptidique et l'insertion d'ABCB4 dans la membrane est probablement comparable à celle d'ABCB1 qui a été bien étudiée (Zhang and Ling 1991, Schinkel et al. 1993). L'insertion dans le RE commence grâce à une séquence signal interne qui n'est pas clivée et qui constituera le premier segment transmembranaire. La distribution des segments transmembranaires suivants est réalisée par des signaux de stop-transfert grâce à des séquences « spontanées » d'insertion membranaire. Dans la protéine finale, les extrémités N- et C-terminales sont localisées du côté cytoplasmique.

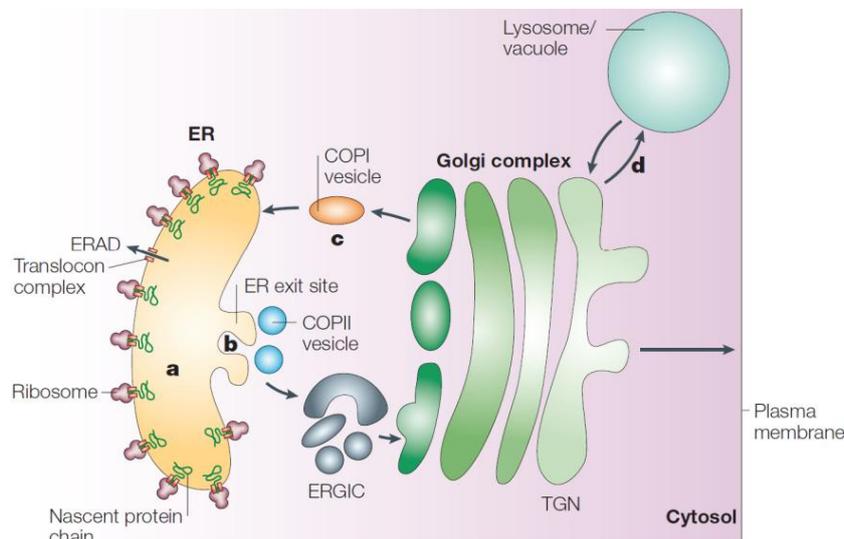


Figure 18 : Les compartiments de biosynthèse et de contrôle qualité. Le réticulum endoplasmique (ER) est le siège de la synthèse et de la maturation des protéines à destination de la membrane plasmique (zone « a »). Il contient des protéines chaperonnes qui aident au repliement et qui retiennent les protéines mal-conformées. Les protéines mal conformées sont retro-transloquées dans le cytosol pour être dégradées par le protéasome (procédé nommé *ER-Associated Degradation* ou ERAD). Les protéines ayant une conformation native quittent le RE par des vésicules de type COPII (zone « b ») à destination du ERGIC (*ER-Golgi Intermediate Compartment*) puis du cis-Golgi. Dans certains cas, les protéines mal conformées échappées du RE sont retournées vers le RE par des vésicules de type COPI (zone « c »). Depuis le cis-Golgi, les protéines passent dans le TGN (*Trans-Golgi Network*) avant d'atteindre la membrane plasmique. Les protéines non-natives ayant atteint le Golgi sont dégradées par le système lysosomal (« zone « d » ») (Ellgaard and Helenius 2003).

ABCB4, comme ABCB1, est N-glycosylée. ABCB4 possède deux sites de N-glycosylation dans la première boucle extracellulaire (EC1) en position 91 et 97 (figure 19) alors qu'ABCB1 en possède trois (Schinkel et al. 1993). La N-glycosylation est un processus cotraductionnel qui commence par la reconnaissance du motif Asn-X-Thr/Ser (où X est un

acides-aminé quelconque excepté la proline) par l'oligosaccharyltransferase. Celle-ci transfère un oligosaccharide précurseur ou « core-oligosaccharide » sur l'asparagine. Le core-oligosaccharide est constitué de deux N-acetylglucosamines, neuf mannoses et trois glucoses : Glc3Man9GlcNAc2 (figure 20A). Les glucosidases I et II interviennent ensuite séquentiellement pour enlever les trois molécules de glucose. Si le repliement de la chaîne peptidique est correct, la maturation des chaînes glycanes se poursuit dans les compartiments golgiens (figure 18).

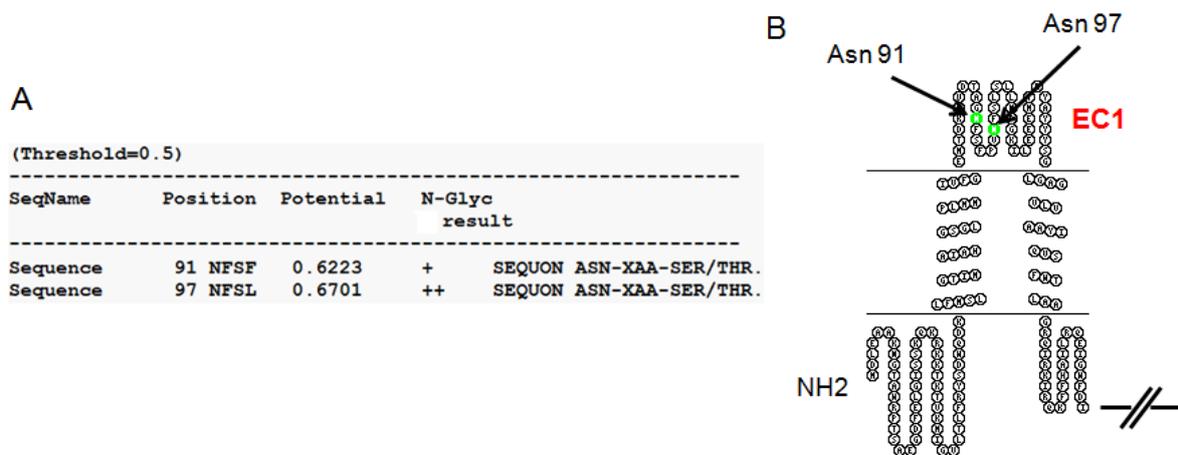


Figure 19 : Sites prédictifs de N-glycosylation d'ABCB4 et leur localisation dans la structure protéique, d'après *NetNGlyc1.0Server-prediction results* (A) et *TOPO 2* (B).

L'analyse électrophorétique et la sensibilité à l'endoglycosidase H (EndoH) permettent d'apprécier le stade de maturation des chaînes glycanes. ABCB1 exprimé dans des cellules HEK293 migre sous deux formes de masse moléculaire différentes : une bande d'environ 170 kDa et une bande d'environ 150 kDa (Loo and Clarke 1993). La forme de 150 kDa est le précurseur core-glycosylé « immature » (riche en mannose) et sensible à la digestion par l'EndoH et la forme de 170 kDa est la forme glycosylée de façon complexe, « mature » et insensible à la digestion par l'EndoH (Cheng et al. 1990). La sensibilité à l'EndoH des différentes formes d'ABCB1 et d'un mutant retenu dans le RE est montrée sur la figure 20B. La forme de haut poids moléculaire est sortie du RE en empruntant des vésicules de transport (de type COPII), et a franchi le compartiment ERGIC (*ER-Golgi Intermediate Compartment*). Elle a au moins atteint la citerne cis/médiane de l'appareil de Golgi pour y finir sa maturation (figure 18).

La N-glycosylation joue un rôle dans le repliement, le trafic et surtout la stabilité des transporteurs à la membrane. Le transporteur ABCB11/BSEP possède quatre sites de N-glycosylation. Des délétions progressives des sites de glycosylation ont montré qu'il en fallait au moins deux pour garantir sa stabilité (Mochizuki et al. 2007). De même, lorsque les deux sites de glycosylation de CFTR sont mutés, la stabilité du transporteur est réduite tandis que sa réinternalisation et dégradation sont accélérées (Glozman et al. 2009). En revanche, la N-glycosylation n'aurait pas d'influence sur l'activité, comme le suggère l'utilisation d'inhibiteurs de glycosylation ou de mutants de délétions des sites prédictifs de N-glycosylation d'ABCB1 et de CFTR (Schinkel et al. 1993, Chang et al. 2008).

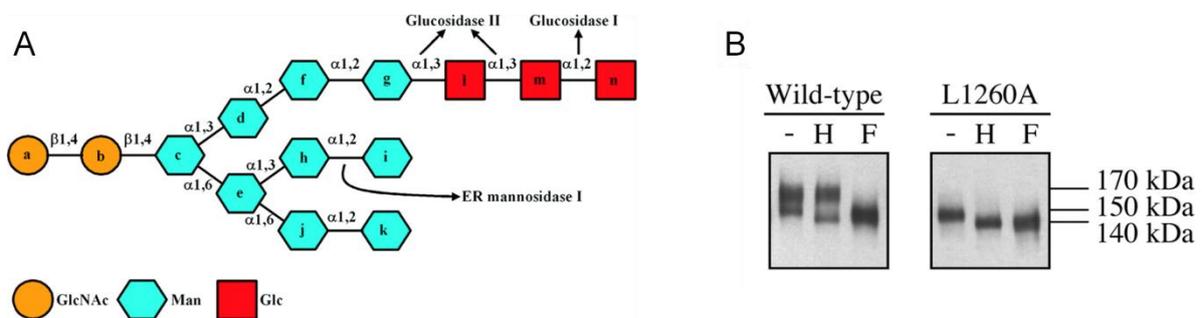


Figure 20 : (A) La structure du « core-oligosaccharide ». (Caramelo and Parodi 2008). **(B) Profil électrophorétique et sensibilité à l'EndoH d'ABCB1.** La protéine sauvage (WT) migre sous deux formes. Seule la bande de 150 kDa, immature, est sensible à l'EndoH (H). Le mutant L1260A montre une seule bande de 150 kDa, immature et sensible à l'EndoH. La PNGaseF (F) est une endoglycosidase qui clive les N-glycosylations aussi bien riches en mannoses (immatures) que complexes (matures) (Loo, Bartlett and Clarke 2005c), modifié.

III-3. Repliement et contrôle qualité

La conformation native de la protéine est dictée par la séquence peptidique. Bien que le repliement protéique puisse avoir lieu de façon spontanée *in vitro* par des mouvements liés aux effets hydrophobes, dans la cellule, de nombreux acteurs interviennent pour contrôler ce processus (Yon and Betton 1991). Le repliement et les modifications co-translationnelles (glycosylation, assemblage et formations des ponts disulfures) sont assurés par les nombreuses enzymes et protéines chaperonnes résidentes du RE.

III-3-1. Les protéines chaperonnes

Le contrôle qualité des protéines est un mécanisme général qui fait intervenir plusieurs protéines spécialisées dans l'aide au repliement : les protéines chaperonnes. Les chaperonnes

ont des fonctions spécialisées et des localisations spécifiques. Elles sont classées dans plusieurs familles. Certaines sont des protéines résidentes du RE (tableau V), d'autres sont présentes dans le cytosol.

III-3-1-1. Les protéines chaperonnes résidentes du RE

Les chaperonnes assurent deux fonctions : assister les protéines pour un repliement normal et cibler celles qui ne se sont pas repliées correctement (Kleizen and Braakman 2004, Krebs et al. 2004, Schülein 2004). Elles garantissent ainsi que seules les protéines correctement repliées quittent le RE. Les chaperonnes présentes dans la lumière du RE (calnexine, calréticuline, Bip/Grp78, PDI/Erp57) sont bien caractérisées. Elles ont pour rôle d'assister le repliement des protéines et d'identifier les formes mal conformées pour les diriger vers la dégradation. Les formes mal repliées exposent fréquemment des régions hydrophobes susceptibles de s'agréger. Ce sont ces régions hydrophobes qui sont principalement reconnues par les mécanismes de contrôle qualité (Buchberger, Bukau and Sommer 2010).

Tableau V : Les protéines chaperonnes résidentes du RE et leurs fonctions (Hebert and Molinari 2007).

Family	Protein	Function
Hsp40	ERdj1/Mtj1 ERdj2/hSec63 ERdj3/HEDJ/ERj3/ABBP-2 ERdj4/Mdj1 ERdj5/JPD1	Cofactors for Hsp70
Hsp60	None	
Hsp70	GRP78/BiP	Conventional chaperone
Hsp90	GRP94/endoplamin/ERp99	Conventional chaperone
Hsp100	Torsin A?	?
GrpE-like	BAP/Sil1 GRP170	Cofactors for Hsp70
Lectins	Calnexin Calreticuline EDEM1, EDEM2, EDEM3	Glycoprotein-dedicated chaperones

La calnexine (CNX) qui est transmembranaire, et la calréticuline (CRT) qui est son homologue soluble, sont toutes deux des lectines calcium-dépendantes particulièrement impliquées dans le contrôle qualité des N-glycoprotéines (figure 21).

Elles reconnaissent les chaînes monoglucosylées après action des glucosidases I et II bien qu'elles puissent aussi interagir avec certains déterminants peptidiques (Loo and Clarke 1995). CNX et CRT comportent un domaine globulaire consistant en un site de fixation des

sucres et un bras (le *P-domain*) au bout duquel est présenté ERp57, un membre de la superfamille des protéines disulfides isomérases (PDI) qui catalysent la formation des ponts disulfures. Lorsque le dernier glucose est éliminé par la glucosidase II, le peptide se dissocie de la CNX/CRT. Si la conformation normale (native) est acquise, la protéine quitte le RE par des vésicules à destination du ERGIC puis de l'appareil de Golgi. Dans le cas contraire, l'enzyme UDDP (*UDP-glucose-glycoprotein glucosyltransferase*) rajoute une molécule de glucose sur la protéine qui est de nouveau reconnue par la CNX ou CRT, ce qui prolonge sa présence dans le RE. Le cycle de déglucosylation/glucosylation peut s'effectuer plusieurs fois jusqu'à l'adoption d'une conformation correcte. Le mécanisme par lequel l'UDDP reconnaît les glycoprotéines mal-repliées est mal connu, mais il pourrait s'expliquer par la présence des domaines hydrophobes exposés vers l'extérieur (Sousa and Parodi 1995). Si le mauvais repliement persiste, l' α 1,2-mannosidase I enlève le premier mannose de la branche centrale du core-oligosaccharide qui devient Glc1Man8NAc2. La protéine est alors ciblée par EDEM (*ER Degradation-Enhancing α -Mannosidase-like*), une autre lectine, qui va irréversiblement exclure le peptide du cycle CNX/CRT. Il est déglycosylé, retro-transloqué dans le cytosol (via Sec61), et dégradé par le système ERAD (*ER Associated Degradation*) qui met en jeu le protéasome (Ruddock and Molinari 2006, Ellgaard and Frickel 2003).

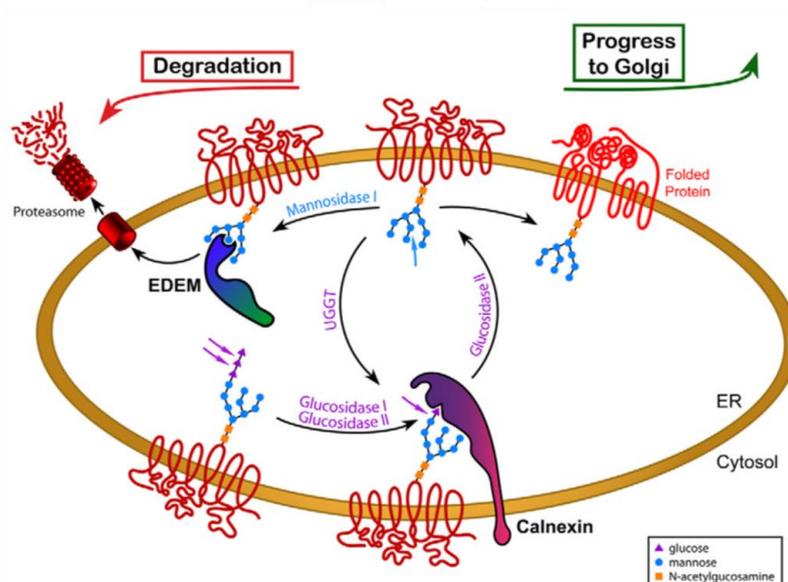


Figure 21 : Le cycle de la calnexine. La calnexine (comme la calréticuline) reconnaît les glycoprotéines en cours de repliement et monoglucosylées. Lorsque le repliement est achevé, la glucosidase II retire la molécule de glucose. Si la conformation est correcte, la protéine « riche en mannose » peut poursuivre sa maturation vers l'appareil de Golgi. Dans le cas contraire, l'UGGT intervient pour rajouter un glucose et la protéine recommence le cycle. Si le mauvais repliement n'est pas corrigé, la protéine est retro-transloquée dans le cytosol et dégradée par le protéasome (Chang et al. 2008), modifié.

III-3-1-2. Les protéines chaperonnes cytosoliques

Les chaperonnes cytosoliques agissent conjointement avec les chaperonnes du RE pour faciliter le repliement des protéines (Figure 22). La majorité des chaperonnes cytosoliques fait partie de la famille des protéines de choc thermique Hsp (Heat shock proteins) où en particulier Hsc70/Hsp70 et Hsp90 jouent des rôles majeurs. Les Hsp interagissent avec les protéines en formation au niveau de courts domaines hydrophobes et utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour enfouir le « cœur » hydrophobe à l'intérieur de la structure protéique (Goloubinoff and De Los Rios 2007). Elles sont synthétisées de façon constitutive et induites lors d'un stress. Elles agissent en synergie avec de nombreux facteurs et co-chaperonnes (Young et al. 2004), formant de véritables chaperonnes multimériques (tableau VI).

Tableau VI : Fonction cellulaire de Hsp90-Hsp70 et quelques-uns de leur co-chaperonnes/co-facteurs connus (Wegele, Müller and Buchner 2004), modifié.

Human	Interaction	Cellular function	Hsp70 co-factor	Hsp90 co-factor
Hsp90	Via Hop/Sti1	Chaperone	-	-
Hsp70	Via Hop/Sti1	Chaperone	-	-
Hop	TPR	Complex assembly	+	+
p23	Direct	Substrate-release/ complex assembly	-	+
TTC4	TPR	Function unknown	+	+
FKBP52	TPR	Prolylisomerase	-	+
FKBP51	TPR	Prolylisomerase	-	+
Cyp40	TPR	Prolylisomerase	-	+
Hdj1	Direct	Chaperone, ATPase activator	+	-
Bag1	Direct	Nucleotide release	+	-
CHIP	TPR	Ubiquitin ligase	+	+
PP5	TPR	Phosphatase	-	+
XAP2	TPR	Prolylisomerase-related protein	-	+
Cdc37/p50	Direct	Signal transduction	-	+
Aha1	Direct	Hsp90 ATPase regulator	-	+

Par exemple Hsc70 (*Heat shock cognate 70*) est exprimée de façon constitutive tandis que Hsp70 est la forme induite. Hsc70/Hsp70 est une chaperonne ubiquitaire très conservée qui interagit avec de très nombreux substrats, aussi bien au niveau de la chaîne polypeptidique complètement dépliée que de la protéine native et même à l'état agrégé (Mayer and Bukau 2005). Elle reconnaît de courts segments peptidiques enrichis en résidus hydrophobes et basiques (Rüdiger, Buchberger and Bukau 1997). Hsc70/Hsp70 fonctionne en synergie avec diverses co-chaperonnes qui lui confèrent des activités spécifiques. Hdj-1 (*Human DnaJ*

homolgs 1) et Hdj-2 sont des co-chaperonnes qui stimulent l'hydrolyse de l'ATP de Hsc70/Hsp70. Elles font partie de la famille des Hsp40. Il a été montré qu'elles agissent ensemble pour faciliter les premières étapes du repliement de CFTR en formant un complexe stable (Farinha et al. 2002, Meacham et al. 1999) (figure 22).

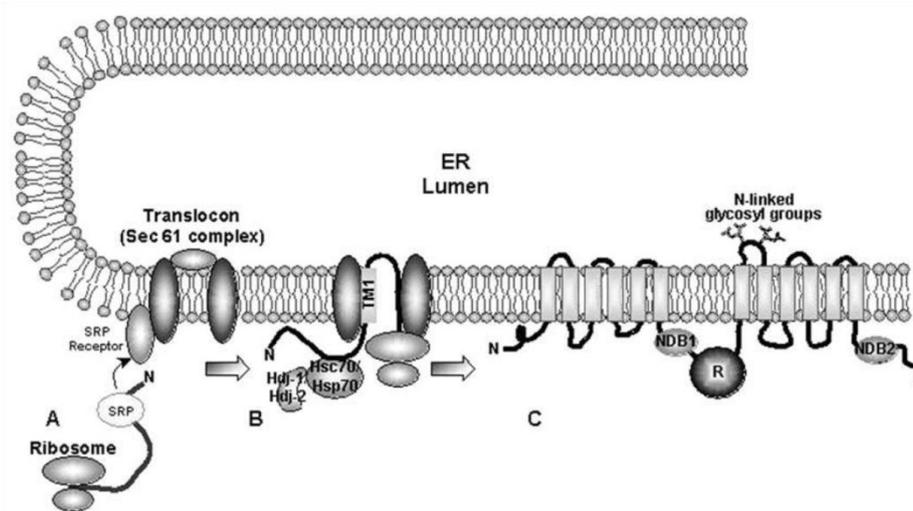


Figure 22 : Modèle de biosynthèse d'ABCC7/CFTR et son interaction avec Hsp70/Hdj-1 pour l'aide au repliement. La biosynthèse de la chaîne polypeptidique de CFTR est initiée par le ribosome qui est ciblé vers la membrane du RE grâce à la SRP et à son récepteur. La traduction a lieu à travers le complexe Sec61. La chaîne polypeptidique émergente est co-traductionnellement insérée dans la membrane du RE à l'aide de séquences signal et stop-transfert successives. Du côté cytosolique, la chaperonne Hsc70 et ses co-chaperonnes Hdj-1 et Hdj-2 assistent au repliement (Amaral 2004).

CHIP (*Carboxyl terminus of Hsc70-Interacting Protein*) est une co-chaperonne de Hsc70 ayant une activité ubiquitine-ligase (E3 ligase). Hsc70 et CHIP s'associent pour former un facteur de dégradation qui oriente les protéines mal conformées vers le système ubiquitine-protéasome, comme cela a été montré dans le cas de CFTR (Meacham et al. 2001). HspBP1 (*Hsp Binding Protein 1*), une autre co-chaperonne, module le ciblage du substrat vers la dégradation en inhibant l'activité de CHIP (Alberti et al. 2004).

BAG-1 est un facteur d'échange nucléotidique qui stimule le désassemblage de Hsc70 de son substrat. Dans le cas de CFTR, si BAG-1 intervient au cours de la traduction, il provoque le ciblage du transporteur vers la dégradation en bloquant l'action pro-repliement de Hsc70/Hsp40. Au contraire, s'il intervient après la traduction, il favorise la voie de la maturation en bloquant l'action pro-ubiquitination de Hsc70/CHIP (Matsumura, David and Skach 2011). Hsc70/Hsp70 a donc une action d'aide au repliement qui peut être

contrebalancée par le ciblage des protéines mal conformées vers la dégradation, selon les chaperonnes avec lesquelles elle s'associe.

Hsp90 fonctionne de la même manière que Hsc70 et possède aussi ses co-chaperonnes, dont certaines communes avec Hsc70, telles que CHIP (Connell et al. 2001). L'association directe d'Hsp90 avec les molécules de CFTR en cours de synthèse a été démontrée. Hsp90 aide aussi au repliement des domaines cytoplasmiques. Son inhibition bloque la maturation et provoque la dégradation du transporteur (Loo et al. 1998). La co-chaperonne Aha1, associée à Hsp90, a un effet inhibiteur et entraîne la dégradation de CFTR Δ F508 (Wang et al. 2006a).

Il faut noter enfin que le statut de repliement des transporteurs ABC est vérifié par le contrôle qualité de façon séquentielle. Il a été montré, dans le cas de CFTR, que le complexe Hsc70/RAM1 (une autre E3 ligase) agit au cours de la traduction pour reconnaître les défauts de repliement, alors que le complexe Hsc70/CHIP agit plutôt après la traduction (Grove et al. 2011).

La plupart de ces chaperonnes ne sont pas spécifiques et interviennent probablement dans le repliement d'ABCB4. Dans le cas d'ABCB1, des interactions ont été rapportées avec la calnexine et Hsc70. La calnexine interagit avec les domaines transmembranaires et Hsc70 avec les domaines NBDs (Loo et Clarke, 1995). L'interaction de certains mutants d'ABCB1 avec la calnexine est même prolongée, montrant l'importance du rôle de la calnexine dans le contrôle qualité (Loo and Clarke 1994). Les nombreux travaux portant sur CFTR et le mutant Δ F508 ont permis d'identifier trente-et-une chaperonnes et co-chaperonnes formant un véritable « chaperome » (figure 23) autour du CFTR. Plusieurs de ces chaperonnes interagissent préférentiellement avec le mutant (Wang et al. 2006a). Les interactions de CFTR avec la calnexine (Pind, Riordan and Williams 1994) et Hsp70 (Yang et al. 1993) ont été clairement démontrées.

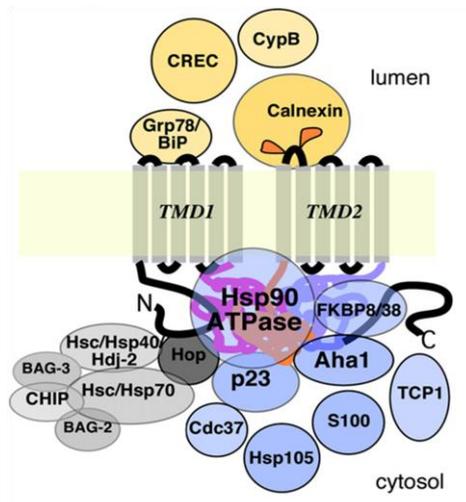


Figure 23 : Le « chaperome » d'ABCC7/CFTR. Les chaperonnes et cofacteurs du repliement sont représentés. En jaune les composants luminaux, en gris et en bleu, les composants cytosoliques (Wang et al. 2006a).

III-3-2. Anomalie de repliement des protéines mutées

Un défaut de repliement est une anomalie fréquemment observée dans les maladies génétiques. La substitution d'un seul acide-aminé peut entraîner un repliement non natif reconnu par le contrôle qualité du RE. Un défaut de repliement peut avoir pour conséquence une plus grande sensibilité aux protéases car la protéine expose des sites normalement masqués.

Les mutants conformationnels peuvent aussi s'accumuler dans la cellule et former des agrégats pouvant être toxiques en provoquant un stress cellulaire. Ils sont à l'origine de nombreuses pathologies, neurodégénératives notamment (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson...). Les agrégats forment des corps d'inclusions (agrésomes) devenant résistants à la digestion par les enzymes protéasomales. Le système de macro-autophagie/lysosome prend alors le relais pour les dégrader. (Kubota 2009). La formation de tels agrégats concerne plutôt les protéines cytosoliques et aucun exemple concernant l'agrégation physiologique ou pathologique de transporteur ABC n'est encore connu. En revanche l'agrégation de mutants conformationnels de transporteurs ABC peut être induite artificiellement par surexpression ou par inhibition du protéasome. L'agrégation a lieu quand les capacités de dégradation du protéasome sont dépassées. Les protéines s'accumulent en des formes de haut poids moléculaire poly-ubiquitinylées et résistantes aux protéases et aux détergents. Les agrégats sont ensuite stockés au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC), formant les agrésomes avec une protéine des filaments intermédiaires, la vimentine (Johnston, Ward and Kopito 1998).

L'abaissement de la température est un moyen de favoriser le repliement natif d'une protéine. L'abaissement de la température à 26°C permet de restaurer le trafic et l'expression membranaire de CFTR Δ F508 qui, une fois rétabli à la membrane, est actif (Denning et al. 1992). De la même façon, l'abaissement de la température rétablit l'expression membranaire et l'activité de mutants d'ABCB1 (Loo and Clarke 1994). L'effet de l'abaissement de la température pourrait être de ralentir les étapes du repliement, ce qui favoriserait l'enfouissement des parties hydrophobes exposées et permettrait aux mutants d'échapper à la dégradation.

III-4. Trafic intracellulaire d'ABCB4 dans les hépatocytes

L'expression et l'activité des transporteurs à la membrane des canalicules biliaires dépendent non seulement de leur biosynthèse mais aussi de leur trafic intracellulaire. Des études récentes montrent que la quantité de chacun des transporteurs à la membrane canaliculaire est régulée en fonction des demandes physiologiques et que ce processus dépend d'un transport via le réseau de microtubules (Gatmaitan, Nies and Arias 1997).

III-4-1. Un ciblage polarisé

Les hépatocytes se polarisent en formant des domaines membranaires fonctionnels distincts constitués d'un pôle sinusoidal (basolatéral) et d'un pôle canaliculaire (apical). Deux voies de trafic sont utilisées pour délivrer les protéines membranaires à la membrane canaliculaire. La plupart des protéines à destination de la membrane canaliculaire passent d'abord par la membrane basolatérale avant de rejoindre le canalicule biliaire par transcytose (Schell et al. 1992, Bartles et al. 1987, Slimane et al. 2003). Cette voie de trafic indirecte ne s'applique pas pour les transporteurs ABC nouvellement synthétisés. Par des expériences de pulse-chase, de purification de compartiments subcellulaires (Golgi, membrane basolatérale, membrane apicale) et d'immunoprécipitations, il a été montré qu'après leur synthèse, ABCB1, ABCB4 et ABCB11 sont directement adressés au pôle canaliculaire. ABCB11 rejoint le pôle apical plus lentement qu'ABCB1 et ABCB4 car il est séquestré temporairement dans un « réservoir » intracellulaire (Kipp and Arias 2000).

III-4-2. Stabilité membranaire, recyclage et réservoir intracellulaire

Les expériences menées chez le rat montrent que la sécrétion biliaire est significativement augmentée par l'infusion de taurocholate ou sous l'effet de l'AMP cyclique (AMPc). L'augmentation du flux biliaire est directement liée à l'augmentation rapide de la quantité des transporteurs ABC au niveau de la membrane canaliculaire. Le trafic des transporteurs ABC au canalicule biliaire induit par l'AMPc ou le taurocholate est une réponse physiologique à une demande temporelle de sécrétion biliaire. Le taurocholate et l'AMPc augmentent d'environ trois fois la quantité de transporteurs à la membrane canaliculaire. Cette augmentation d'expression membranaire peut être inhibée par la colchicine, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, prouvant que le réseau de microtubules intervient dans l'adressage apical des transporteurs (Gatmaitan et al. 1997). Un prétraitement des rats avec de la cycloheximide (un inhibiteur de la protéosynthèse) n'empêche pas l'augmentation de l'expression canaliculaire des transporteurs après administration de taurocholate ou d'AMPc. Cela démontre que l'augmentation de la quantité de transporteurs au canalicule ne résulte pas d'une augmentation de la transcription ou de la traduction mais bien du recrutement d'un « réservoir » de transporteur déjà présent dans la cellule.

Le trafic vers la membrane apicale de ces transporteurs dépend aussi d'une enzyme clé de la signalisation cellulaire : la PI3K (*PhosphoInositide 3-Kinase*), une enzyme ubiquitaire activée par l'AMPc. Son inhibition entraîne une diminution de la sécrétion biliaire liée à une diminution des transporteurs (Misra et al. 1998). Le trafic membranaire est perturbé lors d'une cholestase induite par ligation du canal biliaire, par administration de phalloïdine ou de lipopolysaccharides chez le rat. Dans ces conditions, ABCB11, ABCC2, ABCB1 et ABCB4 colocalisent dans des structures intracellulaires péri-canaliculaires (Paulusma et al. 2000, Rost, Kartenbeck and Keppler 1999, Dombrowski et al. 2000).

Toutes ces données suggèrent que le flux biliaire est régulé par une insertion et une récupération rapide des transporteurs à la membrane canaliculaire depuis et vers un compartiment intracellulaire proche (figure 24). Ce compartiment intracellulaire a une morphologie tubulo-vésiculaire. Une colocalisation entre ABCB11 et le marqueur des endosomes de recyclage Rab11a montre que ce compartiment est de type endosomal (Wakabayashi, Lippincott-Schwartz and Arias 2004). Un motif d'endocytose « YYKLV » situé dans la partie C-terminale d'ABCB11 a été identifié (Lam et al. 2011). Cette séquence est reconnue par l'adaptateur à clathrine AP2 (*Adaptator Protein 2*) (Hayashi et al. 2012) et permet l'internalisation du transporteur de façon clathrine-dépendante. Les deux tyrosines de ce motif sont essentielles car lorsqu'elles sont mutées, la réinternalisation du transporteur est

inhibée. CFTR possède également dans sa partie C-terminale un signal d'endocytose à clathrine « YXXI » qui régule son expression à la surface cellulaire (Peter et al. 2002).

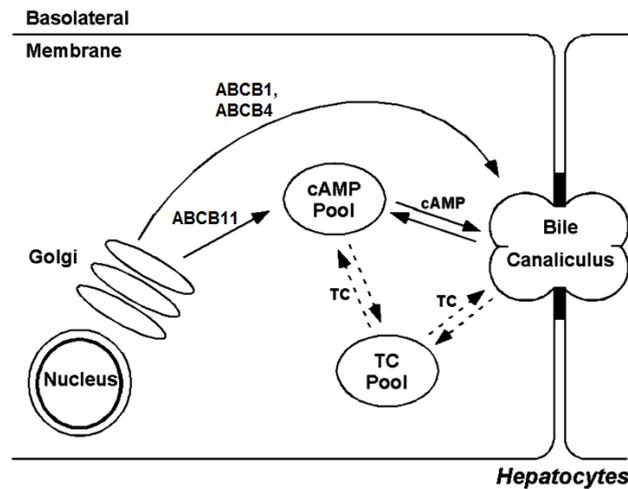


Figure 24 : Modèle de ciblage membranaire et de recyclage des transporteurs ABC dans les hépatocytes de rats. TC : taurocholate. Après le passage par l'appareil de Golgi, ABCB11 s'accumule dans un réservoir intrahépatique « cAMP-pool » avant de s'équilibrer ensuite avec le « TC-pool ». L'existence de deux réservoirs répondant préférentiellement au taurocholate ou à l'AMPc n'est pas claire. ABCB1 et ABCB4 nouvellement synthétisés sont directement adressés au canalicule. Ils sont ensuite stockés dans les réservoirs intracellulaires et pourront être mobilisés par le taurocholate ou l'AMPc (Kipp and Arias 2002), modifié.

La demi-vie globale de ces transporteurs est de 5 jours, ce qui suggère qu'ils subissent plusieurs cycles de trafic entre le réservoir intracellulaire et la membrane canaliculaire avant d'être dégradés. Le fait que la stimulation par le taurocholate et l'AMPc ait des effets additifs plutôt qu'alternatifs (Gatmaitan et al. 1997, Kipp, Pichetshote and Arias 2001) suggère l'existence de deux réservoirs intracellulaires, l'un mobilisant les transporteurs sous l'effet du taurocholate, et l'autre, de l'AMPc.

Les hormones sont aussi impliquées dans les processus de réinternalisation/recyclage des transporteurs à la membrane canaliculaire. Dans les cholestases induites par l'E17G (*Estradiol 17 β -D-Glucuronide*), le pool intracellulaire d'ABCB11 et d'ABCC2 est augmenté. Cet effet peut être contrecarré par le glucagon et l'adrénaline qui régulent le niveau d'AMPc dans les hépatocytes. L'action du glucagon dépend de la PKA (*cAMP Protein Kinase*) qui stimule la réinsertion à la membrane plasmique des transporteurs à partir des vésicules sous-apicales. L'adrénaline stimule le trafic microtubule-dépendant à partir des réservoirs

endocytiques plus profonds en activant la voie de signalisation MEK (*Mitogen activated-protein Kinase kinase*) (Zucchetti et al. 2011).

III-4-3. Les protéines partenaires du trafic intracellulaire

Des expériences de criblage en double-hybride réalisées chez la levure ont permis d'identifier HAX-1 (*HS1-Associated protein X-1*) (Ortiz et al. 2004) et la chaîne légère de la myosine (MLC2a) (Chan et al. 2005) comme des partenaires potentiels d'ABCB1, ABCB4 et ABCB11, ainsi que Rack1 (*Receptor for activated C-kinase 1*) (Ikebuchi et al. 2009) comme partenaire potentiel d'ABCB4. Ces protéines se fixent au niveau de la région « linker » des transporteurs. HAX-1 se lie à la cortactine qui est une protéine de liaison à l'actine impliquée dans l'endocytose clathrine-dépendante. HAX-1 favorise la réinternalisation des transporteurs ABC : l'utilisation d'ARN interférents dirigés contre HAX-1 a montré une augmentation de la quantité du transporteur ABCB11 à la membrane canaliculaire, sans modification de la traduction ou de la demi-vie du transporteur. Au contraire, MLC2a est requise pour l'adressage apical des transporteurs ABC car son défaut diminue la quantité de transporteurs à la membrane canaliculaire (figure 25). Rack1 est aussi montré comme nécessaire à la localisation apicale d'ABCB4.

Les transporteurs ABC canaliculaires colocalisent avec Rab11a dans les endosomes de recyclage. Les protéines Rab sont des petites GTPases ayant un rôle capital dans la régulation du trafic membranaire, notamment dans la formation des vésicules de transport et le recrutement de protéines motrices au niveau du cytosquelette (Pfeffer 2001). La myosine Vb participe aussi au ciblage apical des transporteurs ABC. En se liant à Rab11a et à l'actine, elle pourrait être un moteur du trafic entre les endosomes contenant les transporteurs ABC et la membrane apicale. De plus, la fusion des vésicules contenant Rab11a, la myosine Vb et les transporteurs ABC avec la membrane plasmique favorise la différenciation du canalicule biliaire (Wakabayashi et al. 2005). Ces endosomes peuvent aussi contenir, ou être liés, à des molécules de ciblage spécifique, comme les SNAREs, qui faciliteraient le ciblage membranaire et la fusion (Wakabayashi, Kipp and Arias 2006).

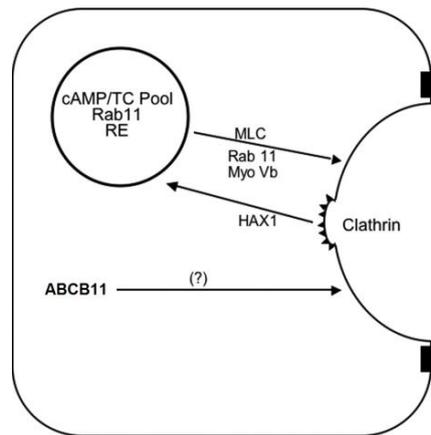


Figure 25 : Les partenaires de trafic régulant le recyclage endosomal des transporteurs ABC canaliculaires. A l'état d'équilibre, ABCB11 est localisé en majorité dans un endosome de type Rab11. Il existe des cycles de trafic entre l'endosome et la membrane canaliculaire. L'exocytose requiert Rab11a, la myosine Vb et la chaîne légère de la myosine (MLC). L'endocytose apicale dépend de la clathrine et requiert HAX-1, la cortactine et d'autres composants de fixation à l'actine. TC : taurocholate (Wakabayashi et al. 2006).

III-5. Les voies de dégradation des transporteurs ABC

Le protéasome et le système lysosomal sont impliqués dans la dégradation des transporteurs ABC. Le mécanisme de dégradation diffère selon qu'il s'agisse des molécules matures ou des molécules en cours de synthèse. Il faut retenir que le repliement des transporteurs ABC n'est pas très efficace : des données montrent que seul 20 à 40 % de CFTR subit une maturation correcte alors que le reste est dégradé aussi rapidement que le mutant immature $\Delta F508$ (Ward and Kopito 1994, Kopito 1999).

III-5-1. Le protéasome

La dégradation des protéines mal conformées et accumulées permet d'éviter un « stress du réticulum ». Celles-ci sont ciblées par le mécanisme ERAD. Elles quittent le RE pour être dégradées dans le cytosol grâce au système ubiquitine-protéasome (UPS). Ce système fait intervenir plusieurs enzymes (E1, E2 et E3) qui vont greffer une petite protéine, l'ubiquitine, sur les résidus lysines (figure 26). Les enchaînements multiples d'ubiquitine marquent la protéine afin qu'elle soit dégradée par le protéasome (Hershko and Ciechanover 1998).

Le protéasome est une protéase multimérique ATP dépendante qui reconnaît les protéines ubiquitinylées. L'ubiquitine et le protéasome sont impliqués dans la dégradation des transporteurs ABC mal conformés, comme le mutant CFTR $\Delta F508$ qui est rapidement dégradé par le protéasome. Le traitement des cellules exprimant CFTR ou le mutant CFTR $\Delta F508$ avec des inhibiteurs du protéasome (lactacystine, ALLN, MG132) entraîne l'accumulation de

formes multi-ubiquitinylées. Dans des cellules exprimant une forme dominante négative de l'ubiquitine, le transporteur s'accumule, démontrant que la multi-ubiquitinylation est un prérequis pour la dégradation (Ward, Omura and Kopito 1995, Gelman, Kannegaard and Kopito 2002).

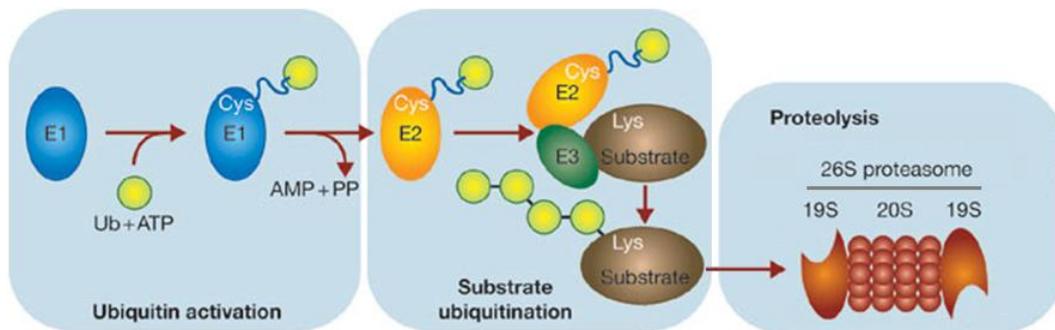


Figure 26 : Le système ubiquitine–protéasome (UPS). Une cascade de réactions enzymatiques entraîne l'ubiquitinylation du substrat. L'*ubiquitin-activating enzyme* (E1) active l'ubiquitine (Ub) par hydrolyse de l'ATP. L'Ub activée est transférée sur un membre de la famille *ubiquitin-conjugating enzyme* (E2). L'E2 et l'*ubiquitin protein ligase* (E3) fixent l'Ub sur un résidu lysine de la protéine substrat. Une chaîne poly-ubiquitinylée est formée sur le substrat par addition successive d'Ub sur des résidus lysines de l'Ub précédente. Les protéines poly-ubiquitinylées sont reconnues spécifiquement par la sous-unité 19S du protéasome. La chaîne polypeptidique est disposée dans la chambre centrale 20S pour y être dégradée (Meusser et al. 2005), modifié.

L'inhibition du protéasome stabilise certains mutants d'ABCB11/BSEP retenus dans le RE, dans des cellules MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) et HEK (Wang, Soroka and Boyer 2002, Hayashi et al. 2005). Ces résultats montrent que le protéasome joue un rôle majeur dans la dégradation des mutants des transporteurs ABC au niveau du RE.

III-5-2. Le système lysosomal

Lorsque le transporteur ABC a atteint la membrane plasmique, il est réinternalisé dans les endosomes précoces puis recyclé. Une partie des molécules échappe au recyclage et sera dégradée. Le système de dégradation par macro-autophagie/lysosome est largement impliqué. En effet, lorsque la pompe à proton lysosomale est inhibée par la bafilomycine A1 (BfA), cela entraîne l'accumulation de la forme mature de CFTR et une augmentation de sa demi-vie (Cheng, Wang and Guggino 2004).

Le ciblage des transporteurs ABC membranaires vers la dégradation lysosomale se fait aussi de façon ubiquitine-dépendante. Après endocytose, c'est l'équilibre entre l'action des ubiquitines-ligases et des désubiquitinases qui favorise soit la dégradation soit le recyclage de CFTR (Bomberger, Barnaby and Stanton 2009). Un contrôle qualité intervient aussi au niveau

de la membrane plasmique pour reconnaître les protéines non-natives. De nombreuses chaperonnes, co-chaperonnes et enzymes d'ubiquitination agissent ensemble pour assurer l'internalisation et la dégradation des protéines mal conformées. Hsc70/Hsp40, Hsp90 et CHIP y jouent notamment un rôle prépondérant (Okiyoneda et al. 2010). Ce contrôle qualité « périphérique » participe à l'homéostasie cellulaire en dégradant les protéines de la membrane plasmique endommagées qui ont échappé au contrôle qualité du RE. La voie de dégradation lysosomale est un rempart important aux efforts de restauration du trafic des mutants de conformation comme le montrent les études de CFTR Δ F508 (Sharma et al. 2004).

Bien que les protéines membranaires non-natives qui ont échappé au contrôle qualité du RE soient dégradées préférentiellement par les lysosomes, il semble que le protéasome soit aussi impliqué. Certains mutants de CFTR tronqués de leur extrémité C-terminale atteignent la membrane plasmique mais sont instables. Ils ne sont pas dirigés vers les lysosomes mais dégradés par le protéasome (Benharouga et al. 2001).

D'autres mutants, qui n'entraînent pas de rétention dans le RE, subissent une maturation normale mais leur stabilité à la membrane plasmique est affectée. Le mutant D482G d'ABCB11/BSEP, par exemple, a une demi-vie trois fois inférieure à celle de la forme WT. La réduction de sa demi-vie réduit d'autant son activité. L'ajout d'un inhibiteur du protéasome augmente sa stabilité, contrairement à l'inhibition des protéases lysosomales (Kagawa et al. 2008).

La dégradation des transporteurs ABC ayant atteint la surface cellulaire peut donc se faire à travers les voies lysosomale ou protéasomale mais les signaux qui ciblent vers l'une ou l'autre de ces voies restent mal connus.

CHAPITRE IV

Les pathologies liées à des défauts d'ABCB4

Il est maintenant bien établi que plusieurs pathologies biliaires sont dues à des mutations du gène *ABCB4*. Des variations de séquence ont été identifiées, qui conduisent soit à une protéine tronquée, à des délétions, des insertions ou des mutations faux-sens.

IV-1. Des mutations d'ABCB4 sont à l'origine de plusieurs pathologies

Au moins trois phénotypes pathologiques sont liés à des mutations d'*ABCB4*: la cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 3 (appelée PFIC3), le syndrome de lithiase intra-hépatique cholestérolique lié à un faible taux de phospholipide (appelée syndrome LPAC) et la cholestase gravidique (appelée ICP).

IV-1-1. La PFIC3: *Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type 3*

La PFIC3 fait partie d'un groupe hétérogène de cholestases intrahépatiques familiales progressives (PFIC). La prévalence à la naissance des PFIC, bien que mal connue, est estimée entre 1/50 000 et 1/100 000. Elles se manifestent dès l'enfance avec un mode de transmission autosomique récessif. Les patients sont le plus souvent homozygotes ou hétérozygotes composites. Les PFIC se caractérisent par des altérations de la formation de la bile et progressent généralement vers une cirrhose avant l'âge de 10 ans. Elles entraînent hypertension portale, cirrhose, et éventuellement carcinome hépatocellulaire.

Initialement décrites en 1969 chez des enfants Amish de la communauté de Jacob Byler, ces maladies portaient un nom général de « syndrome de Byler ». Depuis, trois types de PFIC ont été précisément identifiés où seul le type 3 est directement lié à un défaut d'*ABCB4* (Deleuze et al. 1996) (figure 27).

La PFIC1 (ou maladie de Byler) est causée par un défaut de *FIC1 (Familial Intrahepatic Cholestasis 1)/ATP8B1* (Bull et al. 1998). Cette protéine membranaire, localisée à la membrane apicale des hépatocytes et des cholangiocytes, est une flippase qui transloque les aminophospholipides, en particulier la phosphatidylsérine (PS) du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique (Ujhazy et al. 2001). Il en résulte un enrichissement de la membrane en glycosphingolipides plus résistants vis-à-vis de l'action

détergente des acides biliaires. Lorsque FIC1 fait défaut, le feuillet externe de la membrane, plus riche en aminophospholipides, devient moins résistant aux effets détergents des acides biliaires (Paulusma et al. 2006).

La PFIC2 (ou syndrome de Byler) est causée par un défaut de BSEP (*Bile Salt Export Pump*)/*ABCB11* (Strautnieks et al. 1998, Jansen et al. 1999), le transporteur des acides biliaires à la membrane canaliculaires des hépatocytes. La mutation du gène de *BSEP* entraîne une diminution de la sécrétion des acides biliaires, donc un ralentissement du flux biliaire et une accumulation des acides biliaires toxiques pour les hépatocytes.

La PFIC3 est causée (au moins pour une part importante) par des mutations localisées dans le gène *ABCB4* (Deleuze et al. 1996, de Vree et al. 1998). Le défaut du transporteur *ABCB4* entraîne la diminution de la sécrétion de PC (1-15 % de PC alors que la normale est de 19-24 %) qui est essentielle pour neutraliser les effets détergents des acides biliaires et permettre la solubilisation du cholestérol dans les voies biliaires (Davit-Spraul et al. 2009).

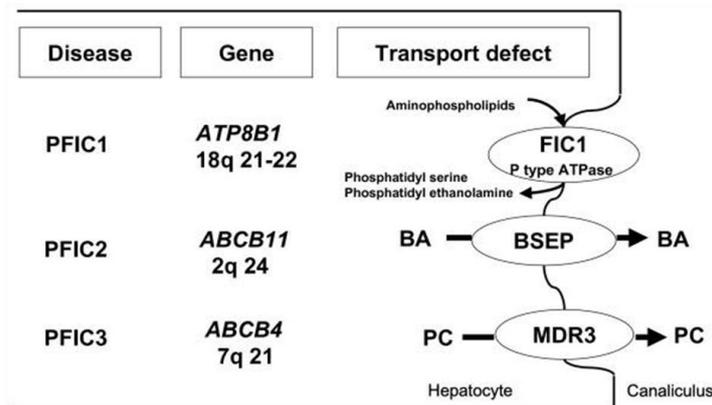


Figure 27 : Les trois types de PFIC : les gènes et le transport impliqué au niveau d'un hépatocyte. PC : phosphatidylcholine ; BA : acides biliaires (Davit-Spraul et al. 2009, Jacquemin and Hadchouel 1999).

Les analyses biochimiques montrent que les patients atteints de PFIC3 ont une élévation de l'activité de la gamma-glutamyl transférase (γ -GT) sérique¹, ce qui les distingue des autres PFICs. A la différence des PFIC1 et 2, la PFIC3 entraîne rarement d'ictère cholestatique et peut apparaître plus tard dans l'enfance, parfois même chez le jeune adulte. Au niveau histologique, elle se caractérise par une fibrose portale, une prolifération ductulaire importante, un infiltrat inflammatoire mixte et une cholestase. Le profil histologique du foie

¹ La γ -GT est une enzyme hépatique impliquée dans le métabolisme des acides aminés. Sa présence dans le sang est évocatrice de lésions hépatiques.

des patients est très similaire à celui des souris *Abcb4*^{-/-} (Smit et al. 1993a). L'aggravation des symptômes entraîne l'insuffisance hépatique. Le traitement à l'acide ursodésoxycholique (UDCA) prévient les dommages et améliore les symptômes dans 40 % des cas de malades ayant une mutation faux-sens (mais jamais pour ceux ayant une délétion ou un codon stop). L'UDCA est un acide biliaire relativement hydrophile qui remplace une partie des acides biliaires endogènes, tout en présentant l'avantage de ne pas être hépatotoxique. Lorsque l'UDCA est inefficace, la transplantation hépatique reste l'ultime alternative (Jacquemin et al. 1997, Paumgartner and Beuers 2002, Stapelbroek et al. 2010).

IV-1-2. Le syndrome LPAC: *Low Phospholipid Associated Cholelithiasis*

La lithiase intra-hépatique cholestérolique (ou syndrome LPAC) peut être causée par des mutations hétérozygotes du gène *ABCB4* (Rosmorduc, Hermelin and Poupon 2001). Il s'agit d'une forme symptomatique et récidivante rare de lithiase biliaire de cholestérol chez le jeune adulte. Les patients souffrent de douleurs biliaires, d'une angiocholite ou d'une pancréatite qui persiste après cholécystectomie. Le rapport cholestérol/phospholipide est anormalement élevé, ce qui favorise la formation de cristaux de cholestérol dans les voies biliaires. De nombreux calculs de cholestérol intra-hépatiques sont visibles à l'échographie. Une prolifération ductulaire et une inflammation portale peuvent survenir. Ces patients répondent bien au traitement par l'UDCA qui prévient la réapparition des symptômes (Rosmorduc and Poupon 2007).

IV-1-3. La cholestase gravidique ou ICP (*Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy*)

Des mutations d'*ABCB4* sont aussi à l'origine de cholestase gravidique ou ICP (*Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy*) (Dixon et al. 2000). L'ICP est une maladie hépatique réversible qui survient au cours du troisième trimestre de la grossesse. Elle est caractérisée par un prurit, une élévation de l'activité γ -GT sérique et une augmentation des sels biliaires plasmatiques au cours du deuxième et troisième trimestre de la grossesse. Tous ces symptômes disparaissent dans les deux à trois semaines après l'accouchement. Il existe néanmoins un risque de naissance prématurée, de souffrance fœtale associée à la cholestase, voire de mort *in utero* du fœtus (Jacquemin et al. 1999).

Il est courant que les femmes souffrant d'ICP développent aussi une cholestase avec l'utilisation de moyens de contraception oraux (*oral Contraceptives-Induced Cholestasis* ou CIC). La prévalence de l'ICP a une forte préférence ethnique, notamment chez certaines

populations du continent américain. Chez les indiennes Mapuche du Chili par exemple la fréquence de l'ICP se situe entre 1.5 et 4 %. Elle a fortement diminué depuis 1975 où elle atteignait 14 %. En Europe centrale et de l'ouest, la prévalence est inférieure à 1 % alors qu'elle atteint les 2 % en Scandinavie et dans les états baltes (Reyes et al. 1978, Reyes 2008, Pusch and Beuers 2007). La raison de telles différences est inconnue, mais des prédispositions génétiques métaboliques et des facteurs environnementaux pourraient intervenir (Reyes 1997). Le traitement par l'UDCA est aussi bénéfique pour les patientes (Berkane et al. 2000). Il semble que l'apparition de l'ICP/CIC soit liée à un niveau hormonal (œstrogènes et progestérone) qui pourrait modifier l'expression d'*ABCB4* au niveau transcriptionnel, ou plus directement inhiber sa fonction. Chez le rat, le traitement par des oestrogènes comme le 17-ethynylestradiol induit une cholestase (Fiorucci et al. 2005).

Le tableau VII résume les caractéristiques des trois principales pathologies liées à des mutations d'*ABCB4*. Il faut noter que les mutations d'*ABCB4* ne sont responsables que de 15 à 56 % des cas de PFIC3, de syndrome LPAC et d'ICP/CIC. Malgré tout, le criblage des mutations ne s'est pas encore intéressé aux séquences promotrices ou régulatrices du gène. Des investigations en ce sens devraient permettre de mieux définir toutes les origines de ces maladies.

Tableau VII : Caractéristiques de la PFIC3, du syndrome LPAC et de l'ICP, d'après (Berkane et al. 2000, Degiorgio et al. 2007, Reyes 2008, Rosmorduc and Poupon 2007, Rosmorduc et al. 2003, Jacquemin et al. 2001)

	PFIC3	Syndrome LPAC	ICP/CIC
Transmission	autosomique récessif	autosomique récessif	sporadique polygénique/polyfactoriel
Apparition	enfance à jeune adulte	avant 40 ans	adulte
Ratio (homme/femme)	1	1/3	0
Prévalence	1/100 000 à 1/400 000 (très rare)	Inconnue (rare)	<1 % à 15 % des grossesses
Description clinique	Episodes récurrents d'ictère et prurit modéré. Cholangite, lithiase biliaire, fibrose hépatique et inflammation portale. Prolifération ductulaire importante. Evolution vers une cirrhose biliaire secondaire et hypertension portale.	Lithiase cholestérolique avec cholecystite, cholangite, calculs intrahépatiques et/ou pancréatite associée à une microlithiase biliaire.	Prurit au second et troisième semestre de la grossesse, taux d'acides biliaires sériques élevé.
Activité γ-GT sérique	élevée	élevée	élevée
Phospholipides	bas	bas	non dosé
Cas ABCB4 muté	30-50 %	37-56 %	15 %-27 %
Traitements	UDCA en première intention. Transplantation hépatique.	UDCA	UDCA

IV-1-4. Autres pathologies associées à ABCB4

Certaines cholestases chroniques inexplicables chez des patients adultes sont aussi causées par des défauts d'ABCB4. Ces cholestases sont souvent fibrosantes avec l'apparition de lésions des canaux et d'infiltrats inflammatoires (Ziol et al. 2008). Certaines hépatolithiases biliaires sont aussi associées à des mutations d'ABCB4 (Kano et al. 2004).

La ductopénie idiopathique de l'adulte (une forme de cholestase primitive) peut être aussi causée par des mutations du gène ABCB4 (Gotthardt et al. 2008). La DILI (*Drug Induced Liver Injury*) est liée à la prise de certaines drogues ou médicaments (antibiotiques) ou encore à la consommation de diverses plantes. Certaines substances pourraient interférer avec le fonctionnement de variants d'ABCB4 (Lang et al. 2007).

IV-2. Les mutations d'*ABCB4* identifiées chez les patients

A ce jour, environ 150 mutations d'*ABCB4* ont été identifiées associées à l'un des trois phénotypes pathologiques principaux (PFIC3, LPAC et ICP). Une liste de ces mutations est réalisée en annexe 4 (pages 134-137) à partir des données de la littérature et de résultats non publiés obtenus au Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaire de l'Hôpital Saint-Antoine de Paris.

IV-2-1. Mutations et corrélation génotype/phénotype

Les effets de la majorité des mutations d'*ABCB4* identifiées ne sont pas encore bien établis. Les mutations non-sens et les délétions/insertions qui font apparaître un codon stop suite à un décalage du cadre de lecture sont les mutations les plus graves car elles aboutissent à des protéines tronquées. Les patients homozygotes pour de telles mutations sont les plus gravement atteints et développent une PFIC3 très tôt. La protéine n'est généralement pas détectée à l'analyse immuno-histologique. Lorsqu'il s'agit de mutations faux-sens, la gravité de la maladie dépend du résidu touché (figure 28). S'il persiste une activité résiduelle de la protéine, les symptômes peuvent apparaître plus tardivement et être moins sévères. La gravité dépend aussi du statut homozygote ou hétérozygote, la PFIC3 étant associée à un statut homozygote ou hétérozygote composite.

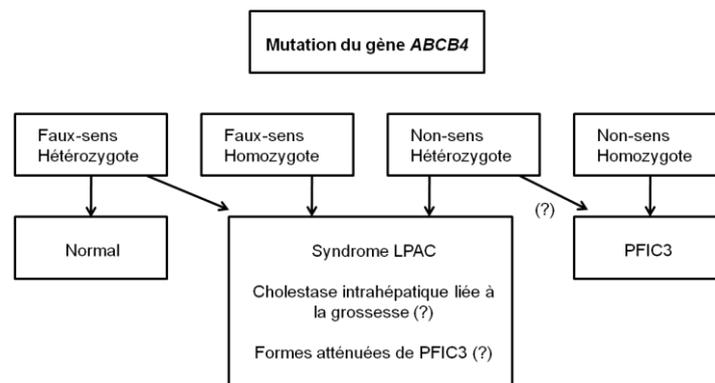


Figure 28 : Les mutations du gène *ABCB4* et leur relation avec le phénotype pathologique du foie. La gravité de la maladie dépend de la mutation et du statut homozygote ou hétérozygote du patient (Rosmorduc et al. 2003), adapté.

Une partie des polymorphismes connus et des mutations identifiées chez les patients sont disponibles dans des bases de données comme la HGMD (*The Human Gene Mutation*

Database) ou la LOVD (*Leiden Open Variation Database*). Moins d'une centaine y est aujourd'hui répertoriée. Il est très utile pour les chercheurs, les cliniciens et les patients d'y mettre en commun toutes les mutations découvertes ainsi que la pathologie associée. Cette base de données internationale, une fois complétée, pourra servir de référence pour la recherche sur les maladies liées à des défauts d'ABCB4. La localisation des mutations déjà publiées montre que la protéine est touchée dans son ensemble, avec une majorité de mutations au niveau du NBD1 (figure 29) (Oude Elferink and Paulusma 2007, Degiorgio et al. 2007).

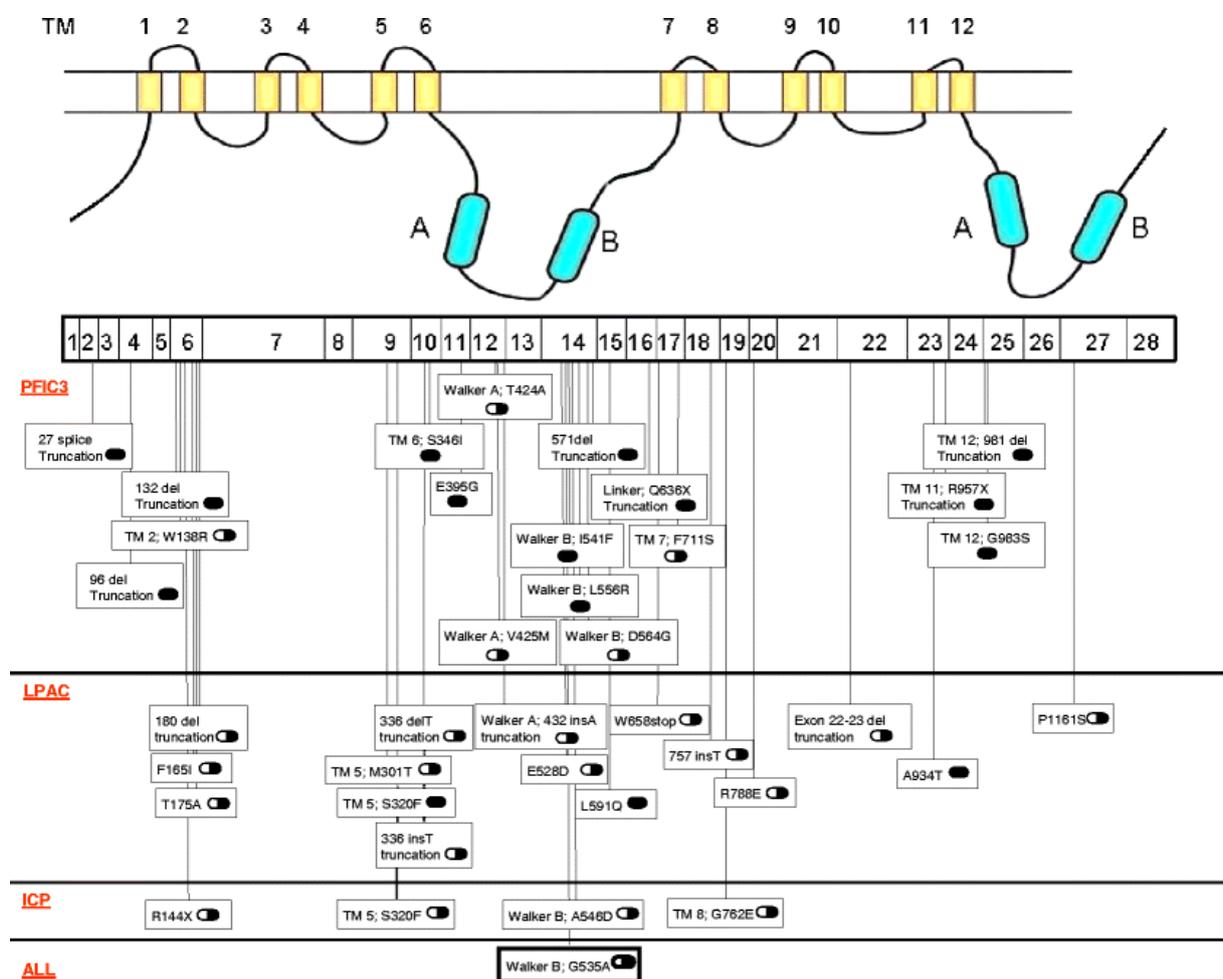


Figure 29: Quelques mutations connues et leur localisation dans ABCB4. Les mutations ont été identifiées chez des patients atteints de PFIC3, syndrome LPAC et ICP. La règle 1-28 montre les exons. Les ovales pleins indiquent les mutations homozygotes, les ovales à moitié pleins indiquent les mutations hétérozygotes (Oude Elferink and Paulusma 2007).

IV-2-2. Les mutations identifiées touchent généralement des motifs conservés

Les mutations faux-sens (substitution d'un acide-aminé par un autre) concernent la majorité des mutations. Des logiciels spécifiques (PolyPhen, SIFT...) se basent sur des considérations physiques et comparatives pour prédire l'impact possible de ces mutations sur la structure ou la fonction de la protéine. Ces logiciels peuvent donner une première indication mais n'apportent aucune explication des impacts réels de la mutation sur la protéine. Comparer les différents transporteurs ABCB4 produits au cours de l'évolution peut donner aussi des informations sur l'importance de chaque acide aminé au sein de la protéine. Certains auteurs ont classifié les acides aminés en fonction de leur redondance entre les différents transporteurs ABC (des bactéries à l'homme), entre les différents ABCB4 des mammifères et l'ABCB1 humain ou uniquement entre les ABCB4 des mammifères (Degiorgio et al. 2007). Au niveau du NBD1 par exemple, les séquences peptidiques sont très conservées des bactéries à l'homme, ce qui explique le nombre important de mutations pathologiques identifiées dans ce domaine (figure 30).

Hs-ABCB4	525--LVGERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSA--562
Pt-ABCB4	525--LVGERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSA--562
Mm-ABCB4	522--LVGDRGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSA--559
Rn-ABCB4	522--LVGDRGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSA--559
Md-ABCB4	523--LVGERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSA--560
Hs-ABCB1	523--LVGERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLLDEATSA--560
Ec-MsbA	473--VIGENGVLLSGGQRQRIAIARALLRDSPILILDEATSA--510
St-MsbA	473--IIGENGVLLSGGQRQRIAIARALLRDSPILILDEATSA--510
Vc-MsbA	473--VIGENGTSLSGGQRQRVAIARALLRDAPVLIILDEATSA--519
Sa-Sav1866	470--EVGERGVKLSGGQKQRLSIARIFLNNPPILILDEATSA--507

Figure 30 : Séquences d'alignement multiple d'une courte partie du NBD1 d'ABCB4 et d'autres transporteurs ABC. Les alignements incluent ABCB4 humain (Hs-ABCB4), ABCB4 du chimpanzé (Pt-ABCB4), ABCB4 de la souris (Mm-ABCB4), ABCB4 du rat (Rn-ABCB4), ABCB4 de l'opossum (Md-ABCB4), ABCB1 humain (Hs-ABCB1), MsbA d'*Escherichia coli* (Ec-MsbA), MsbA de *Salmonella typhimurium* (St-MsbA), MsbA de *Virio cholera* (Vc-MsbA) et Sav1866 de *Staphylococcus aureus*. Les résidus impliqués dans la PFIC3, le syndrome LPAC et l'ICP sont indiqués respectivement en rouge, bleu et orange. En vert, un résidu impliqué dans le syndrome LPAC et l'ICP. Hs : *Homo sapiens*, Pt : *Pan troglodytes*, Mm : *Mus musculus*, Rn ; *Rattus norvegicus*, Md : *Monodelphis domestica*.

Les résidus conservés entre ABCB4 et ABCB1 ainsi que ceux conservés entre les transporteurs ABCB4 de plusieurs mammifères sont reportés en annexe 5 (page 138). On

remarque une corrélation entre les résidus conservés et les résidus touchés par des mutations pathologiques (figure 31 vs annexe 5).

Dans 1/3 des cas de PFIC3 ou de LPAC, aucune mutation d'ABCB4 n'a été mise en évidence dans l'ADN codant des patients. Outre l'importance de vérifier les séquences promotrices et régulatrices d'ABCB4, d'autres gènes pourraient être impliqués. ATP8B1/FIC1, qui a un rôle coopératif avec ABCB4 en enrichissant directement le feuillet interne en PS, et donc indirectement le feuillet externe en PC (Groen et al. 2011), pourrait être impliqué. De par leurs rôles dans la sécrétion biliaire, ABCB11 (Pauli-Magnus et al. 2004), ABCC2 ou ABCG5/ABCG8 sont aussi susceptibles d'entraîner une lithiase biliaire ou un défaut dans la sécrétion de phospholipides. Enfin, le défaut de protéines participant à la régulation de l'expression ou de l'activité d'ABCB4 pourrait entraîner les mêmes pathologies.

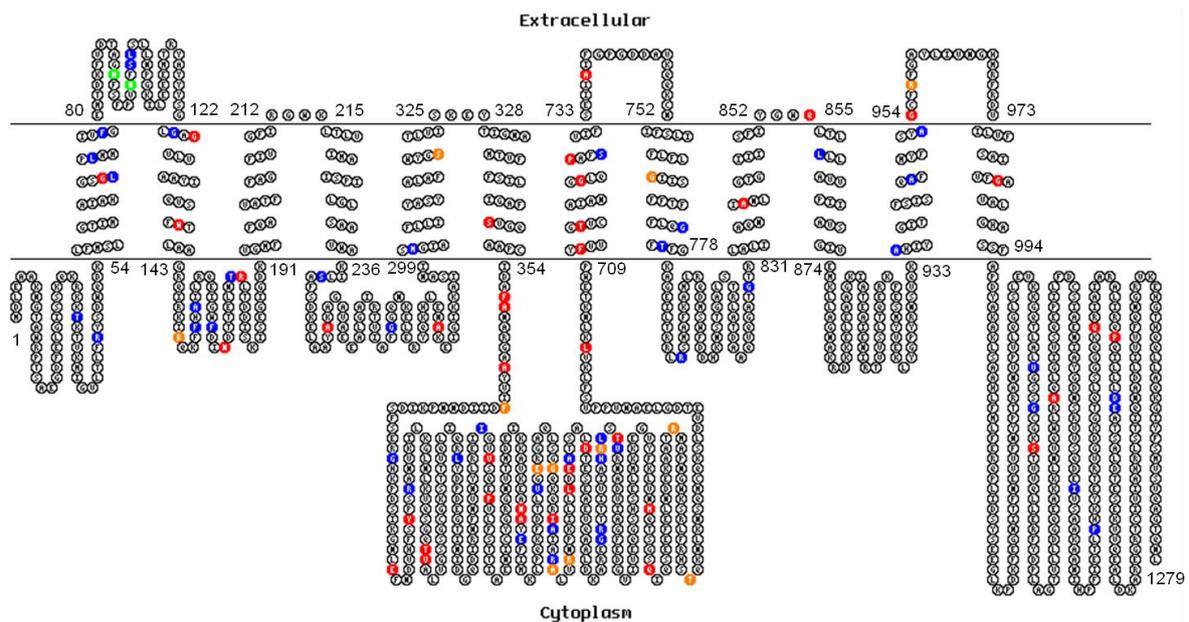


Figure 31 : Localisation des résidus touchés par des mutations faux-sens à l'origine de PFIC3 (en rouge), du syndrome LPAC (en bleu) et de l'ICP (en orange). En vert les sites prédictifs de glycosylation. Les domaines transmembranaires ont été prédits par logiciel *SACS HMMTOP prediction* de G.E. Tusnady et I.Simon. La structure est ensuite réalisée par *TOPO2* : <http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py/>. La liste des mutations est disponible en annexe 4.

IV-2-3. Effets des mutations sur le transporteur

Parmi les mutations recensées en annexe 4 (page 134) de cette thèse, 62 % sont des mutations faux-sens, 12 % sont des délétions, 11 % des mutations non-sens, 5 % des insertions et 10 % touchent des séquences introniques. Les mutations non-sens ainsi que les

délétions et insertions entraînent l'apparition d'un codon stop prématuré. La protéine tronquée est en général non fonctionnelle. Dans le cas des mutations faux-sens, la corrélation entre la mutation et la maladie est plus difficile à affirmer. De telles mutations peuvent affecter ABCB4 à différents niveaux, que ce soit sa biosynthèse, son trafic ou son activité. A l'instar des mutations d'autres transporteurs ABC, tels que ABCC7/CFTR (Rowntree and Harris 2003), les mutations d'*ABCB4* pourraient engendrer les mêmes effets (figure 32A) :

➤ **Synthèse d'une protéine tronquée** : Ce défaut est dû le plus souvent à un décalage du cadre de lecture ou un épissage aberrant de l'ARN pré-messager qui provoque l'insertion prématurée d'un codon stop. Les ARNm portant un codon-stop prématuré peuvent être rapidement dégradés par un système de surveillance spécifique, le NMD (*Nonsense-Mediated RNA Decay*) (Culbertson 1999). Ces mutations entraînent une absence totale ou partielle de la protéine (figure 32B), et donc une perte de fonction. Le phénotype est en général plus sévère. Ce type de mutation représente la moitié des mutations de CFTR et environ 40 % des mutations d'*ABCB4*.

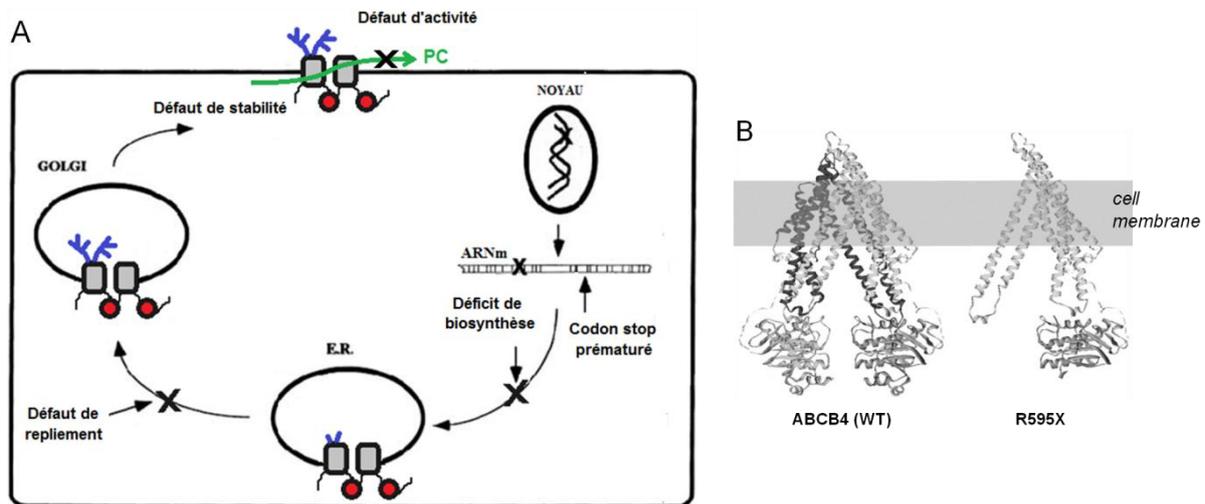


Figure 32 : (A) Les effets des mutations d'*ABCB4* d'après le modèle proposé pour le CFTR. ABCB4 est représenté en cours de synthèse. En rouge les domaines de liaison de l'ATP, en gris les domaines transmembranaires et en bleu la glycosylation. Inspiré de (Rowntree and Harris 2003). (B) Exemple d'une mutation non-sens (R595X) entraînant un transporteur ABCB4 tronqué (Giovannoni et al. 2011), modifié.

➤ **Perturbation du repliement et de la maturation** : Dans ce cas, la protéine ne se replie pas correctement et s'accumule au niveau du réticulum endoplasmique, prise en charge par les mécanismes de contrôle qualité cellulaire. Elle n'est pas transportée et sera dégradée.

C'est le cas par exemple du mutant CFTR Δ F508 qui n'atteint pas ou peu la membrane plasmique (Cheng et al. 1990).

➤ **Défaut d'activité** : les mutations produisent un transporteur qui est transporté correctement à la membrane plasmique mais dont la capacité de transport est réduite. Dans le cas de CFTR, la plupart de ces mutations sont localisées dans les domaines transmembranaires. Dans le cas d'ABCB4, les mutations K435M et K1075M, localisées au niveau des NBDs, aboutissent à une protéine mature mais inactive (Morita et al. 2007). Ces mutations n'ont pas été identifiées chez des patients. On s'attend toutefois à observer un phénotype similaire chez les patients dans le cas où ces mutations existeraient.

➤ **Défaut de la stabilité** : les mutations affectent la stabilité de la protéine mature, en réduisant sa demi-vie et donc sa présence à la membrane. Le mutant BSEP-D482G (à l'origine d'une PFIC2) présente ce défaut et a une demi-vie réduite des deux-tiers par rapport à la protéine normale (Kagawa et al. 2008).

IV-3. Les approches thérapeutiques ciblant les effets d'un défaut d'ABCB4

IV-3-1. Les thérapies actuelles : l'UDCA et la transplantation hépatique

Les patients atteints de syndrome LPAC ou d'ICP sont traités avec l'acide ursodeoxycholique (UDCA), un acide biliaire isolé à l'origine de la bile d'ours (famille des Ursidae), duquel il tire son nom. Il a été utilisé au Japon dès les années 1960 pour ses effets sur les maladies du foie (Hagey et al. 1993). Il est très employé depuis que sa capacité à dissoudre les calculs de cholestérol sans provoquer d'effet secondaire notable a été montrée (Nakagawa et al. 1977). Il est aussi utilisé dans la cirrhose biliaire primitive (PBC), la cholangite sclérosante primitive (PSC), les hépatites chroniques (CH) ainsi que pour traiter les effets hépatiques liés à la mucoviscidose (Podda et al. 1989, Boberg and Schrupf 1997, Paumgartner and Beuers 2002). L'UDCA montre de nombreuses propriétés bénéfiques. Il réduit la concentration biliaire de cholestérol, modifie la composition de la bile en acides biliaires en diminuant la proportion des acides chénodésoxycholique, cholique et désoxycholique (hépatotoxiques) qu'il remplace (Paumgartner and Beuers 2002). Il possède

une activité cytoprotectrice au niveau des hépatocytes qui pourrait être due à une activité anti-apoptotique (Rodrigues et al. 1998). Il présente enfin des propriétés anti-inflammatoires (Invernizzi et al. 1997).

Chez les patients atteints de PFIC3, l'UDCA est donné comme thérapie initiale dans le but de réduire les effets toxiques des sels biliaires. Le traitement par l'UDCA peut être bénéfique, en particulier dans certains cas de mutations faux-sens où il existe une faible activité d'ABCB4. Cependant l'UDCA ne permet pas d'améliorer l'état des patients dont la sécrétion de phospholipides est absente ou très réduite (Davit-Spraul et al. 2009, Jacquemin et al. 1997). Lorsque l'UDCA s'avère inefficace, la transplantation hépatique reste la seule solution. La PFIC3 est la cause de 2 à 5 % des transplantations hépatiques chez les enfants souffrant de cholestase (Davit-Spraul et al. 2009).

IV-3-2. Développement de thérapies alternatives

Le développement de thérapies alternatives dépend de l'effet des mutations. Le rétablissement de l'expression partielle d'une protéine fonctionnelle pourrait suffire à retarder ou à éviter la transplantation hépatique.

IV-3-2-1. Cibler les récepteurs nucléaires

Moduler la formation de la bile en jouant sur les récepteurs nucléaires grâce à des ligands pourrait donc être une option intéressante pour soigner les cholestases (Zollner and Trauner 2009). L'expression d'ABCB4 est régulée au niveau transcriptionnel par des récepteurs nucléaires, en particulier le « senseur » des acides biliaires : FXR (*Farnesoid X Receptor*). FXR est activé naturellement par l'acide chénodésoxycholique. Des ligands synthétiques peuvent aussi l'activer : le GW4064 et l'acide 6-éthyl chénodésoxycholique (6-ECDCA). L'activation de FXR transactive un certain nombre de gènes de façon coordonnée aboutissant à une diminution de la synthèse des acides biliaires (inhibition de la synthèse de la 7 α -hydroxylase et de la 12 β -hydroxylase), une réduction de leur capture (inhibition du NTCP), une stimulation de leur sécrétion (activation de la synthèse d'ABCB11/BSEP) ainsi qu'une stimulation de la sécrétion des phospholipides (activation de la synthèse d'ABCB4) (Fiorucci et al. 2005, Jung et al. 2007).

D'autres récepteurs nucléaires peuvent directement augmenter l'expression d'ABCB4 et donc le taux de phospholipides dans la bile. C'est le cas du PPAR α (*Peroxisom Proliferator Activator Receptor α*) activé par les fibrates, tel le bezafibrate (Shoda et al. 2004, Chianale et al. 1996).

IV-3-2-2. Les « supprimeurs » de codons-stop

Parmi les mutations d'*ABCB4* il existe des mutations ponctuelles qui induisent un codon stop sans changer le cadre de lecture. Pour ces mutations, la « translecture » du codon stop prématuré pourrait être un moyen de rétablir l'expression de la protéine.

Les antibiotiques de type aminoglycosides, connus pour leur activité antimicrobienne, peuvent interférer avec la traduction chez les eucaryotes (Burke and Mogg 1985). Ils se fixent sur la petite sous-unité ribosomale au niveau des résidus conservés d'ARNr qui servent normalement à la reconnaissance des ARNt. Ils augmentent l'affinité initiale de l'ARNt mais perturbent la fidélité de la traduction (Diop, Chauvin and Jean-Jean 2007, Schroeder, Waldsich and Wank 2000). Ils permettent à un ARNt d'incorporer un acide-aminé à la place d'un codon stop, ce qui permet à la traduction de continuer. L'efficacité de la translecture dépend néanmoins de la mutation (le codon UGA étant plus apte à la translecture que les codons UAG ou UAA) et du contexte nucléotidique dans lequel elle se trouve (Howard et al. 2000). Les études testant des aminoglycosides sur les patients atteints de mucoviscidose et ayant une mutation non-sens (homozygotes ou hétérozygotes) sont encourageantes : la gentamicine et le G418 permettent de sauter la mutation et de produire un CFTR entier et fonctionnel (Wilschanski et al. 2003, Howard, Frizzell and Bedwell 1996). Une des limitations dans l'utilisation des aminoglycosides est leur toxicité dans le temps, notamment au niveau des reins et de l'appareil auditif (Mattie, Craig and Pechère 1989). L'amikacine stimule la translecture aussi bien que la gentamycine mais présente l'avantage de ne pas être néphrotoxique et représente donc une alternative de choix (Diop et al. 2007, Keeling and Bedwell 2002).

Une autre espèce moléculaire ayant le même mécanisme d'action (mais sans similarité structurale avec les aminoglycosides) a été découverte par criblage à haut débit: le PTC124. Il serait bien toléré, même à des doses supérieures aux doses requises pour son activité. Les doses efficaces sont bien inférieures à celles utilisées pour la gentamicine (Welch et al. 2007). Les premiers essais sur des patients atteints de mucoviscidose causée par une mutation non-sens sont prometteurs (Wilschanski et al. 2011). L'application aux cholestases liées à des mutations non-sens d'*ABCB4* reste une voie à étudier.

IV-3-2-3. Les chaperonnes pharmacologiques

Les mutations faux-sens sont susceptibles de provoquer un défaut de repliement de la protéine vers la surface cellulaire. En conséquence, la protéine est retenue dans le réticulum endoplasmique sous forme immature. Un exemple très étudié est le mutant CFTR Δ F508 qui

reste intracellulaire. La restauration de son expression à la membrane par un abaissement de la température ou par la présence d'osmolytes tels que le glycérol ou le triméthylamine N-oxide (TMAO) montre que CFTR Δ F508 est fonctionnel (Brown et al. 1996, Sato et al. 1996). Bien qu'il ne soit pas possible de mettre les patients à 27°C ou de leur perfuser du glycérol, ces résultats ont ouvert des perspectives de traiter les patients par des moyens pharmacologiques. Un traitement potentiel serait d'utiliser des ligands qui agiraient de façon ciblée en tant que chaperonnes pharmacologiques pour obtenir un repliement correct. La faisabilité de cette approche a déjà été démontrée avec des mutants d'ABCB1 retenus dans le RE. De telles mutations ont pu être corrigées en présence de relativement faibles concentrations (moins de 10 μ M) de drogue-substrats et de modulateurs spécifiques d'ABCB1. Le vérapamil et la cyclosporine A sont des inhibiteurs d'ABCB1 alors que la capsaïcine et la vinblastine sont des substrats d'ABCB1. Ils sont tous hydrophobes et peuvent diffuser à travers la membrane cellulaire jusqu'au RE où se situe la synthèse protéique. Ces composés sont capables de rétablir, de façon dose-dépendante, la maturation des mutants d'ABCB1 quel que soit le domaine structural touché (figure 33) (Loo and Clarke 1997).

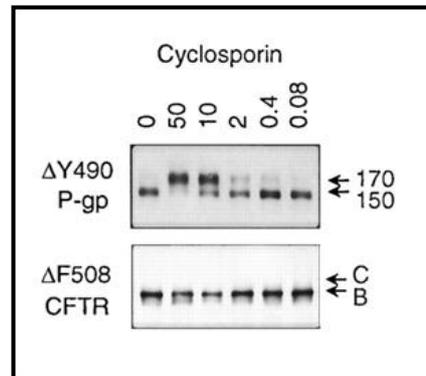


Figure 33 : Effet la cyclosporine A sur ABCB1 (PgP) et ABCC7 (CFTR). L'action de la cyclosporine est dose-dépendante et spécifique à ABCB1. Les doses présentées sont en μ M. La localisation de la mutation ABCB1 Δ Y490 est équivalente à celle de la mutation CFTR Δ F508. Les bandes de 170 kDa et C sont les formes matures d'ABCB1 et CFTR ; les bandes de 150 kDa et B sont les formes immatures d'ABCB1 et CFTR. (Loo and Clarke 1997), modifié.

Ces composés agissent de façon spécifique comme des chaperonnes pharmacologiques en interagissant avec les domaines d'ABCB1 pendant sont repliement. La principale difficulté pour le « sauvetage » de mutants est d'identifier des composés capables de les fixer avec une bonne affinité. Réaliser un criblage à haut débit de plusieurs milliers de molécules devrait permettre de trouver les composés les plus efficaces (Loo, Bartlett and Clarke 2005b). Des

résultats ont ainsi été obtenus pour CFTR Δ F508 où plusieurs correcteurs potentiels ont été identifiés. Le VRT-325 (ou CF_{cor}-325) par exemple est un dérivé quinolizinium capable d'induire 20 à 30 % de maturation (Van Goor et al. 2006). Ce composé n'est pas spécifique car il est aussi efficace sur des mutants d'ABCB1 (Loo, Bartlett and Clarke 2005a). Il semble néanmoins réduire l'activité de CFTR en diminuant son affinité pour l'ATP (Kim Chiaw et al. 2010). Il faut cependant noter que les mutants rétablis à la membrane ont une stabilité réduite et qu'ils sont rapidement dégradés (Sharma et al. 2004). C'est pourquoi la recherche se porte vers des composés très spécifiques capables non seulement d'induire la maturation mais aussi d'améliorer la stabilité (Loo et al. 2011b).

Le tableau VIII liste plusieurs transporteurs ABC dont certaines mutations ont pu être corrigées par des ligands agissant comme des chaperonnes chimiques ou pharmacologiques.

Tableau VIII : Chaperonnes pharmacologiques utilisées pour la restauration de transporteurs ABC. D'après (Loo et al. 2005b, Wang et al. 2006b, Loo, Bartlett and Clarke 2011a, Van Goor et al. 2006, Loo et al. 2011b).

ABCB1 (PgP)	Cyclosporine A, capsaïcine, vinblastine, vérapamil, nonylphénol, ethoxylates, VRT-325/CF _{cor} -325, Cor-3a, Cor-3d, Cor-4a, Cor-4b, Cor-4d, 15Jf, VX-640, KM11060, EPX-1, EPX-2
ABCC1 (MRP1)	Gluthatione
ABCC7 (CFTR)	Dérivés quinolizinium, doxorubicine, sildenafil, VRT-422, VRT-325/CF _{cor} -325, Cor-2b, Cor-3a, Cor-3d, Cor-4a, Cor-4b, Cor-4d, Cor-5a, Cor-5c, CFpot-532, Benzbromarone, KM11060, RDR1, VX-809, 15Jf, VX-640, EPX-1, EPX-2
ABCC8 (SUR1)	Diazoxide, sulfonyleureas
ABCG2 (BCRP)	Mitoxantrone

IV-3-2-4. La modulation des chaperonnes cellulaires

La modulation des chaperonnes cellulaires est une stratégie qui a été très étudiée dans le cas des mutants présentant des défauts de conformation. Hsc70 est une chaperonne cellulaire qui joue un rôle crucial dans la dégradation de mutants de conformation lorsqu'elle est

associée à sa co-chaperonne CHIP à activité ubiquitine-ligase. L'apoptozole est une petite molécule capable d'inhiber l'activité de Hsc70 en empêchant probablement son interaction avec CHIP. Cette molécule diminue l'efficacité du contrôle qualité et permet au mutant CFTR $\Delta F508$ de poursuivre sa maturation (Cho et al. 2011). Le 4-phenylbutyrate (4-PBA) agit aussi sur Hsc70 en diminuant son expression. Il permet au mutant d'échapper au contrôle qualité et d'être transporté à la membrane plasmique (Rubenstein and Zeitlin 2000, Rubenstein, Egan and Zeitlin 1997). Les essais cliniques de cette molécule menés sur des patients atteints de mucoviscidose et homozygotes pour la mutation CFTR $\Delta F508$ montrent une efficacité relativement faible (Rubenstein and Zeitlin 1998). Le 4-PBA augmente aussi l'expression membranaire d'ABCB11/BSEP et de certains de ses mutants, plus en stabilisant la forme mature qu'en stimulant le trafic à la membrane. Le mécanisme moléculaire qui permet cette stabilisation est inconnu. Il pourrait interrompre le processus de réinternalisation ou promouvoir le recyclage (Hayashi and Sugiyama 2007). Les mécanismes de contrôle qualité et les chaperonnes sont probablement impliqués.

La thapsigargine et la curcumine sont des inhibiteurs des pompes à calcium du réticulum (SERCA/*Sarco-Endoplasmic Reticulum* Ca^{2+} -ATPase). Ces composés réduisent la quantité de calcium présente dans le RE, ce qui a pour effet de limiter l'action des chaperonnes calcium-dépendantes comme la calnexine ou la calréticuline. Certaines études effectuées sur le mutant CFTR $\Delta F508$ en présence de ces composés ont montré une relative efficacité pour provoquer sa maturation (Egan et al. 2002, Egan et al. 2004), malgré des résultats contradictoires (Loo, Bartlett and Clarke 2004). La N-butyldeoxyjojirimycine (ou miglustat) est un inhibiteur de la α -1,2-glucosidase, une enzyme de déglucosylation impliquée dans les interactions avec la calnexine. Ce composé s'est révélé efficace pour prévenir les interactions entre CFTR $\Delta F508$ et la calnexine et permettre au mutant de devenir mature et fonctionnel (Norez et al. 2006).

Des investigations pour identifier les interactions mutants/chaperonnes cellulaires permettraient de mieux comprendre quelles sont les chaperonnes qui aident au repliement et quelles sont celles qui entraînent la dégradation. La modulation de l'activité des chaperonnes impliquées (inhibiteurs et moyens de sur/sous-expression) pourrait permettre aux mutants d'échapper au contrôle qualité.

IV-3-2-5. La transplantation d'hépatocytes

Une première expérience a été menée sur les souris *Abcb4* $-/-$ (De Vree et al. 2000). Ces souris sont un modèle de choix pour l'étude d'ABCB4. La transplantation d'hépatocytes provenant de souris transgéniques exprimant *ABCB4* humain a permis de repeupler

partiellement le foie des souris *Abcb4* ^{-/-}, de restaurer une sécrétion de phospholipides et de diminuer la pathologie hépatique. Cependant, au bout d'un an, les souris nourries avec un complément en acide cholique, qui ont une pathologie plus sévère, développent de multiples tumeurs hépatiques et la sécrétion de phospholipides diminue. Ces effets secondaires devront être mieux compris avant d'envisager une application chez l'homme.

A ce jour, quelques dizaines de patients ont été traités par transplantation d'hépatocytes pour d'autres pathologies, notamment la PFIC2. Le nombre de cellules transplantées représente environ 5 % de la masse théorique du foie. Les cellules du donneur sont récupérées et purifiées après digestion des tissus hépatiques à la collagénase et par centrifugation différentielle. L'ajout de N-acétylcystéine, un anti-oxydant, augmente la viabilité des cellules. Les hépatocytes peuvent être transplantés frais ou après cryoconservation. La cryoconservation est importante car une des limitations de cette technique est qu'il faut la répéter plusieurs fois. Les hépatocytes sont délivrés au receveur par injection intraportale principalement, par voie percutanée ou par la veine mésentérique inférieure. Des immunosuppresseurs doivent être utilisés car le système immunitaire détruit rapidement les cellules injectées. Différentes approches sont en cours pour améliorer l'efficacité de cette nouvelle thérapie, notamment en utilisant les cellules souches (Hughes, Mitry and Dhawan 2011).

IV-3-2-6. La thérapie génique

Des délétions privant la protéine d'une partie de sa structure entraînent des défauts majeurs dans l'expression, le trafic, la stabilité et/ou l'activité. D'un point de vue thérapeutique, peu de choses peuvent être imaginées en dehors d'une thérapie génique. Insérer le gène fonctionnel à la place du gène muté pour corriger une mutation directement au niveau de l'ADN est considéré comme la solution miracle pour éradiquer les maladies génétiques. En pratique, le gène d'intérêt (ou transgène) peut être délivré à la cellule par un vecteur qui porte la molécule d'ADN (ou d'ARN). Plusieurs facteurs sont à considérer pour mener à bien cette technique : la maladie doit être monogénique, les cellules de l'organe affecté doivent être facilement accessibles et la maladie doit être progressive, c'est-à-dire offrant un temps de « phénotype normal » au patient pour envisager la thérapie. Les méthodes employées diffèrent en fonction du tissu ou de l'organe à cibler (Martini, Rocco and Morales 2011). Le vecteur idéal possède certaines caractéristiques : il doit être capable de délivrer le transgène sans être détecté par le système immunitaire, être non-inflammatoire, être sûr pour l'hôte humain, et permettre une longue expression du transgène et/ou être réadministré sans danger (Flotte and

Laube 2001). Le système de transfert de gène peut être viral (transduction) ou non (transfection). La transfection utilise des moyens physiques ou chimiques (lipides cationiques combinés à l'ADN par exemple) pour insérer le transgène dans les cellules. Cette méthode fonctionne bien *in vitro* sur des cellules en culture. Les vecteurs viraux ont néanmoins une meilleure efficacité *in vivo*. Les virus ont un tropisme naturel pour les cellules hôtes, assurant l'efficacité du passage du transgène à travers la membrane cellulaire (figure 34).

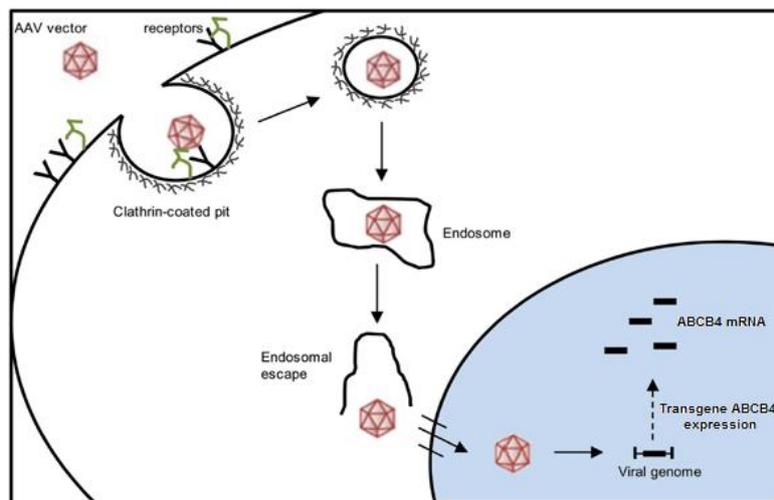


Figure 34: Modèle d'entrée dans la cellule et trafic d'un vecteur adeno-associated virus (AAV). Le vecteur AAV rentre dans la cellule par endocytose en reconnaissant un récepteur de surface dans des vésicules recouvertes de clathrine. Après l'endocytose, le vecteur AAV peut sortir de l'endosome et rentrer dans le noyau à travers les pores nucléaires. Le transgène *ABCB4* peut alors s'exprimer. Inspiré du modèle proposé pour le CFTR, (Martini et al. 2011).

La majorité des vecteurs viraux utilisés dérivent de virus humain et d'autres primates. Les adénovirus (Ad), les *Adeno-Associated-Virus* (AAV), les virus herpes simplex (HSV), les baculovirus, les virus d'Epstein-Baar, les lentivirus et autres rétrovirus sont les plus utilisés. Les vecteurs AAV sont considérés comme les meilleurs candidats pour les applications de thérapie génique, incluant le traitement de nombreuses maladies hépatiques (van der Laan et al. 2011). L'endothélium du foie est de type sinusoidal fenestré : une simple injection dans une veine périphérique suffit pour réaliser la transduction et permettre au vecteur de pénétrer dans l'espace de Disse pour accéder aux hépatocytes. Les études de biodistribution des vecteurs menées sur des rongeurs et des singes ont montré que certains sérotypes d'AAV (AAV2, AAV8 et AAV9) avaient de meilleures capacités de ciblage des hépatocytes par rapport aux autres tissus (Sands 2011, Wang et al. 2010). Il existe cependant une zonation de la transduction, les hépatocytes proches des veines centrales étant mieux transduits que ceux

situés dans les régions périportales (Bell et al. 2011). De plus, la durée de l'expression du transgène reste relativement courte (Flageul et al. 2009) et la réactivité immunitaire représente encore une barrière à une réussite clinique. Plusieurs stratégies devraient permettre d'optimiser l'efficacité de cette approche thérapeutique : utilisation d'autres sérotypes, modifications de la capsid, utilisation conjointe d'immunosuppresseurs, et mise au point de régulateurs transcriptionnels (van der Laan et al. 2011).

Malgré de réelles avancées, cette technique a ses limites. Des essais sur l'homme souffrant d'autres pathologies ont abouti à des décès, certains inexplicables (Jenks 2000), d'autres ayant conduit à des événements d'insertions mutagènes lors de l'insertion du gène par un système rétroviral, provoquant un cancer (Hacein-Bey-Abina et al. 2003, Check 2002).

Pour conclure cette partie, il a été montré qu'avec seulement 5 % d'expression correcte d'ABCC7/CFTR la sévérité de la mucoviscidose diminue (Ramalho et al. 2002). Rétablir en partie l'expression normale de mutant d'ABCB4 par des moyens pharmacologiques (agonistes de FXR, chaperonnes moléculaires), génétique (thérapie génique) ou cellulaire (transplantation d'hépatocytes) pourrait suffire à améliorer le phénotype pathologique des patients. Des investigations devront établir le seuil minimal d'activité d'ABCB4 nécessaire à l'amélioration.

-OBJECTIF DES TRAVAUX DE THESE-

Les travaux sont consacrés au transporteur biliaire de la phosphatidylcholine, ABCB4. Ils ont pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de la biosynthèse et du transport d'ABCB4 vers la membrane des canalicules biliaires, de caractériser l'effet des mutations identifiées chez des patients, et de tenter, le cas échéant, de corriger un défaut de trafic.

Les résultats sont divisés en deux parties.

La première partie est consacrée à l'étude d'une mutation décrite chez un patient homozygote présentant une PFIC3. Cette mutation est localisée dans le premier domaine NBD où elle entraîne le remplacement d'une isoleucine (I) par une phénylalanine (F) à la position 541 (Jacquemin et al. 2001). Les résultats montrent que cette mutation provoque un défaut de repliement et entraîne la rétention de la protéine mutée dans le réticulum endoplasmique, en interaction avec des chaperonnes cellulaires. Cette rétention peut être levée par la cyclosporine A.

La seconde partie est consacrée à l'étude du rôle de l'extrémité N-terminale d'ABCB4. Cette extrémité, localisée du côté cytosolique, comporte environ 54 acides aminés qui ne sont pas conservés entre les transporteurs ABC. L'étude de délétions partielles ou totales de l'extrémité N-terminale, et de mutations décrites chez des patients, a permis d'identifier une région riche en lysines impliquée dans la sortie du réticulum endoplasmique et des acides aminés potentiellement phosphorylables, indispensables à l'activité de translocation de la phosphatidylcholine.

PREMIERE PARTIE :

Effet de la mutation I541F

Les premiers travaux ont porté sur l'étude de la mutation I541F décrite chez un patient atteint de PFIC3 (Jacquemin et al. 2001). Les premières manifestations sont apparues à l'âge d'un an par un prurit et la maladie a évolué vers une hypertension portale qui a justifié une transplantation du foie à l'âge de 5 ans. Cette mutation est localisée dans le NBD1 et se situe entre la signature des transporteurs ABC (LSGGKQ) et le motif Walker B. Cette région est entièrement identique entre ABCB1 et ABCB4. Nous avons inséré la mutation sur des plasmides codant ABCB4 et le transporteur modèle ABCB1. Dans notre système, ABCB1 a l'avantage d'être fusionné à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) ce qui facilite les études de localisation intracellulaire. Les lignées cellulaires utilisées pour notre travail sont les cellules MDCK (*Mardin-Darby Canine Kidney*) et les cellules HepG2. Ces deux types cellulaires sont polarisés. Les cellules MDCK dérivent de tubules rénaux de chien et possèdent une surface apicale et un pôle basolatéral bien différenciés. Ce sont des cellules de référence pour les études du transport polarisé. Les cellules HepG2 dérivent d'un hépatocarcinome humain. Comme les hépatocytes, elles développent un pôle apical canaliculaire bien individualisé. Les mutants ABCB1/ABCB4-I541F sont transfectés dans ces cellules afin d'étudier l'effet de la mutation sur le transporteur pour ensuite développer des moyens pour le corriger.

Le premier article (Delaunay et al. 2009) caractérise l'effet de la mutation I541F sur la protéine. Les plasmides codant ABCB4-Wild Type (WT) et ABCB4-I541F sont transfectés dans les lignées cellulaires. Les résultats obtenus en microscopie à fluorescence montrent que la protéine WT est exprimée au niveau du pôle apical des cellules MDCK et HepG2 alors que le mutant I541F reste intracellulaire. Les mêmes observations sont faites pour ABCB1-WT-GFP et ABCB1-I541F-GFP. Pour déterminer dans quel compartiment intracellulaire s'accumule le mutant I541F, des co-marquages avec des marqueurs de compartiments cellulaires sont réalisés. Le mutant colocalise avec la calnexine et PDI (*Protein Disulfide Isomerase*), deux marqueurs du réticulum endoplasmique (RE). Il colocalise aussi avec la giantine, un marqueur des citernes cis-golgiennes. Ces résultats démontrent une accumulation du mutant dans le RE et le Golgi-cis. Les analyses biochimiques montrent que le mutant ABCB1-I541F-GFP ne mature pas correctement. Sa sensibilité à la digestion par l'EndoH

montre qu'il possède des chaînes N-glycanes riches en mannose, contrairement à la protéine WT qui est glycosylée de façon complexe et donc insensible à l'EndoH. La rétention du mutant dans le RE ainsi que l'absence de maturation suggère que la mutation entraîne un défaut de repliement. Il a été montré que l'abaissement de la température pouvait permettre à des protéines mal repliées de sortir du réticulum et de poursuivre leur maturation normalement. Effectivement, lorsque les cellules MDCK ABCB1-I541F-GFP sont mises à 27°C pendant 24 h, l'expression apicale du mutant ainsi que sa maturation sont rétablies. De la même manière, le mutant ABCB4-I541F est exprimé sous forme mature à la membrane canaliculaire des cellules HepG2 après abaissement de la température. Dans le cas d'ABCB1, l'activité a pu être mesurée grâce à sa capacité à extraire de la calcéine fluorescente des cellules. Les mesures indiquent qu'ABCB1-I541F-GFP est actif après avoir été rétabli à la membrane apicale par l'abaissement de la température.

Les travaux du deuxième article (Gautherot et al. 2012) explorent différentes stratégies pour rétablir la localisation normale du mutant I541F en modulant le système de contrôle qualité cellulaire ou en utilisant des agents chimiques et pharmacologiques. Nous montrons que le repliement du mutant n'est pas correct car il est plus sensible à la dégradation par des protéases. Les défauts conformationnels des protéines sont reconnus par les mécanismes de contrôle qualité cellulaire, dont les protéines chaperonnes. Le mutant ABCB1-I541F-GFP interagit avec les protéines chaperonnes étudiées, la calnexine et Hsc70. La première hypothèse est que la séquestration du mutant dans le RE est liée à son interaction avec la calnexine. Dans le but de réduire cette interaction, des ARN interférents contre la calnexine sont utilisés pour diminuer son expression. La diminution de l'expression de la calnexine ne rétablit pas un trafic et une expression normale du mutant. Hsc70 est une chaperonne cytosolique qui a une fonction d'aide au repliement. La sur-expression de Hsp70 (son homologue inductible) par choc thermique ou par transfection avec un plasmide codant Hsp70 ne change pas la rétention dans le RE. Une autre approche consiste à étudier l'effet de chaperonnes chimiques et pharmacologiques. La thapsigargine et le 4-phenybutyrate se sont montrés inefficaces. En revanche, le glycérol permet au mutant de sortir du RE et de poursuivre sa maturation bien qu'il reste en partie intracellulaire. La cyclosporine A (CsA) permet la maturation, l'expression à la membrane apicale des cellules MDCK et rétablit l'activité du mutant ABCB1-I541F-GFP. La CsA permet aussi au mutant ABCB4-I541F de maturer dans les cellules MDCK et d'être exprimé à la membrane canaliculaire des cellules HepG2.

-ARTICLES-

Article I: Delaunay, 2009. *A missense mutation in ABCB4 gene involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 leads to a folding defect that can be rescued by low temperature. Hepatology, Vol.49, No.4.*

Page 82

Article II: Gautherot, 2012. *Effects of cellular, chemical and pharmacological chaperones on the rescue of a trafficking-defective mutant of the ATP-binding cassette transporter proteins ABCB1/ABCB4. J Biol Chem, 287, 5070-8.*

Page 92

A Missense Mutation in *ABCB4* Gene Involved in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 3 Leads to a Folding Defect that Can Be Rescued by Low Temperature

Jean-Louis Delaunay,^{1,2} Anne-Marie Durand-Schneider,^{1,2} Danièle Delautier,^{1,2} Alegna Rada,^{1,2,5} Julien Gautherot,^{1,2} Emmanuel Jacquemin,^{3,4} Tounsia Aït-Slimane,^{1,2} and Michèle Maurice^{1,2}

Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3) is a rare liver disease characterized by early onset of cholestasis that leads to cirrhosis and liver failure before adulthood. PFIC3 may be improved by chronic administration of ursodeoxycholic acid, although in many cases liver transplantation is the only therapy. The disease is caused by mutations of the adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette, sub-family B, member 4 (*ABCB4*) [multidrug resistance 3 (*MDR3*)] gene encoding a specific hepatocellular canalicular transporter involved in biliary phosphatidylcholine secretion. Several mutations have been reported; however, the effect of individual mutations has not been investigated. *ABCB4* is highly homologous to ATP-binding cassette, sub-family B, member 1 (*ABCB1*) (*MDR1*), the multidrug transporter responsible for drug resistance of cancer cells. We have studied the effect of mutation I541F localized to the first nucleotide-binding domain, which is highly conserved between *ABCB4* and *ABCB1*. Plasmids encoding the wild-type human *ABCB4* or rat *ABCB1*-green fluorescent protein (GFP) construct, and corresponding I541F-mutants, were expressed in hepatocellular carcinoma, human (HepG2) and Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. Expression studies showed that *ABCB4* was localized at the bile canalicular membrane in HepG2 cells and at the apical surface in MDCK cells, whereas the I541F mutant was intracellular. In MDCK cells, *ABCB1*-I541F also accumulated intracellularly in compartments, which were identified as the endoplasmic reticulum and cis-Golgi, and remained partially endoH-sensitive. After shifting cells to 27°C, *ABCB1*-I541F was expressed at the apical cell surface in a mature and active form. Similarly, *ABCB4* was significantly trafficked to the membrane of bile canaliculi in HepG2 cells. **Conclusion:** Mutation I541F causes mislocalization of both *ABCB4* and *ABCB1*. Intracellular retention of *ABCB4*-I541F can explain the disease in PFIC3 patients bearing this mutation. The observation that plasma membrane expression and activity can be rescued by low temperature opens perspectives to develop novel therapies for the treatment of PFIC3. (HEPATOLOGY 2009;49:1218-1227.)

Mutations of the adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette, sub-family B, member 4 (*ABCB4*) gene [also called multidrug resistance 3 (*MDR3*)] are at the origin of progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3), a rare lethal autosomal recessive liver disorder, characterized by early onset of persistent cholestasis that progresses to cirrhosis and

liver failure before adulthood.¹⁻³ PFIC3 can be distinguished from other PFIC types by a high serum gamma-glutamyltransferase activity and liver histology that shows portal inflammation and ductular proliferation at early stages.²⁻⁴ The morbidity is primarily the result of profound cholestasis that often is associated with persistent pruritus. The *ABCB4* gene encodes *ABCB4*, a phospho-

Abbreviations: ABC, adenosine triphosphate-binding cassette; *ABCB1*, adenosine triphosphate-binding cassette, subfamily B, member 1; *ABCB4*, adenosine triphosphate-binding cassette, sub-family B, member 4; ATP, adenosine triphosphate; cDNA, complementary DNA; endoH, endo- β -N-acetylglucosaminidase H; ER, endoplasmic reticulum; GFP, green fluorescent protein; HepG2, hepatocellular carcinoma, human; MDCK, Madin-Darby canine kidney; *MDR1*, multidrug resistance 1; *MDR3*, multidrug resistance 3; NBD, nucleotide-binding domain; PFIC3, progressive familial intrahepatic cholestasis type 3; PNGase-F, peptide N-glycosidase F; UDCA, ursodeoxycholic acid.

From the ¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR S893; Paris, France; ²Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Paris, France; ³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pediatric Hepatology and National Reference Center for Biliary Atresia, Bicêtre Hospital, Le Kremlin Bicêtre, France; and ⁴INSERM UMR S757, University of Paris, Orsay, France.

⁵Present address: Central University of Venezuela, Cell Biology Section, Tropical Medicine Institute, Caracas, Venezuela.

Received August 8, 2008; accepted November 27, 2008.

Supported by grants from INSERM and UPMC. A.R. received a fellowship from LOCTI-UCV2007 (Laboratorios Elmor SA and Advance Tubular de Venezuela). The cytofluorimeter used in this study was funded with the help of the Région Ile de France (SESAME).

lipid floppase involved in biliary phosphatidylcholine excretion.⁵ Cholestasis is thought to result from the toxicity of bile in which detergent bile salts are not neutralized by phospholipids, leading to bile canaliculi and biliary epithelium injuries. The absence of phospholipids in bile is expected to destabilize micelles and promote lithogenicity of bile with crystallization of cholesterol, which could favor small bile duct obstruction. There is now strong evidence that in addition to PFIC3, *ABCB4* defect can be involved in intrahepatic cholestasis of pregnancy, cholesterol gallstone disease, drug-induced liver injury, and idiopathic biliary fibrosis in the adult.⁶⁻¹³ The patients are mainly heterozygous, contrary to PFIC3 patients who are generally homozygous or compound heterozygous. These cholestases of the adult generally improve or regress under treatment with ursodeoxycholic acid (UDCA), a hydrophilic bile acid. In children suffering from PFIC3, UDCA only improves the symptoms in nearly 30% of the cases, and the only alternative remains liver transplantation.⁴

ABCB4 belongs to the family of membrane transporters that contain an ATP-binding cassette (ABC-transporters) and hydrolyze ATP during translocation of a wide variety of molecules across membranes. In the human, the *ABCB4* gene encodes several splicing variants with a major transcript encoding a protein of 1279 amino acids.¹⁴ *ABCB4* is a polytopic transmembrane protein composed of two halves, each containing a transmembrane domain with six membrane-spanning segments, and an ATP-binding domain including the ABC signature. *ABCB4* is highly homologous to ATP-binding cassette, sub-family B, member 1 (*ABCB1*) [multidrug resistance 1 (*MDR1*)], with 77% identity at the amino acid level. Despite their high degree of homology, *ABCB1* and *ABCB4* are functionally different and have distinct tissue-specific expression patterns. *ABCB4* is mainly expressed in the liver¹⁵ and is specialized in phosphatidylcholine transport. *ABCB1* extrudes a wide variety of drugs and is responsible for multidrug resistance of cancer cells. Since the identification of *ABCB4*-associated diseases, a growing number of mutations have been reported.¹⁶⁻¹⁸ However, it remains unclear how mutations identified from genetics studies affect *ABCB4* expression. If it is clear that frame-shift mutations introduce premature stop codons and lead to nonfunctional truncated mutants, missense mutations may affect the protein in

different ways. A defined mutation may prevent the protein to be located properly at the canalicular membrane or may impair its function. The precise knowledge of the defect may help to consider new therapeutic strategies, at least for some mutations.

We have studied the effect of mutation I541F, located in the first nucleotide-binding domain (NBD), which has been described in a homozygous patient with PFIC3.⁴ This female patient experienced chronic cholestasis since 1 year of age and developed cirrhosis. Chronic administration of oral UDCA had no beneficial effect, and she received a liver graft at age 5 years. *MDR3* liver immunostaining showed absence of canalicular protein. We have reproduced the mutation in both *ABCB4* and *ABCB1* and show that this mutation is not specifically linked to *ABCB4* function but causes a folding defect of the NBD domain that affects normal processing and trafficking of both transporters to the plasma membrane. When folding is improved at reduced temperature, both traffic and activity are rescued.

Materials and Methods

Antibodies and Reagents. The monoclonal P3II-26 anti-*ABCB4* antibody was obtained from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). Monoclonal C219 was from Abcam (Cambridge, UK). Rabbit polyclonal anti-calnexin and mouse monoclonal anti-disulphide isomerase were from Stressgen (Ann Arbor, MI). Monoclonal anti-GFP was from Roche Diagnostics (Meylan, France). Monoclonal AC17 anti-lysosomal-associated membrane protein 2 was a kind gift of A. Le Bivic (IBDM, Marseille, France). Mouse monoclonal antibody to Golgi matrix protein was from Sigma (St-Quentin-Fallavier, France). Goat polyclonal antibody anti-early endosome antigen and monoclonal anti-giantin were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The polyclonal antibody against GFP was raised in the laboratory by J.L.D.. Cy3-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch (Montluçon, France). Alexa Fluor 488 secondary antibodies and culture media were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA). Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase H (endoH) and peptide *N*-glycosidase F

Address reprint requests to: Michèle Maurice, INSERM UMR S893, Université Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine Saint-Antoine, 27 rue Chaligny, F-75571 Paris Cedex 12, France. E-mail: michele.maurice@inserm.fr; fax: (33)-1-4001-1390.

Copyright © 2008 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.22773

Potential conflict of interest: Nothing to report.

(PNGase-F) were from New England Biolabs (Ipswich, MA). Calcein-AM was from AnaSpec (San Jose, CA). Verapamil was from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK). The ECL-Plus detection kit was from GE Healthcare France (Orsay, France). All other reagents were from Sigma.

Constructs and Mutagenesis. The plasmid pJ3omega-MDR3 encoding human ABCB4 isoform A was obtained from the American Type Culture Collection (LGC Standards, Molsheim, France). The ABCB4 complementary DNA (cDNA) was extracted with HindIII and XbaI restriction enzymes and cloned into the pcDNA3 expression vector (Invitrogen) using the same restriction sites as described.¹⁹ The pEGFP-MDR1 plasmid encoding rat ABCB1 fused with GFP at the C-terminus,²⁰ was a gift of Pr. I. M. Arias (Tufts University School of Medicine, Boston, MA). For construction of the ABCB4-I541F and ABCB1-I541F-GFP mutants, site-directed mutagenesis was performed using the QuikChange XL mutagenesis kit (Stratagene Europe, Amsterdam Zuidoost, The Netherlands). The primers used for mutagenesis were GCA GAA GCA GAG GTT CGC CAT TGC ACG TGC (sense) and GCA CGT GCA ATG GCG AAC CTC TGC TTC TGC (antisense) for ABCB4 and GGA CAG AAA CAG AGG TTC GCC ATT GCC CGG GCC (sense) and GGC CCG GGC AAT GGC GAA CCT CTG TTT CTG TCC (antisense) for ABCB1. Constructs were verified by automated sequencing.

Cell Culture and Transfection. Hepatocellular carcinoma, human (HepG2) cells and Madin-Darby canine kidney (MDCK) II cells were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin, in a humidified incubator under a 5% CO₂/air atmosphere. HepG2 and MDCK cells were transfected using nucleofector II (Amaxa, Cologne, Germany) using program H22 (solution V) and K29 (solution T), respectively. Stable transfectants were obtained by selection with 800 µg/mL G-418 sulfate for 3 weeks and were subsequently grown in the presence of 100 µg/mL G-418. Enrichment of the cell population with ABCB1-I541F-GFP-expressing cells was performed by fluorescence-activated cell sorting. Trypsinized cells (usually 10⁶ cells) were harvested and washed in Leibovitz's medium with 20% fetal bovine serum. Fluorescent cells were sorted using an Influx 500 Cytocopia cytofluorimeter (Seattle, WA). After sorting, cells were immediately placed in standard culture conditions and expanded. For 27°C experiments, cells were fed with Leibovitz's medium and placed in an incubator without CO₂. Control cells were placed in the same conditions, but at 37°C. Before the experiments, cells were treated overnight

with 10 mM sodium butyrate, to increase the cytomegalovirus promoter transcriptional activity.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy. For immunofluorescence, HepG2 cells were grown on glass coverslips. MDCK cells were grown either on coverslips or on Transwell polycarbonate filter units (Costar Corp., Cambridge, MA). For the detection of ABCB4, cells were fixed with methanol/acetone (4/1, vol/vol) for 3 minutes at -20°C, and processed for immunostaining with the mouse monoclonal anti-ABCB4 P3II-26 as described.²¹ For the detection of ABCB1 with C219, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 minute, then with methanol for 10 minutes. In all other cases, immunofluorescence was performed on cells fixed with 4% paraformaldehyde and subsequently permeabilized with 0.075% saponin. Incubations with primary and secondary antibodies were performed as described.²² Nuclei were stained with propidium iodide. Confocal imaging was acquired with a Leica TCS SP2 Laser Scanning Spectral system attached to a Leica DMR inverted microscope with a 63/1.4 immersion objective. Digital images were analyzed using the on-line ScanWare software and processed with Image J software (NIH, MA).

Immunoprecipitation, Deglycosylation and Western Blot. Transfected cells were washed with phosphate-buffered saline containing 1mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂ and lysed on ice for 30 minutes in 20 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetra-acetic acid, pH 7.4, containing 1 % (wt/vol) Triton X-100 in the presence of a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Lysates were passed through a 23-gauge needle to shear the DNA, and then centrifuged at 16,000 × g for 10 minutes to remove insoluble materials. Protein content was determined by Uptima bicinchoninic acid protein assay (Interchim, Montluçon, France). Equal amounts of protein were directly processed for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis or immunoprecipitated. Immunoprecipitation of ABCB1-GFP was performed using polyclonal anti-GFP (1.5 µL) adsorbed onto 70 µL protein A-Sepharose beads (1 mg protein A/mL) for 4 hours at 4°C. Beads were then washed and resuspended in appropriate buffers for digestion with endoH (2000 U) or PNGase-F (2000 U) (New England Biolabs) according to the instructions of the manufacturer. The reaction was stopped with 5× Laemmli buffer, and samples were processed for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis on 6% polyacrylamide gels. Immunoblotting was performed using the mouse monoclonal anti-GFP followed by horseradish peroxidase-conjugated mouse-specific secondary antibody. Development of peroxidase activity was performed with the ECL Plus detection kit.

Calcein Assay. The procedure was essentially performed as described.²³ Cells were seeded at 70,000 cells/well in 96-well plates with clear bottoms (Greiner Bio-One, Les Ulis, France). Cells were fed 24 hours after seeding, and the assay was performed 48 hours later. Medium was removed and monolayers washed three times with Leibowitz's medium. Calcein-AM was added at a final concentration of 5 μM and 0.1% dimethylsulfoxide in 100 μL Leibowitz's medium. Maximum calcein fluorescence was measured in cells treated with 40 μM verapamil, which was added 10 minutes before and during the assay. Plates were immediately placed in a Tecan SpectraFluor cytofluorimeter (MTX Lab Systems, Vienna, VA) for 60 minutes and read at 15-minute intervals at 485-nm excitation and 530-nm emission.

Results

Expression of ABCB4 and ABCB4-I541F in HepG2 and MDCK Cells. HepG2 cells derive from a human hepatocellular carcinoma and are able to polarize and develop bile canaliculi in culture. To examine the cellular localization of ABCB4 and ABCB4-I541F, HepG2 cells were transiently transfected with the pcDNA3 plasmid encoding wild-type ABCB4 or ABCB4-I541F or with the empty plasmid. Immunofluorescence was performed 60 hours later with the P3II-26 monoclonal antibody. Control cells transfected with the empty plasmid did not express detectable amounts of ABCB4 (not shown). Cells transfected with the plasmid encoding ABCB4 expressed the protein exclusively on the membranes of bile canaliculi, which correspond to the apical surface (Fig. 1A), consistent with the expected canalicular localization of ABCB4 in hepatocytes.¹⁵ By contrast, cells transfected with the plasmid encoding ABCB4-I541F did not express the protein at the membrane of bile canaliculi. The mutant was exclusively detected intracellularly (Fig. 1B).

The MDCK cell line is a well-characterized polarized kidney cell line, which forms a fully polarized monolayer when grown on filters. MDCK cells are widely used to study polarized expression and traffic of membrane proteins. MDCK cells were transfected with the plasmids encoding ABCB4 and ABCB4-I541F or the empty plasmid. Transfection was more efficient than in HepG2 cells, and stably transfected cell populations were established. Again no ABCB4 protein was detected in control cells transfected with the empty plasmid (not shown). In cells transfected with wild-type ABCB4 cDNA, the protein was exclusively detected at the apical surface, over the nuclei (Fig. 1C). Transverse confocal sections confirmed that ABCB4 was apically localized (Fig. 1E). By contrast, ABCB4-I541F was detected around the nuclei (Fig. 1D).

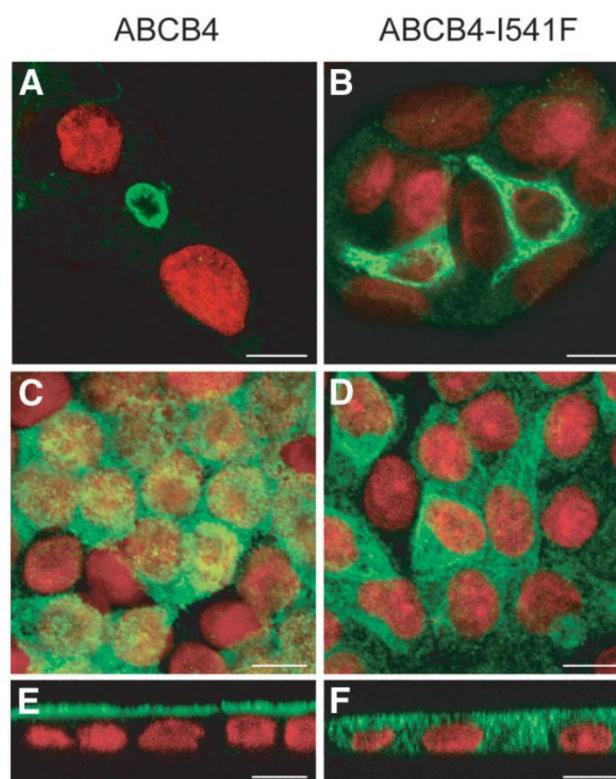


Fig. 1. Expression of ABCB4 and ABCB4-I541F in HepG2 and MDCK cells. HepG2 cells transiently expressing ABCB4 (A) or ABCB4-I541F (B), and filter-grown MDCK cells stably expressing ABCB4 (C, E) or ABCB4-I541F (D, F) were fixed with methanol/acetone and processed for immunofluorescence using the P3II-26 monoclonal antibody and Alexa 488-conjugated anti-mouse immunoglobulin G. Nuclei were stained with propidium iodide. For MDCK cells, (C) and (D) show projections of confocal xy series, whereas (E) and (F) are transverse sections obtained through the z-scan procedure of the confocal microscope. Bars, 10 μm .

Transverse confocal sections showed a roughly uniform distribution in all the height of the cells, indicating that the mutation causes intracellular retention (Fig. 1F). These expression studies show that ABCB4 is expressed at the apical membrane, whereas ABCB4-I541F leads to a major trafficking defect and accumulates within the cell cytoplasm, in both HepG2 and MDCK cells.

ABCB1-I541F-GFP Is Also Intracellular. The I541F mutation is localized next to the ABC signature (LSSGGQ) in the first nucleotide-binding domain. This domain is involved in binding and hydrolysis of ATP. It is highly conserved between members of the same ABC transporter family, as shown by comparison with the multidrug transporter ABCB1 (Fig. 2). To determine whether the mutation affected ABCB4 specifically or not, the mutation was introduced into ABCB1. We used the vector pEGFP-ABCB1, which encodes ABCB1 fused with GFP at the C-terminus.²⁰ It has been shown that the presence of GFP does not affect ABCB1 trafficking or



Fig. 2. Alignment of human ABCB4 and rat ABCB1 amino acids in the first nucleotide-binding domain. The location of mutation I541F is indicated by an arrow. The Walker A, signature, and Walker B domains involved in ATP binding are underlined.

activity.²⁰ In MDCK cells, ABCB1-GFP was exclusively expressed at the apical surface (Fig. 3A), as already reported.²⁴ In contrast, ABCB1-I541F-GFP was intracellular, as observed for ABCB4-I541F. In these experiments, the green fluorescent signal of GFP was taken as a reporter for

the localization of the protein. To check that it was indeed representative of the fusion protein, cells were also immunostained using the C219 monoclonal antibody, which is directed against MDR proteins. Cells were grown to subconfluence to visualize more precisely the intracellular localization. Figure 3B shows that the two fluorescent signals colocalized perfectly. ABCB1-I541F-GFP accumulated around the nuclei, in membrane compartments that appeared sometimes granular (Fig. 3B). These expression experiments show that mutation I541F causes a trafficking defect both in ABCB1 and ABCB4, and that ABCB1-GFP chimera provides an interesting model to further investigate the effect of I541F mutation.

ABCB1-I541F-GFP Is Retained in an Endoplasmic Reticulum/Golgi Compartment. To precisely determine the sites of intracellular accumulation, different cellular compartments were identified with specific antibodies in MDCK/ABCB1-I541F-GFP cells grown to subconfluence. Detection of the mutant by the green fluorescence of GFP prevented any misinterpretation attributable to possible cross-reaction between antibodies. In all of these colocalization experiments, ABCB1-I541F-GFP was observed exclusively in the cytoplasm, especially around the nuclei, whereas little ABCB1-GFP was intracellular (Fig. 4A). ABCB1-I541F-GFP colocalized strongly with calnexin and to a lesser extent with protein disulfide isomerase, two endoplasmic reticulum (ER) markers (Fig. 4B). Alteration of the ER was evident, especially when the pattern of calnexin was examined. In nontransfected cells, the distribution of calnexin was finely granular, whereas in ABCB1-I541F cells, bundles strongly labeled for calnexin colocalized with the fluorescent mutant (Fig. 4B). This pattern was strongly suggestive of an ER accumulation with local enlargements of ER cisternae. A large colocalization was also observed with the cis-Golgi marker giantin (Fig. 4B), but only little colocalization with Golgi matrix protein, a middle-Golgi marker. No colocalization was observed with the early

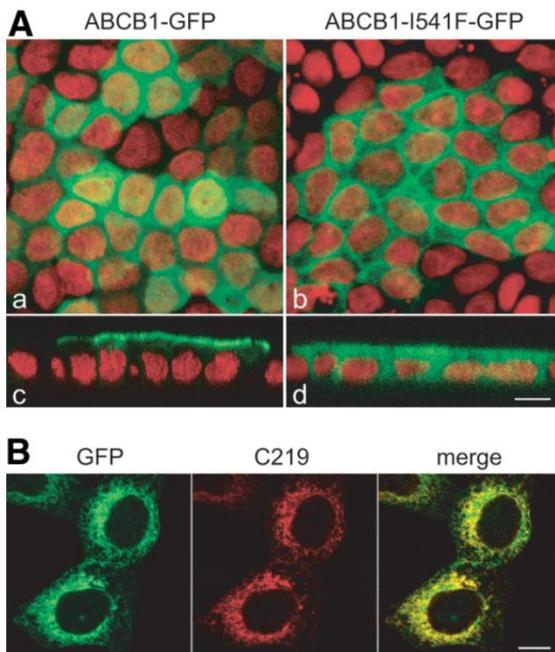


Fig. 3. Expression of ABCB1-GFP and ABCB1-I541F-GFP in MDCK cells. (A) Confluent filter-grown MDCK cells stably expressing ABCB1-GFP (A, C) or ABCB1-I541F-GFP (B, D) were fixed with paraformaldehyde and examined for the fluorescence of GFP. Nuclei were stained with propidium iodide. (A) and (B) show projections of confocal xy series, whereas (C) and (D) are transverse sections obtained through the z-scan procedure of the confocal microscope. (B) Subconfluent MDCK cells stably expressing ABCB1-I541F-GFP (B, D) were fixed with paraformaldehyde and ethanol, and processed for immunofluorescence using the monoclonal C219 antibody and Cy3-conjugated anti-mouse immunoglobulin G. The GFP channel (A) was recorded using the 488-nm excitation wavelength and an adjusted window used for optimized GFP emission recovery. Cy3 was recovered after 550-nm excitation and a standard emission window. Merged images were obtained after treatment with Image J software. Bars, 10 μ m.

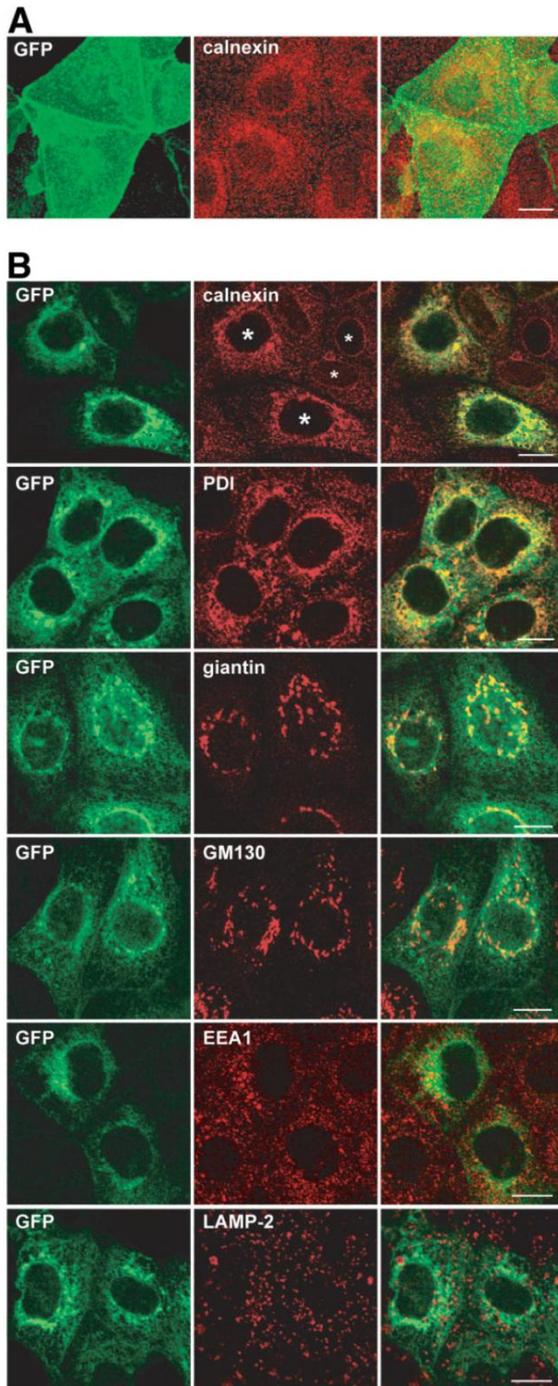


Fig. 4. Colocalization of ABCB1 and ABCB1-I541F with markers of specific cellular compartments. Subconfluent MDCK cells stably expressing ABCB1-GFP (A) or ABCB1-I541F-GFP (B) were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.075% saponin, and processed for immunofluorescence using antibodies to calnexin, protein disulfide isomerase, giantin, Golgi matrix protein, early endosomal antigen, or lysosomal-associated membrane protein 2, and appropriate Cy3-conjugated secondary antibodies. (A) shows projections of confocal xy series and merged images. (B) Single confocal sections and corresponding merged images. Note that the calnexin pattern (B, upper middle picture) is different in ABCB1-I541F-GFP-expressing cells (large asterisks) than in nontransfected cells (small asterisks), and colocalizes with the GFP signal. Bars, 10 μ m.

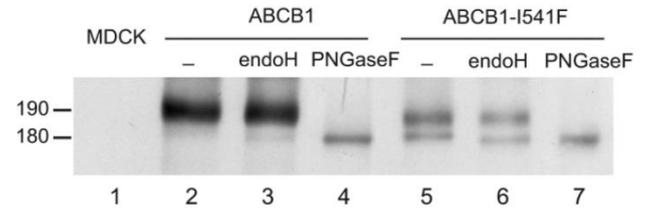


Fig. 5. Expression and glycosylation status of ABCB1-GFP and ABCB1-I541F-GFP in MDCK cells. MDCK/ABCB1-GFP and MDCK/ABCB1-I541F-GFP cells were lysed and immunoprecipitation was performed using a polyclonal anti-GFP antibody absorbed onto protein A-sepharose. Aliquots were subjected to endoH (lanes 3 and 6) or PNGase-F (lanes 4 and 7) digestion or left untreated (lanes 2 and 5), and processed for electrophoresis and immunoblotting using a monoclonal anti-GFP antibody. Lane 1: control sample immunoprecipitated from MDCK cells. Apparent molecular masses are indicated in kDa.

endosomal antigen or with the lysosomal protein lysosomal-associated membrane protein 2 (Fig. 4B). These colocalization experiments show that the mutant is retained and accumulates in an ER/Golgi compartment during its biosynthetic process.

ABCB1-I541F-GFP Is Not Processed Correctly. A biochemical means to investigate the state of processing of proteins is to check their glycosylation. ABCB4 has two N-glycosylation consensus sites in the first extracellular loop, and ABCB1 has three. To assess more precisely the processing defect caused by the mutation, the glycosylation status of ABCB1 and ABCB1-I541F was studied with endoglycosidases. On western blots, ABCB1-GFP migrated essentially with an apparent molecular mass of 190 kDa. A very faint band migrating at 180 kDa was also detected. The molecular mass of the 190 kDa band decreased to slightly less than 180 kDa after deglycosylation with PNGase-F (Fig. 5), but did not change after endoH treatment, indicating that the wild-type protein is fully matured with complex N-glycosylated chains. Only the faint 180-kDa band was endoH-sensitive and shifted to a band migrating slightly faster. In contrast, ABCB1-I541F-GFP migrated as two bands of roughly equal intensity of 180 and 190 kDa (Fig. 5). Treatment with endoH shifted the 180-kDa band to a slightly lower molecular mass (Fig. 5), indicating that a large part of the mutant was not complex glycosylated. Thus, biochemical studies confirmed that the I541F-mutant does not mature as the wild-type protein during the biosynthetic process, and remains largely in a high-mannose endoH-sensitive form.

Lowering the Temperature Allows the Mutant to Reach the Plasma Membrane. Retention in the ER/Golgi is suggestive of a folding defect that may be recognized by the cell quality control machinery and prevent the mutant from maturing. There are examples of folding

defects that can be overcome by lowering the temperature.²⁵ MDCK-ABCB1-I541F-GFP cells were filter grown to confluence at 37°C, then the cells were switched or not to 27°C for 24 hours. Figure 6A shows that in control cells grown at 37°C, ABCB1-I541F-GFP was intracellular, whereas in cells grown at 27°C, ABCB1-I541F-GFP was expressed at the apical surface. In the same conditions, ABCB1-GFP remained apically localized (not shown). Western blotting confirmed that, after switching to 27°C, the mutant acquired full maturation and migrated with a higher apparent molecular mass on western blots (Fig. 6B). These results show that I541F is a temperature-sensitive mutation and that processing and trafficking of the mutant reverts toward that of wild-type on lowering temperature.

ABCB1-I541F-GFP Is Functional When Expressed at the Apical Membrane. We took advantage of the drug transporting activity of ABCB1 to monitor the activity of the mutant. The calcein assay uses calcein-AM as an ABCB1 substrate.²³ Calcein-AM is the nonfluorescent acetoxymethyl ester derivative of the fluorescent probe calcein and can penetrate cell membranes. Once inside the cell, the lipophilic blocking groups are cleaved by nonspecific esterases, resulting in a charged fluorescent form that leaks out of cells far more slowly than its parent compound. Control MDCK cells accumulated calcein in both the presence and absence of the competitive inhibitor verapamil. In contrast, MDCK/ABCB1-GFP cells showed verapamil-inhibited extrusion of calcein (Fig. 6C). Only very weak activity was measured in MDCK/ABCB1-I541F-GFP cells grown at 37°C; however, when cells were grown at 27°C for 24 hours before the assay, they accumulated significantly less fluorescent calcein (Fig. 6C). These results show that mutation I541F does not impair activity, provided that the transporter can reach the plasma membrane.

ABCB4 Is Trafficked to the Bile Canaliculi of HepG2 Cells at Low Temperature. To check whether the temperature rescue of ABCB1-I541F in MDCK cells might be relevant for PFIC3 therapy, we studied the effect of low temperature on ABCB4 expression in HepG2 cells. Cells were transiently transfected with either ABCB4 or ABCB4-I541F cDNA. Forty-eight hours after transfection, cells were either left at 37°C or shifted to 27°C for 17 hours before studying ABCB4 expression. Figure 7A shows that ABCB4-I541F was detected in significant amount at the membrane of bile canaliculi in cells grown at 27°C. By contrast, no labeled bile canaliculi were observed in cells grown at 37°C. The bile canalicular localization of the wild-type protein was not changed by the temperature shift (Fig. 7A). By immunoblotting, ABCB4 was detected as a major band migrating in a region of 160

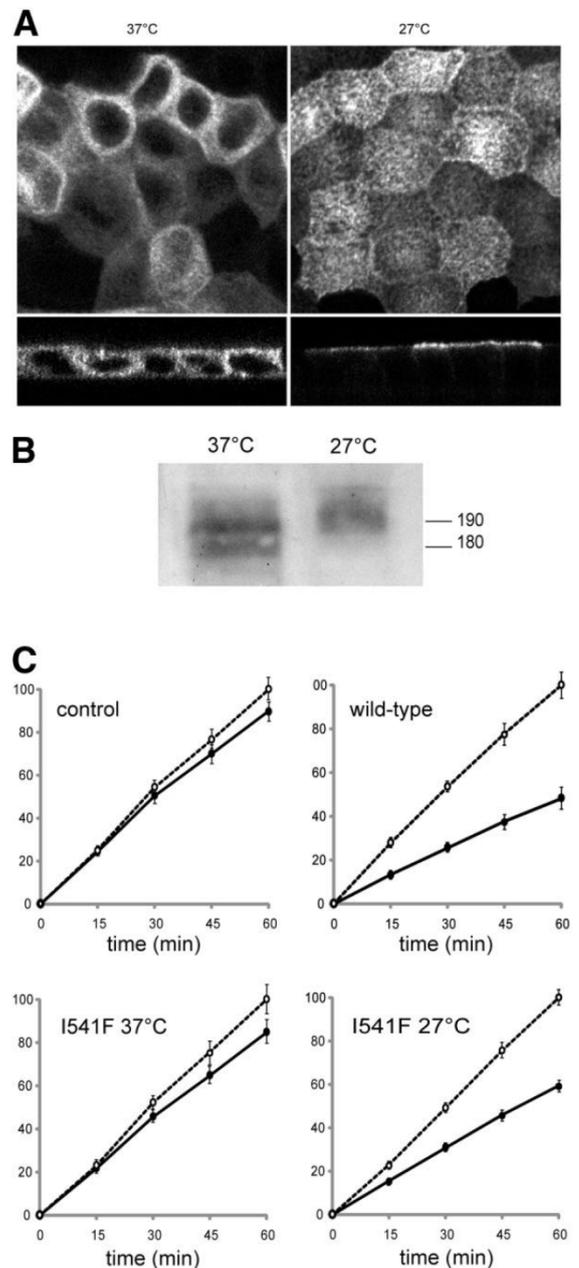


Fig. 6. Low temperature rescues functional ABCB1-I541F at the apical membrane. (A) MDCK/ABCB1-I541F-GFP cells were grown on filters until confluence at 37°C, then shifted or not to 27°C for 24 hours. Cells were fixed and examined for the fluorescence of GFP. Upper pictures show projections of confocal xy series, and lower pictures show transverse sections obtained through the z-scan procedure of the confocal microscope. Bar, 10 μ m. (B) Cells were grown as in (A), then the cells were lysed, and immunoblotting was performed using the monoclonal anti-GFP antibody. Apparent molecular masses are indicated in kDa. (C) Control MDCK cells, and MDCK/ABCB1-GFP cells were grown at 37°C, in 96-wells plates for 3 days. MDCK/ABCB1-I541F-GFP cells were grown at 37°C then shifted or not to 27°C 24 hours before the experiment. The calcein assay was performed as described in Materials and Methods in the presence (open symbols) or absence (closed symbols) of 40 μ M verapamil. Results are expressed as the percentage of fluorescent calcein accumulated after 60 minutes in the presence of verapamil. Each point represents the means \pm SD of three determinations made in triplicate.

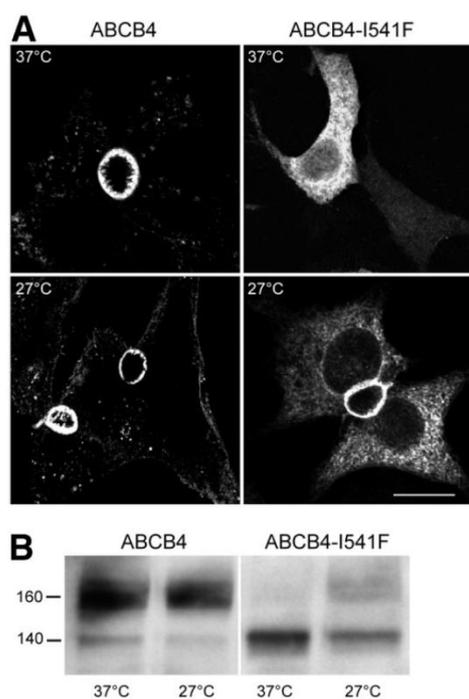


Fig. 7. ABCB4-I541F reaches the bile canalicular membrane at low temperature. HepG2 cells were transfected with either ABCB4 or ABCB4-I541F cDNA. After 48 hours, they were left at 37°C or shifted to 27°C for 17 hours, and then processed for immunofluorescence (A) or immunoblotting (B) using the P3II-26 monoclonal antibody. Apparent molecular masses are indicated in kDa. Bar, 10 μ m.

kDa and a minor band at 140 kDa, both at 37°C and 27°C (Fig. 7B). ABCB4-I541F migrated as a single 140-kDa polypeptide in cells grown at 37°C. After shifting the cells to 27°C, a significant proportion of the mutant was detected with an apparent molecular mass of approximately 160 kDa (Fig. 7B). These results show that, for ABCB1-I541F in MDCK cells, low temperature is effective on processing and bile canalicular delivery of the ABCB4 mutant in hepatic cells.

Discussion

We show that a mutation identified in a PFIC3 patient causes a maturation defect that can be rescued by low temperature. Our observations not only provide a rational explanation for linking the mutation to the disease but also bring perspectives to find novel therapies for the targeted treatment of PFIC3.

Homozygous I541F *ABCB4* mutation was described in a patient with PFIC3 who presented with persistent cholestasis from the age of 1 year and developed severe portal hypertension.⁴ In the patient's liver, immunohistochemistry did not show any canalicular staining for ABCB4.⁴ This suggested that in the liver *in vivo*, the mutant protein could not reach the canalicular membrane

because of a targeting defect or protein degradation. In both HepG2 and MDCK cells, we found that ABCB4-I541F accumulated intracellularly and was not detected at the canalicular membrane, as in the previously reported mutated patient. The site of accumulation was identified as the ER and cis-Golgi, in accordance with the endoH sensitivity of the mutant. It must be noted, however, that the mutant was partly endoH resistant. Whether this resistant form is at the plasma membrane or in a medium/distal Golgi compartment is difficult to assess. We cannot exclude that some molecules may be fully processed and reach the plasma membrane in overexpressing systems, such as transfected cell line models.

The location of the I541F mutation, in the first NBD domain, next to the LSSGQ signature, predicted that ATP-binding or hydrolysis could be affected. This is not apparently the case, because the primary defect was failure of the mutant to traffic properly to the apical plasma membrane. Dixon et al.²⁶ have shown that the A546D mutation described in a patient with intrahepatic cholestasis of pregnancy affected the traffic of an ABCB1 mutant to the plasma membrane, but not its activity. In the work of Dixon et al.,²⁶ ABCB1 was used as a model to reproduce the A546D ABCB4 mutation. Here, we also used ABCB1 and showed that the I541F mutation caused similar intracellular retention in both ABCB1 and ABCB4. ABCB1 represents an interesting model, especially when considering mutations in the NBD domains. These domains are highly conserved between ABCB1 and ABCB4 and have been shown to be interchangeable.²⁷ Furthermore, ABCB1 can be expressed as a GFP-fusion protein that retains drug-transporting activity. Because many ABCB4 missense mutations are found in the first NBD domain, ABCB1-GFP may be a good model to understand the effect of these mutations, to screen for means of rescuing the mutants, and to test whether they are active.

Many inherited diseases are known to arise because of point mutations within a gene that result in the production of proteins unable to assume a stable conformation within the cell.^{28,29} Mutations lead to non-native protein folding intermediates that are recognized by specialized chaperones and eventually targeted for destruction by the quality control machinery of the cell.³⁰ The fact that trafficking of I541F-mutant can be rescued by lowering the temperature suggests that this mutation causes a folding defect. One of the principles of protein folding is to ensure that hydrophobic residues are buried inside the folded molecule. In the case of I541F, both isoleucine and phenylalanine are hydrophobic amino acids, but isoleucine has a branched chain, whereas phenylalanine has a

bulky aromatic chain. This bulky chain may be difficult to hide inside the polypeptide. At reduced temperature, intermediate states would last longer, thus giving more chance to allow burying the bulky hydrophobic side chain of phenylalanine. Alternatively, quality control by chaperones may be less stringent at lower temperature, thus allowing the mutant to be released and to reach the plasma membrane. A positive effect of reduced temperature has already been reported in the case of other ABC-transporter mutations. At 30°C, canalicular expression and stability of the D482G-mutant bile salt export pump was improved in HepG2 cells.³¹ In 3T3 fibroblasts, the cystic fibrosis transmembrane regulator Δ F508-mutant partially matured after 2 days at 26°C.²⁵ However, rescue of trafficking mutants is interesting only if they are functional. Our observation that folding of ABCB1-I541F at 27°C allows translocation of calcein indicates that, despite the mutation, the NBD domain is able to adopt a native transport-competent conformation.

The only therapy for PFIC3 is UDCA treatment. Response to UDCA therapy is variable among PFIC3 patients.⁴ The patient harboring the I541F mutation was not improved by UDCA therapy and required liver transplantation. In accordance with the lack of effect *in vivo*, treatment of MDCK-I541 cells with UDCA had no effect on the localization of the mutant (our unpublished results). Conversely, our results bring new perspectives to develop alternative therapies. The observation that the I541F-mutant is transport-competent if it successfully transits to the plasma membrane raises the possibility that strategies to influence protein folding inside cells might prove to have therapeutic value. It would therefore be interesting to identify those mutations that affect folding of the NBD-domain but not binding and hydrolysis of ATP, and research into pharmaceutical agents designed to improve folding could prove beneficial. These data open perspectives to develop novel therapeutic tools for PFIC3.

Acknowledgment: The authors thank Philippe Fontanges and Romain Morichon for help with the confocal microscope (INSERM IFR65), and Marie-Claude Gendron for cell-sorting (Institut Jacques Monod). We also thank Julie Gabillet and Sarah Gora for help in the initial phase of this work.

References

- de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:282-287.
- Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis: genetic basis and treatment. *Clin Liver Dis* 2000;4:753-763.
- Oude Elferink RP, Paulusma CC, Groen AK. Hepatocanalicular transport defects: pathophysiologic mechanisms of rare diseases. *Gastroenterology* 2006;130:908-925.
- Jacquemin E, De Vree JM, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, et al. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* 2001;120:1448-1458.
- Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993;75:451-462.
- Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, Boute O, Hadchouel M. Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet* 1999;353:210-211.
- Jacquemin E. Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: one gene for three diseases. *Semin Liver Dis* 2001;21:551-562.
- Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 2001;120:1459-1467.
- Rosmorduc O, Hermelin B, Boelle PY, Parc R, Taboury J, Poupon R. ABCB4 gene mutation-associated cholelithiasis in adults. *Gastroenterology* 2003;125:452-459.
- Pauli-Magnus C, Lang T, Meier Y, Zodan-Marin T, Jung D, Breymann C, et al. Sequence analysis of bile salt export pump (ABCB11) and multidrug resistance p-glycoprotein 3 (ABCB4, MDR3) in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Pharmacogenetics* 2004;14:91-102.
- Lucena JF, Herrero JI, Quiroga J, Sangro B, Garcia-Foncillas J, Zabalegui N, et al. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2003;124:1037-1042.
- Lang C, Meier Y, Stieger B, Beuers U, Lang T, Kerb R, et al. Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenomics* 2007;17:47-60.
- Zioli M, Barbu V, Rosmorduc O, Frassati-Biaggi A, Barget N, Hermelin B, et al. ABCB4 heterozygous gene mutations associated with fibrosing cholestatic liver disease in adults. *Gastroenterology* 2008;135:131-141.
- Van der Blik AM, Baas F, Ten Houte de Lange T, Kooiman PM, Van der Velde-Koerts T, Borst P. The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J* 1987;6:3325-3331.
- Smit JJ, Schinkel AH, Mol CA, Majoor D, Mooi WJ, Jongsma AP, et al. Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab Invest* 1994;71:638-649.
- Degiorio D, Colombo C, Seia M, Porcaro L, Costantino L, Zazzeron L, et al. Molecular characterization and structural implications of 25 new ABCB4 mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3). *Eur J Hum Genet* 2007;15:1230-1238.
- Mbongo-Kama E, Harnois F, Mennecier D, Leclercq E, Burnat P, Ceppa F. MDR3 mutations associated with intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis: an update. *Ann Hepatol* 2007;6:143-149.
- Floreani A, Carderi I, Paternoster D, Soardo G, Azzaroli F, Esposito W, et al. Hepatobiliary phospholipid transporter ABCB4, MDR3 gene variants in a large cohort of Italian women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Dig Liver Dis* 2008;40:366-370.
- Morita SY, Kobayashi A, Takanezawa Y, Kioka N, Handa T, Arai H, et al. Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4. *HEPATOLOGY* 2007;46:188-199.
- Sai Y, Nies AT, Arias IM. Bile acid secretion and direct targeting of *mdr1*-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cells. *J Cell Sci* 1999;112:4535-4545.
- van Til NP, Heutinck KM, van der Rijt R, Paulusma CC, van Wijland M, Markusic DM, et al. Alteration of viral lipid composition by expression of the phospholipid floppase ABCB4 reduces HIV vector infectivity. *Retrovirology* 2008;5:14.

22. Bello V, Goding JW, Greengrass V, Sali A, Dubljevic V, Lenoir C, et al. Characterization of a di-leucine-based signal in the cytoplasmic tail of the nucleotide-pyrophosphatase NPP1 that mediates basolateral targeting but not endocytosis. *Mol Biol Cell* 2001;12:3004-3015.
23. Polli JW, Wring SA, Humphreys JE, Huang L, Morgan JB, Webster LO, et al. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;299:620-628.
24. Ait Slimane T, Trugnan G, Van IJzendoorn SC, Hoekstra D. Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell* 2003;14:611-624.
25. Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 1992;358:761-764.
26. Dixon PH, Weerasekera N, Linton KJ, Donaldson O, Chambers J, Egginton E, et al. Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet* 2000;9:1209-1217.
27. Buschman E, Gros P. Functional analysis of chimeric genes obtained by exchanging homologous domains of the mouse *mdr1* and *mdr2* genes. *Mol Cell Biol* 1991;11:595-603.
28. Ulloa-Aguirre A, Janovick JA, Brothers SP, Conn PM. Pharmacologic rescue of conformationally-defective proteins: implications for the treatment of human disease. *Traffic* 2004;5:821-837.
29. Welch WJ. Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding. *Semin Cell Dev Biol* 2004;15:31-38.
30. Anelli T, Sitia R. Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J* 2008;27:315-327.
31. Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, de Bruin J, Elling G, et al. A progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 mutation causes an unstable, temperature-sensitive bile salt export pump. *J Hepatol* 2004;40:24-30.

Effects of Cellular, Chemical, and Pharmacological Chaperones on the Rescue of a Trafficking-defective Mutant of the ATP-binding Cassette Transporter Proteins ABCB1/ABCB4*

Received for publication, June 24, 2011, and in revised form, December 16, 2011. Published, JBC Papers in Press, December 19, 2011, DOI 10.1074/jbc.M111.275438

Julien Gautherot^{†§}, Anne-Marie Durand-Schneider^{†§}, Danièle Delautier^{†§}, Jean-Louis Delaunay^{†§}, Alegna Rada^{†§}, Julie Gabillet^{†§}, Chantal Housset^{†§}, Michèle Maurice^{†§1}, and Tounsia Aït-Slimane^{†§}

From [†]INSERM and [§]UPMC Université Paris 06, UMR_S 938, Cdr Saint-Antoine, 75012 Paris, France

Background: Mutations of ABCB4, a transporter highly homologous to ABCB1, cause severe liver disease.

Results: The I541F mutation induces misfolding and intracellular retention that is rescued by the ABCB1-competitive substrate cyclosporin A but not by modulating the chaperones calnexin or Hsp/Hsc70.

Conclusion: Pharmacological chaperones are potential therapeutic tools for ABCB4 misfolded mutants.

Significance: This opens perspectives to treat ABCB4-linked genetic diseases.

The ATP-binding cassette transporter ABCB4 is a phosphatidylcholine translocator specifically expressed at the bile canalicular membrane in hepatocytes, highly homologous to the multidrug transporter ABCB1. Variations in the *ABCB4* gene sequence cause progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. We have shown previously that the I541F mutation, when reproduced either in ABCB1 or in ABCB4, led to retention in the endoplasmic reticulum (ER)/Golgi. Here, Madin-Darby canine kidney cells expressing ABCB1-GFP were used as a model to investigate this mutant. We show that ABCB1-I541F is not properly folded and is more susceptible to *in situ* protease degradation. It colocalizes and coprecipitates with the ER chaperone calnexin and coprecipitates with the cytosolic chaperone Hsc/Hsp70. Silencing of calnexin or overexpression of Hsp70 have no effect on maturation of the mutant. We also tested potential rescue by chemical and pharmacological chaperones. Thapsigargin and sodium 4-phenyl butyrate were inefficient. Glycerol improved maturation and exit of the mutant from the ER. Cyclosporin A, a competitive substrate for ABCB1, restored maturation, plasma membrane expression, and activity of ABCB1-I541F. Cyclosporin A also improved maturation of ABCB4-I541F in Madin-Darby canine kidney cells. In HepG₂ cells transfected with ABCB4-I541F cDNA, cyclosporin A allowed a significant amount of the mutant protein to reach the membrane of bile canaliculi. These results show that the best strategy to rescue conformation-defective ABCB4 mutants is provided by pharmacological chaperones that specifically target the protein. They identify cyclosporin A as a potential novel therapeutic tool for progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 patients.

Most proteins need to fold into a correct three-dimensional structure to be functional. Failure to fold into the native shape usually produces inactive proteins that are degraded. Folding of secretory and transmembrane proteins is assisted by specialized chaperones associated with the endoplasmic reticulum (ER)² (1, 2). The role of these chaperones is to prevent aggregation of not yet folded polypeptides and to exert quality control, thus ensuring that only correctly folded molecules are transported to their final destination (3, 4). Proteins unable to reach the native state are recognized as misfolded and targeted to the ER-associated degradation system (5, 6). In this case, they are transported back to the cytosol and eventually subjected to proteolysis.

Many inherited diseases are associated with defective protein folding (7). In most cases, the folding defect is caused by single point missense mutations that prevent the protein to reach its correct tertiary structure. Consequently, the defective protein is retained in the ER in interaction with cellular chaperones and is not transported to its final destination, which results in loss of function. However, the mutant protein might be fully functional if it could escape the quality control machinery. When processed at reduced temperature, several mutant proteins are able to reach a native conformation compatible with their exit from the ER and with their functionality (8–10). Therefore, a challenge is to find pharmacological means to rescue the proper targeting and functionality of misfolded proteins. The main strategies that are being developed are to modulate the activity of cellular chaperones involved in the folding and quality control of the protein of interest (11) or to use drugs that act as chemical or pharmacological chaperones (7, 12–15).

Multidrug-resistant proteins MDR1/ABCB1 and MDR3/ABCB4 are closely related ATP-binding cassette (ABC) transporters. They are composed of two moieties, each containing six membrane-spanning segments and a nucleotide-binding

* This work was supported by grants from the French National Society of Gastroenterology (SNFGE) and by Mucoviscidose ABCF2 Association. This work was also supported by fellowships from the Albi, Robert Debré, and Vaincre la Mucoviscidose associations (to J. G.).

¹ To whom correspondence should be addressed: UMR_S 938, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Site Saint-Antoine, 27 rue Chaligny, 75571 Paris Cedex 12, France. Tel.: 33-1-4001-1330; Fax: 33-1-4001-1352; E-mail: Michele.Maurice@inserm.fr.

² The abbreviations used are: ER, endoplasmic reticulum; ABC, ATP-binding cassette; CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator; endoH, endo- β -N-acetylglucosaminidase H; 4-PB, 4-phenylbutyrate.

domain. Although they share almost 80% identity at the amino acid level, their functions are quite distinct. ABCB1, the membrane drug transporter P-glycoprotein, is rather ubiquitous and extrudes a large variety of amphiphilic drugs. ABCB4 is mainly expressed at the bile canalicular membrane of hepatocytes, where it is specialized in biliary phosphatidylcholine excretion. Mutations in the *ABCB4* gene cause several biliary diseases, including progressive familial intrahepatic cholestasis type 3, a rare disease characterized by the early onset of persistent cholestasis that progresses toward cirrhosis and liver failure before adulthood (16). We have previously investigated effects of the I541F *ABCB4* mutation that has been identified in a progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 patient. The mutation is located in the first nucleotide-binding domain, which is highly homologous between ABCB1 and ABCB4. This mutation had similar effect when reproduced in either ABCB1 or ABCB4, leading to intracellular trafficking defect and ER/Golgi retention (10). Nevertheless, intracellular traffic was restored when cells were grown at 27 °C, and the rescued ABCB1-I541F mutant was functional. The aim of this work was to test other means to provide functional rescue for the I541F mutation. We have taken the ABCB1-I541F mutant as a model to explore different strategies. ABCB1-I541F has the advantage that it can be expressed at detectable level as a GFP fusion protein and ABCB1 activity is easy to measure. We have determined the effect of modulating two ER chaperones (calnexin and Hsp/Hsc70) expression and analyzed the potential effect of chemical and pharmacological chaperones that have proven effective in rescuing the traffic of other folding-defective mutant proteins. We found that cyclosporin A, an ABCB1 substrate, induced the best rescue of the ABCB1-I541F mutant and also provides rescue of the ABCB4-I541F mutant.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and Reagents—Rabbit polyclonal anti-calnexin and anti-Hsc70 antibodies were purchased from Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France). The mouse monoclonal anti-ABCB4 P3-II-26 antibody was from Alexis Biochemicals (San Diego, CA), the mouse monoclonal anti-Hsp70 from Abcam (Cambridge, UK), the mouse monoclonal anti-GFP from Roche (Meylan, France), the mouse monoclonal anti-GM130 from BD Biosciences France (Le Pont-de-Claix, France), and the goat polyclonal anti-actin from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Cy3-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (Montluçon, France); Alexa Fluor 488 secondary antibodies and culture media were from Invitrogen, and peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA). Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase H and peptide *N*-glycosidase F were from Roche. Calcein-AM was from Anaspec (San Jose, CA). Protein G-Sepharose and the ECL-Plus detection kit were from GE Healthcare (Orsay, France). Thapsigargin, thermolysin and kallikrein were from Sigma-Aldrich Chimie (Lyon, France). Sodium 4-phenylbutyrate was from Biovision (Clinisciences, Montrouge, France). Cyclosporin A and verapamil were from Calbiochem (Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK). The siRNA-calnexin duplex was obtained from Eurogentec (Liège, Belgium) and control siRNA from

Dharmacon Research (Lafayette, IL). The Hsp70 cDNA was a kind gift of L. R. Choo-Kang (Johns Hopkins University Medical School, Baltimore, MD).

Cell Culture, Transfection, and Drug Treatments—Madin-Darby canine kidney (MDCK) II cells and hepatocellular carcinoma, human HepG₂ cells were grown at 37 °C in Dulbecco's modified medium as reported (10). The generation of MDCK cells stably expressing GFP-ABCB1, GFP-ABCB1-I541F, ABCB4 and ABCB4-I541F has been previously described (10). Before the experiments, cells were treated overnight with 10 mM sodium butyrate to increase the cytomegalovirus promoter transcriptional activity. Transient transfections were performed in 6-well plates with 2 μ g of plasmid per well, using either the Nucleofector II system (Lonza, Levallois-Perret, France) or the Turbofect reagent (Fermentas France, Villebon-sur-Yvette). Stock solutions of drugs were made at 1000 \times concentration in dimethyl sulfoxide (thapsigargin), ethanol (cyclosporin A), or PBS (4-phenylbutyrate), and stored at -20 °C. Control cells were incubated with vehicle alone.

Isolation of Microsomes and Limited Proteolytic Digestion—MDCK cells (2.5×10^6) were grown in P150 Petri dishes for 6 days. Cells were washed twice with cold PBS, scraped with a rubber policeman, and suspended in HS medium (10 mM HEPES, 0.25 M sucrose (pH 7.4)). Microsomes were isolated by nitrogen cavitation as described (17). The suspension was equilibrated with nitrogen at 1000 psi in a high pressure chamber (Parr Instrument Company, Moline, IL) for 15 min at 4 °C. The cell suspension was rapidly expanded against atmospheric pressure and centrifuged at 3000 rpm for 10 min at 4 °C to remove cell debris and nuclei. The supernatant was then centrifuged at 24,200 rpm for 1 h at 4 °C in a SW41 swinging bucket rotor. Pellets were resuspended in HS. Isolated microsomes were incubated with kallikrein or thermolysin at the indicated concentrations for 30 min at 4 °C in digestion buffer (10 mM HEPES, 0.15 M NaCl (pH 7.4) with 4 mM CaCl₂ in the case of thermolysin). Samples were immediately denatured in 2 \times Laemmli sample buffer for 10 min at 50 °C and electrophoresed on 4–12% SDS-polyacrylamide gels. Immunoblotting was performed using the mouse anti-GFP monoclonal antibody.

RNA Interference—Twenty-one-nucleotide duplexes corresponding to calnexin coding nucleotides aatgttggtgctatgtga with symmetric thymidine overhangs were used (31). This sequence is entirely conserved in the human and canine genomes. MDCK cells were transfected with 100 nM siRNA duplex using the Turbofect transfection reagent. Cells were studied 72 h after transfection when silencing of calnexin was effective.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy—MDCK cells were grown either on coverslips or on Transwell polycarbonate filter units (Costar Corp., Cambridge, MA). Cells expressing ABCB1 were fixed with 4% paraformaldehyde and subsequently permeabilized with 0.075% saponin. Cells expressing ABCB4 were fixed with methanol/acetone (4:1, v/v) at -20 °C. Incubations with primary and secondary antibodies were performed as described (10). Confocal imaging was acquired with a Leica TCS SP2 laser scanning spectral system attached to a DMR inverted microscope with a 63/1.4 immersion objective.

Rescue of ABCB1/ABCB4 Mutant

Digital images were analyzed using the on-line ScanWare software and processed with Image J and Photoshop softwares.

Immunoprecipitation, Deglycosylation, and Western Blot—Cells were lysed on ice for 30 min in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1% digitonin, 10 mM iodoacetamide, 2 mM phenyl-methyl-sulfonylfluoride (pH 7.3) in the presence of a protease inhibitor mixture (Roche). Lysates were centrifuged at 12,000 × *g* for 10 min to remove insoluble materials. Protein content was determined by Uptima bicinchoninic acid protein assay from Pierce (Interchim, Montluçon, France). Immunoprecipitation was performed overnight with 1 mg of lysate protein and 2 μg of the monoclonal anti-GFP preadsorbed onto protein G-Sepharose beads for 4 h at 4 °C. Endoglycosidase digestions were performed for 1 h at 37 °C after lysing the cells in 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) (with 0.5% SDS in the case of Endo H) using 5 μU endo-β-*N*-acetylglucosaminidase H or 1 unit peptide *N*-glycosidase F. Samples were denatured in Laemmli sample buffer for 30 min at 37 °C and run on 6% SDS-polyacrylamide gels. Immunoblotting was performed using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Development of peroxidase activity was performed with the ECL Plus detection kit. Bands on gels were scanned and quantified using ImageJ software.

Calcein Assay—The procedure was essentially performed as described (18). Cells were seeded at 70,000 cells/well in 96-well plates with clear bottoms (Greiner Bio-One, Les Ulis, France). The medium was changed 24 h after seeding, and the assay was performed 48 h later. Monolayers were washed three times with Leibowitz's medium. Calcein-AM was added at a final concentration of 5 μM and 0.1% dimethyl sulfoxide in 100 μl Leibowitz's medium. Maximum calcein fluorescence was measured in cells treated with 50 μM verapamil that was added 10 min before and during the assay. Plates were incubated for 30 min at 37 °C, and fluorescence was measured in a Tecan SpectraFluor cytofluorimeter (MTX Lab Systems, Vienna, VA) at 485 nm excitation and 530 nm emission.

Statistics—Student's *t* test was used for statistical comparisons.

RESULTS

The I541F Mutant Is More Susceptible to Protease Degradation—We previously showed that the I541F mutant was retained in the ER and that retention could be rescued by low temperature, suggesting that the mutant had a folding defect (10). Improperly folded molecules are often more sensitive to protease degradation. We therefore studied whether the ABCB1-I541F was more susceptible to *in situ* proteolysis, using isolated microsomes from MDCK cells stably transfected with either GFP-ABCB1-WT or GFP-ABCB1-I541F. The protocol was established previously for the ΔF508 cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) mutant (17). Digestion with thermolysin or kallikrein revealed that compared with the wild-type protein, the mutant was sensitive to lower enzyme concentrations (Fig. 1). The majority of generated fragments were identical except for the largest peptides, which were underrepresented after digestion of the mutant. Because GFP is located at the C terminus of ABCB1, this finding suggested that the N-ter-

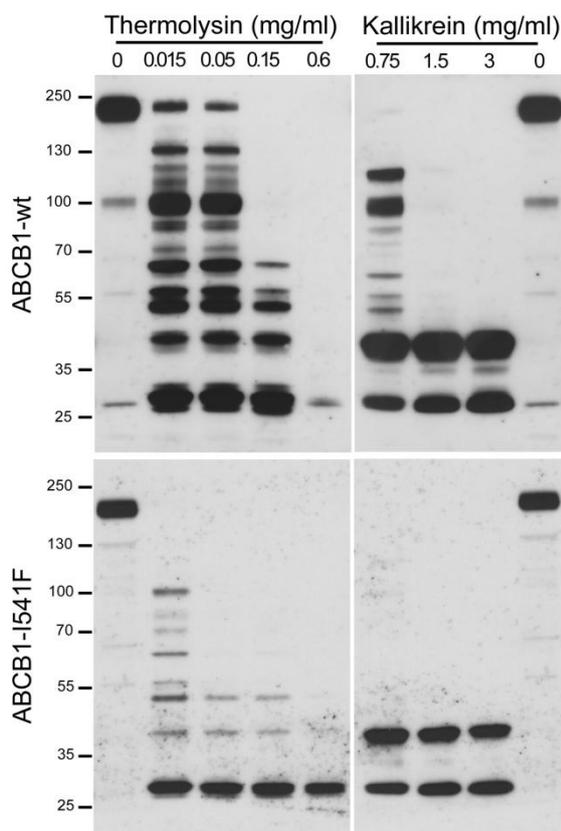


FIGURE 1. *In situ* protease susceptibility of ABCB1-WT and ABCB1-I541F. Microsomes obtained from MDCK cells expressing GFP-tagged ABCB1-WT or ABCB1-I541F were submitted to limited proteolysis at the indicated concentrations of thermolysin or kallikrein for 30 min at 4 °C. Samples (ABCB1, 30 μg and ABCB1-I541F, 50 μg protein per lane) were immunoblotted with the anti-GFP monoclonal antibody. Molecular mass standards are indicated in kDa.

minal moiety of the mutant was more sensitive to proteolysis. The fragment migrating at ~27 kDa, which appears to be rather resistant to both enzymes, presumably corresponds to GFP. An ~40-kDa fragment was resistant to kallikrein both in ABCB1 and ABCB1-I541F, again indicating that the C terminus of the molecule was less affected by the mutation. These proteolysis experiments provided evidence for a conformational defect of the I541F mutant.

The I541F Mutant Colocalizes and Coprecipitates with Calnexin—Calnexin is a chaperone of the ER that is involved in the folding of ABCB1 (19). To study whether the mutant interacts with calnexin, we performed colocalization and coimmunoprecipitation experiments using MDCK cells stably transfected with ABCB1-WT or ABCB1-I541F. By immunofluorescence, ABCB1-WT was detected at the cell surface, with only little colocalization with calnexin (Fig. 2A). By contrast, the ABCB1-I541F mutant colocalized strongly with calnexin, which appeared to be relocalized near the nucleus, together with the mutant (Fig. 2A). The change in calnexin pattern was probably due to accumulation of the mutant at

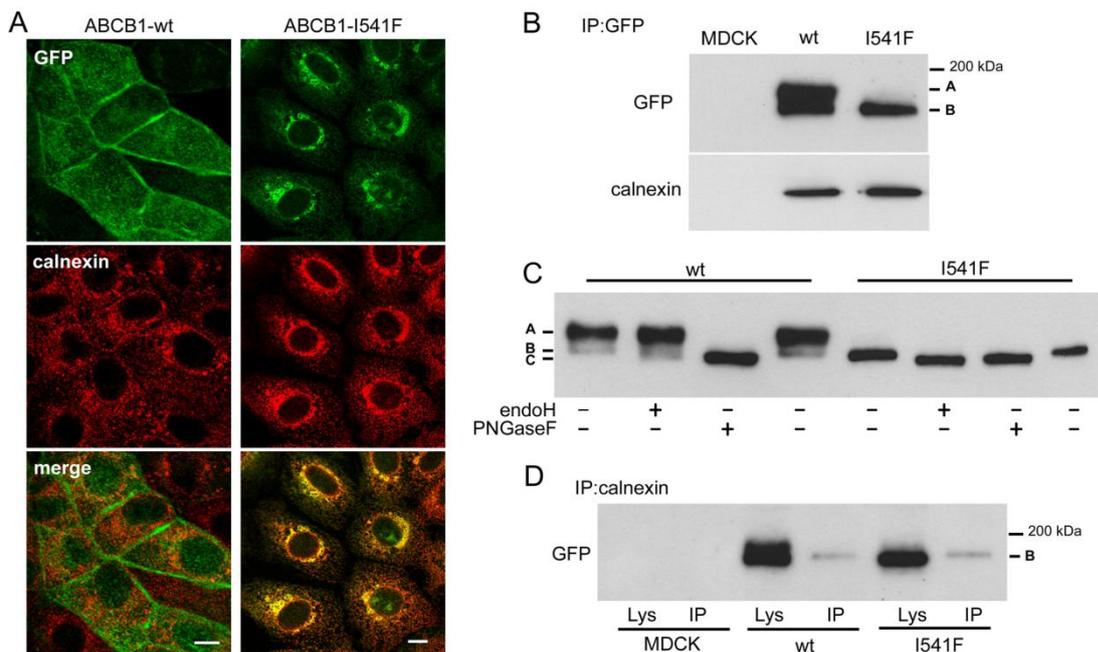


FIGURE 2. ABCB1-I541F colocalizes and coprecipitates with calnexin. *A*, MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-WT or ABCB1-I541F were fixed, and immunolocalization of calnexin was performed using a Cy3-conjugated secondary antibody. Confocal images show strong colocalization of the mutant with calnexin. Note that the staining pattern of calnexin in ABCB1-I541F cells is different from that in ABCB1-WT cells because of ER accumulation of the mutant. Scale bars = 10 μ m. *B*, MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-WT or ABCB1-I541F and control MDCK cells were lysed, and immunoprecipitation (IP) was performed with the anti-GFP antibody. Samples were analyzed by immunoblotting using anti-GFP or anti-calnexin monoclonal antibodies. *C*, cell lysates were subjected to endoH or peptide *N*-glycosidase F digestion and processed for immunoblotting using the anti-GFP antibody. The mature (A), immature (B) and deglycosylated (C) forms are indicated. *D*, MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-WT or ABCB1-I541F and control MDCK cells were lysed, and immunoprecipitation was performed with the anti-calnexin antibody. Samples were analyzed by immunoblotting using the anti-GFP antibody. Lys, whole cell lysates.

specific sites of the ER. Immunoprecipitation experiments showed that calnexin coimmunoprecipitated with both ABCB1-WT and ABCB1-I541F (Fig. 2*B*). ABCB1 migrated as two bands of ~190 kDa and 175 kDa (bands A and B), whereas ABCB1-I541F presented only the 175-kDa band. Enzymatic deglycosylation of the samples by endoH or peptide *N*-glycosidase F showed that band A was not sensitive to endoH and thus corresponded to the mature glycosylated form, whereas band B, which was endoH-sensitive, corresponded to the immature high-mannose form (Fig. 2*C*). Immunoprecipitation of calnexin also pulled down ABCB1-WT and ABCB1-I541F. However, in this case, only band B, corresponding to the high mannose-form, was detected (Fig. 2*D*).

Effect of Calnexin Down-expression—Interaction between ABCB1-I541F and calnexin suggested that the chaperone might retain the I541F mutant in the ER. To test this hypothesis, we studied the fate of the mutant under calnexin depletion. Transfection of the cells with calnexin siRNA for 72 h allowed to substantially decrease the amount of calnexin (Fig. 3). This treatment, to a certain extent, increased the relative amount of immature ABCB1-WT, suggesting that calnexin is necessary for the processing of ABCB1-WT. However, it had little or no effect on the expression of ABCB1-I541F (Fig. 3) and did not induce the appearance of the mature form, which would have indicated a rescue effect.

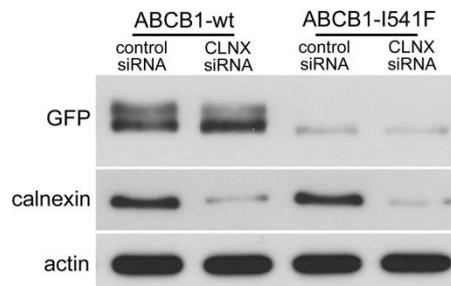


FIGURE 3. Effect of calnexin silencing on ABCB1-I541F expression. MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-WT or ABCB1-I541F were transfected with control or calnexin (CLNX) siRNA. After 72 h, cells were lysed, and samples were analyzed by immunoblotting using anti-GFP or anti-calnexin antibodies. Actin was taken as an internal standard. Shown is one representative of three experiments.

The I541F Mutant Coprecipitation with Hsc70 and Effect of Hsp70 Overexpression—The cognate Hsp70 family member Hsc70 is another ubiquitous chaperone that is involved in ABCB1 folding (20). We therefore tested whether the mutant was associated with Hsc70. By immunofluorescence, colocalization was very limited and restricted to discrete regions of the ER (Fig. 4*A*). However, Hsc70 coprecipitated significantly with the mutant ABCB1-I541F, and in higher amounts than with

Rescue of ABCB1/ABCB4 Mutant

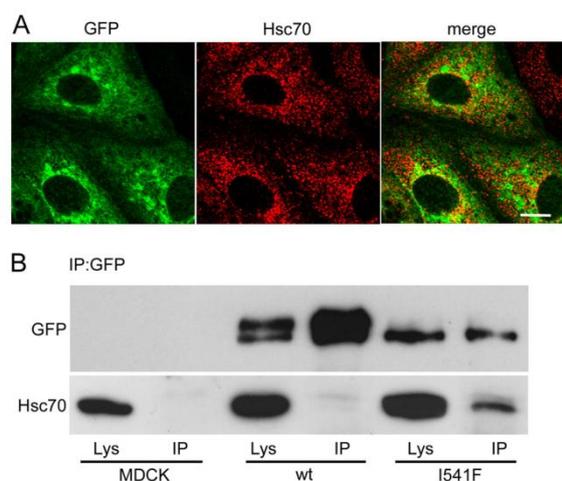


FIGURE 4. ABCB1-I541F coprecipitates with Hsc70. A, MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-I541F were fixed, and Hsc70 was detected by immunofluorescence using a Cy3-conjugated secondary antibody. Images were obtained by confocal microscopy. Scale bar = 10 μ m. B, MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-WT or ABCB1-I541F and control MDCK cells were lysed, and immunoprecipitation (IP) was performed using the monoclonal anti-GFP antibody. Samples were analyzed by immunoblotting using anti-GFP or anti-Hsc70 monoclonal antibodies. Shown is one representative of three experiments. Lys, whole cell lysates.

ABCB1-WT, indicating that this chaperone interacts preferentially with the mutant (Fig. 4B).

One of the functions of Hsc70 is to prevent aggregation of hydrophobic residues in the cytoplasm and to create best conditions for protein folding. Therefore, one can expect that increasing the amount of this chaperone might rescue folding, at least partially. Hsc70 is constitutively expressed, but its homolog Hsp70 can be induced in several stress conditions, especially by heat shock treatment (21). The cells were exposed for 2 h at the temperature of 42 °C and allowed to recover for 24 h at 37 °C. This treatment increased Hsp70 expression by ~2-fold (Fig. 5A). However, expression and maturation of the mutant did not change. We also increased Hsp70 expression by transient transfection of the cells with a cDNA encoding Hsp70. Hsp70 expression was increased at least 3-fold 2 days after transfection (Fig. 5B). In these conditions, the expression of ABCB1-I541F was notably increased but remained immature, indicating that it did not exit the ER (Fig. 5B).

Effect of Chemical Chaperones on ABCB1-I541F Expression—Different compounds referred to as chemical chaperones have been shown to rescue folding of mutant proteins. Among them glycerol, thapsigargin, and sodium 4-phenyl-butyrate (4-PB) were able to rescue cell surface expression of several membrane proteins, including the Δ F508 CFTR mutant (22, 23), the bile salt export pump (24), the K^+ channel (25), the low-density lipoprotein receptor (26), and the bone morphogenic receptor (27). ABCB1-I541F expressing cells were treated with thapsigargin or 4-PB at concentrations up to 100 μ M for 24 h. The Western blot analysis pattern of ABCB1-I541F did not change in treated cells (Fig. 6A). Increasing the time of treatment did not allow the mutant to mature (not shown). Accordingly, the mutant was still located intracellularly (Fig.

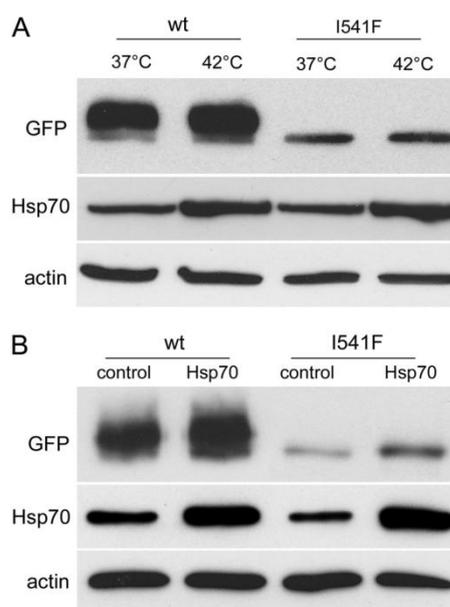


FIGURE 5. Effect of Hsp70 overexpression on ABCB1-I541F expression. A, MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-WT or ABCB1-I541F were maintained at 37 °C or exposed at 42 °C for 2 h and then returned to 37 °C for 24 h. Cells were lysed, and samples were analyzed by immunoblotting using anti-GFP and anti-Hsp70 antibodies. Shown is one representative of three experiments. B, MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-WT or ABCB1-I541F were transfected with the plasmid encoding Hsp70. After 48 h, cells were analyzed by immunoblotting using anti-GFP and anti-Hsp70 antibodies. Actin was taken as an internal standard. Shown is one representative of four experiments.

6B). On the other hand, treatment with 7.5% glycerol increased the mature form of ABCB1-I541F on Western blot analyses (Fig. 6C). Increasing the concentration to 10% was toxic to the cells. Morphological studies showed that maturation was accompanied by some labeling of the apical cell surface (Fig. 6D). However, the mutant was still largely intracellular. Colocalization with cytoplasmic markers showed that after treatment with glycerol, the mutant best colocalized with GM130, a medial Golgi marker (Fig. 6E). This observation indicates that glycerol allows the mutant to exit the ER and improves its appearance at the cell surface, although its traffic may be slow.

ABCB1-I541F Is Functionally Rescued by Cyclosporin A—Cyclosporin A is an immunosuppressant known to be a substrate for and a competitive inhibitor of ABCB1 (28). It has been shown that several ABCB1 mutants could be rescued by treatment with cyclosporin A (29). We therefore tested the effect of cyclosporin A on the I541F mutant at concentrations ranging from 0.1 to 10 μ M. Cyclosporin A given for 24 h caused a dose-dependent increase in the mature form of ABCB1-I541F (Fig. 7A and B). On the other hand, cyclosporin A had no significant effect on ABCB1-WT (Fig. 7, A and B). Study of the localization of the rescued mutant by confocal microscopy showed that after cyclosporin A treatment, the I541F mutant was expressed at the apical membrane like the wild-type protein (Fig. 7C).

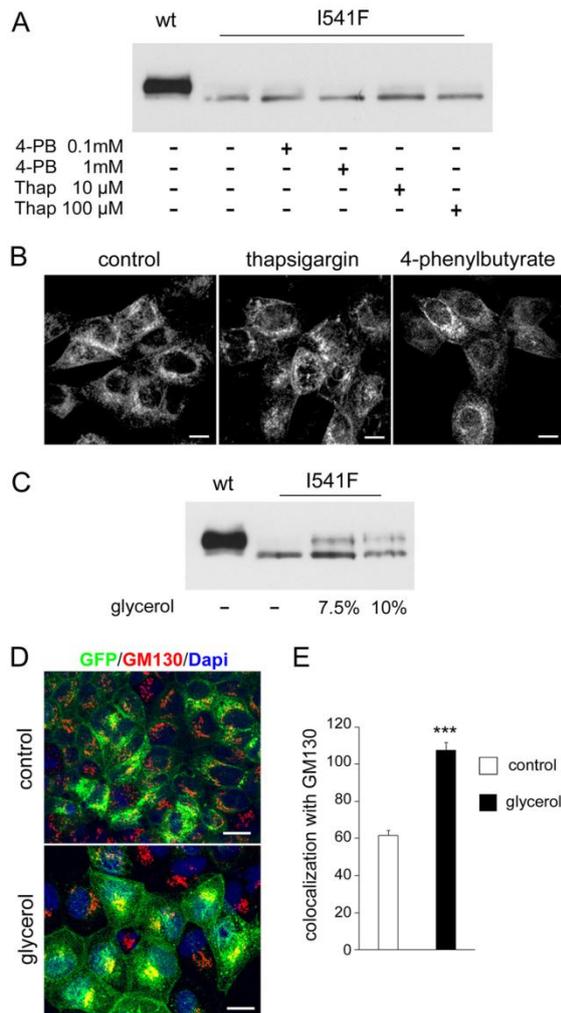


FIGURE 6. Effect of chemical chaperones on the expression pattern of ABCB1-I541F. *A*, MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-WT or ABCB1-I541F were treated with vehicle (-), 4-PB, or thapsigargin (*Thap*) at the indicated concentrations for 24 h. Immunoblotting was performed with anti-GFP. *B*, filter-grown MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-I541F were treated with vehicle (*control*), 100 μ M thapsigargin, or 1 mM 4-phenylbutyrate for 24 h. Cells were fixed, and GFP fluorescence was analyzed by confocal microscopy. Scale bars = 10 μ m. *C*, the same experiment as in *A*, except that cells were treated with 7.5% or 10% glycerol (w/v). *D*, MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-I541F were treated with 7.5% glycerol for 24 h. Cells were fixed and stained with the anti-GM130 antibody and a Cy3-conjugated secondary antibody. Nuclei were stained with DAPI. Images were obtained by confocal microscopy. Scale bar = 10 μ m. *E*, the colocalization of GFP-tagged ABCB1-I541F with GM130 was quantified using the ImageJ 1.41 measure colocalization function on multiple confocal sections of at least 30 cells in three independent experiments. Open bar, control cells; black bar, glycerol-treated cells. Data (arbitrary units) are expressed as mean \pm S.E. ***, $p < 0.001$.

To check whether the rescued mutant was functional, we used the calcein assay, which measures the capacity of cells to extrude calcein, a substrate for ABCB1. Calcein readily enters the cells and is converted to a fluorescent molecule in the cyto-

plasm. Accumulation of fluorescent calcein was measured in the presence or absence of the ABCB1 inhibitor verapamil in cells treated with different concentrations of cyclosporin A for 24 h. Extruded calcein was calculated as the difference between accumulated calcein in the presence and absence of verapamil. The assay could not be performed on cells treated with 5 or 10 μ M of cyclosporin A because the combination of cyclosporin A at these concentrations with verapamil was toxic to the cells (data not shown). Fig. 7D shows that ABCB1-I541F MDCK cells treated with cyclosporin A extruded more fluorescent calcein than control cells in a dose-dependent manner. The difference was significant at the dose of 2 μ M. These results show that the mutant rescued by cyclosporin was functional.

ABCB4-I541F Is Also Rescued by Cyclosporin A—Because cyclosporin A was very efficient at rescuing ABCB1-I541F, we also tested its potential effect on ABCB4-I541F. ABCB4-I541F was expressed at a low level in stably transfected MDCK cells and was not reproducibly detected by Western blotting. We therefore studied the effect of cyclosporin A in MDCK cells transiently transfected with the ABCB4-I541F plasmid. Six hours after transfection, the cells were treated with cyclosporin A, and the maturation of the mutant was examined 24 or 48 h later by immunoblotting. As shown previously (10), ABCB4-WT migrated as two bands corresponding to the immature and mature forms, whereas ABCB4 migrated essentially as the immature form (Fig. 8). A substantial amount of matured ABCB4-I541F was detected in cells treated with cyclosporin A at a concentration of 2 μ M (Fig. 8, *A* and *B*). Increasing the concentration of cyclosporin above 2 μ M did not increase the amount of the matured form. To confirm that a similar rescue would also occur in hepatic cells, HepG₂ cells were transfected with the ABCB4-I541F plasmid. Forty-eight hours later, cells were treated with 5 μ M cyclosporin A. After 18 h of treatment, cells were fixed and processed for immunofluorescence. These cells are able to polarize and form bile canaliculi-like structures. In control cells, ABCB4-I541F was detected exclusively in the cytoplasm and was not detected at the membrane of bile canaliculi. After treatment with 5 μ M cyclosporin A, the mutant was clearly detected at the membrane of bile canaliculi (Fig. 8C).

DISCUSSION

Single point mutations often produce molecules that are unable to fold correctly. These unfolded molecules may expose proteolytic cleavage sites and may be more susceptible to degradation. We found that the ABCB1-I541F mutant was more susceptible to the *in situ* action of proteolytic enzymes, especially in the first moiety of the molecule, where the mutation is located. This supported the assumption of a conformational defect that prevents the molecule to fold properly, and that makes it more sensitive to proteolysis. In keeping with this conclusion, it was shown previously that ABCB4 was undetectable by immunohistochemistry in the liver tissue from a patient bearing the ABCB4-I541F mutation (16). This suggests that in the liver *in vivo*, the improperly folded mutant protein is rapidly degraded.

Several strategies have been proposed to rescue the traffic of misfolded mutant proteins. A first approach is to manipulate

Rescue of ABCB1/ABCB4 Mutant

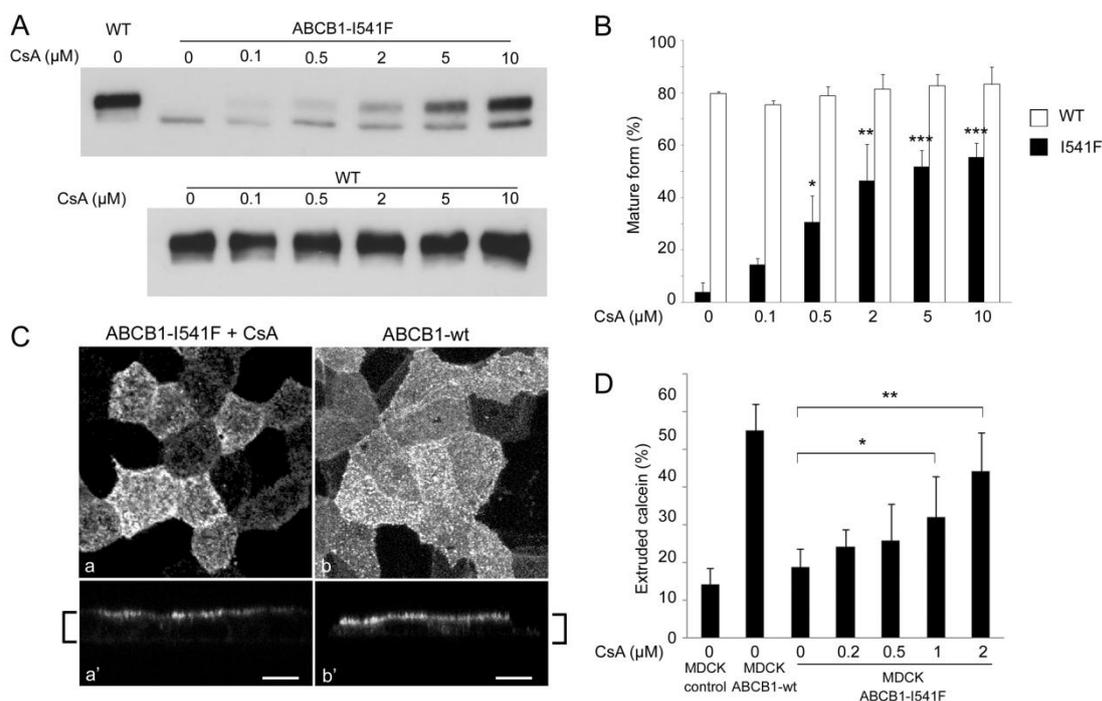


FIGURE 7. Cyclosporin A rescues ABCB1-I541F. MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-WT or ABCB1-I541F were treated with vehicle or cyclosporin A (CsA) at the indicated concentrations for 24 h. *A*, homogenates were analyzed by immunoblotting using the anti-GFP monoclonal antibody. *B*, quantification of experiments shown in *A*. The mature and immature bands were separately quantified on gels, and the relative amount of the mature form for each condition was calculated (mean \pm S.D. of three experiments). *C*, confocal microscopy of MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-I541F and treated with 10 μ M cyclosporin A (*a* and *a'*) and MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-WT (*b* and *b'*). *a* and *b* are xy projections. *xz* sections (*a'* and *b'*) show exclusive apical staining. Brackets indicate the height of the monolayer. Scale bars = 10 μ m. *D*, control MDCK cells and MDCK cells stably transfected with GFP-tagged ABCB1-wt, or ABCB1-I541F were grown at 37 °C in 96-wells plates for 3 days. The cells were treated with the indicated concentrations of cyclosporin A 24 h before the calcein assay was performed. Results are expressed as the percentage of fluorescent calcein extruded after 60 min (mean \pm S.D. of four determinations performed in triplicate). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

endogenous cellular chaperones with the aim to facilitate the escape of mutant proteins from the quality control system and/or promote their folding. The cellular chaperone calnexin is one of the chaperones involved in quality control of the ER. Previous studies have shown that a number of mutant proteins exhibit prolonged interaction with calnexin (30, 31), including ABCB1 mutants (19). It has been suggested that calnexin binds the misfolded polypeptide and prevents its degradation (31). However, Okiyoneda *et al.* (32) found that the retention of Δ F508-CFTR in the ER was not rescued in calnexin KO cells. Similarly, we did not observe that calnexin silencing induced significant change in the expression of the ABCB1-I541F mutant and that it did not rescue ER retention. The inducible chaperone Hsp70 is another chaperone that has been targeted to improve the folding of mutant proteins. Induction of Hsp70 has been shown to promote Δ F508-CFTR maturation and its trafficking to the plasma membrane (33) and to rescue expression and function of a mutant cystathionine β -synthase (34). We found an increase in the ABCB1-I541F mutant when Hsp70 was overexpressed by transfection of the Hsp70 cDNA but not after heat shock treatment. The difference may be explained by the fact that transfection induced higher overexpression than

heat shock. In both cases, no maturation of the mutant was observed.

A second approach to rescue the traffic of misfolded mutant proteins is to use chemical chaperones. Many of the chemical compounds that have been proposed are on the basis of the observation that function of the ER is intrinsically dependent on calcium concentrations. Thus, maintaining low calcium levels in the ER using the calcium pump inhibitor thapsigargin or other chemicals allows to correct abnormal protein trafficking of Δ F508 CFTR (23, 35) of certain mutants of the V2 vasopressin receptor (36) or of LQT2 channels (25). Another agent, 4-PB, is also able to functionally rescue a number of traffic-defective mutant membrane proteins, including Δ F508 CFTR (22, 33), mutants of the bone morphogenic protein receptor (27), of the epithelial sodium channel (37), the low-density lipoprotein receptor (26), ATP8B1 (38), and the ABC transporter ABCB11 responsible for biliary secretion of bile salts (24). The mechanism of 4-PB rescue is not yet well understood, but one of its effects is to reduce the expression of Hsc70 and increase Hsp70 (22, 39). Another class of chemical chaperones is represented by small osmolytes such as glycerol and organic solute that non-selectively stabilize mutant proteins and facilitate

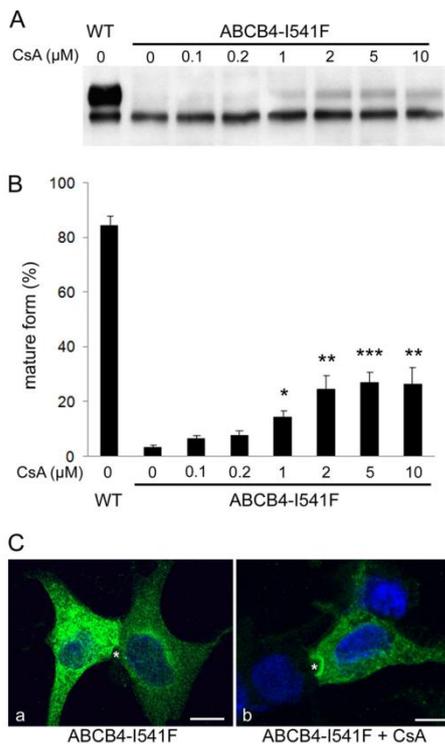


FIGURE 8. Cyclosporin A rescues ABCB4-I541F. *A*, MDCK cells were transfected with plasmids encoding ABCB4-WT or ABCB4-I541F. Six hours later, cyclosporin A (CsA) was added at the indicated concentrations. After 24 h, cells were lysed, and samples (40 μ g protein) were analyzed by immunoblotting with an anti-ABCB4 antibody. *B*, quantification of experiments shown in *A*. The mature and immature bands were separately quantified on gels, and the relative amount of the mature form for each condition was calculated (mean \pm S.D. of three experiments). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. *C*, HepG₂ cells transfected with the pCDNA3-ABCB4 plasmid were fixed, and ABCB4 was detected by immunofluorescence using an Alexa Fluor 488 secondary antibody. *a*, control cells; *b*, cells treated with 5 μ M cyclosporin A for 18 h. Images are projections of focal sections obtained by confocal microscopy. Nuclei were stained with DAPI. The asterisks indicate the location of bile canaliculi. Scale bars = 10 μ m.

their folding (40, 41). In our system, treatment with thapsigargin and 4-PB had no effect on the I541F mutant. Only glycerol did improve the maturation of the ABCB1-I541F mutant, which was able to exit the ER. However, the rescue was only partial, and the mutant remained still largely intracellular, although in a more distal compartment. It must be noted that the efficiency of chemical chaperones is very variable and appears to depend on each specific mutation. For instance, only six of 16 nephrin mutants were located at the cell surface after treatment with 4-PB (42). In the case of the vasopressin V2 receptor, only one of nine mutations showed improved maturation and plasma membrane rescue with glycerol and thapsigargin (36).

Finally, rescue of the I541F mutant was obtained with a specific substrate. Although chemical chaperones are not specific, pharmacological chaperones target one specific protein with which they interact. Loo and Clarke (43) showed that artificial mutations of ABCB1 that led to ER retention were corrected by

a large variety of ABCB1 substrates. A similar strategy has been applied to improve folding and traffic of mutant membrane proteins responsible for genetic diseases using competitive inhibitors (44), antagonists (45, 46), or ligands (47). Here, we found that the ABCB1 inhibitor cyclosporin A was remarkably effective at restoring the traffic of ABCB1 bearing the I541F mutation. Cyclosporin A also rescued the ABCB4 mutant, albeit with somewhat less efficiency. This difference may reflect less affinity of ABCB4 than ABCB1 for cyclosporin A. The pharmacological chaperone may facilitate folding by constraining the protein to adopt a certain conformation (48). Therefore, efficient interaction between the chaperone and the protein being folded appears to be critical for rescue. The effect of cyclosporin A on ABCB4 maturation was moderate in MDCK cells, but a substantial amount of the mutant protein was detected at the surface of bile canaliculi in HepG₂ cells. We could not verify that the rescued mutant was functional in HepG₂ cells. However, the fact that the ABCB1 mutant was able to extrude calcein after cyclosporin A treatment suggests that rescued ABCB4-I541F may be functional as well. Although membrane expression of the ABCB4 mutant was not complete in our experimental conditions of cyclosporin A treatment, partial rescue in patients may be sufficient to avoid or at least postpone liver transplantation. These results open perspectives to treat PFIC3 by pharmacological means.

Acknowledgments—We acknowledge Philippe Fontanges and Romain Morichon (IUPMC Université Paris 06, IFR65) for confocal microscopy imaging.

REFERENCES

- Hebert, D. N., and Molinari, M. (2007) In and out of the ER. Protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol. Rev.* **87**, 1377–1408
- Määttänen, P., Gehring, K., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (2010) Protein quality control in the ER. The recognition of misfolded proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 500–511
- Kleizen, B., and Braakman, I. (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 343–349
- Anelli, T., and Sitia, R. (2008) Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J.* **27**, 315–327
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005) ERAD. The long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* **7**, 766–772
- Vembar, S. S., and Brodsky, J. L. (2008) One step at a time. Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 944–957
- Welch, W. J. (2004) Role of quality control pathways in human diseases involving protein misfolding. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 31–38
- Denning, G. M., Anderson, M. P., Amara, J. F., Marshall, J., Smith, A. E., and Welsh, M. J. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**, 761–764
- Plass, J. R., Mol, O., Heegsma, J., Geuken, M., de Bruin, J., Elling, G., Müller, M., Faber, K. N., and Jansen, P. L. (2004) A progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 mutation causes an unstable, temperature-sensitive bile salt export pump. *J. Hepatol.* **40**, 24–30
- Delaunay, J. L., Durand-Schneider, A. M., Delautier, D., Rada, A., Gautherot, J., Jacquemin, E., Aït-Slimane, T., and Maurice, M. (2009) A missense mutation in ABCB4 gene involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 leads to a folding defect that can be rescued by low temperature. *Hepatology* **49**, 1218–1227
- Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D. M., Koulov, A. V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H., Riordan, J. R., Kelly,

Rescue of ABCB1/ABCB4 Mutant

- J. W., Yates, J. R., 3rd, and Balch, W. E. (2006) Hsp90 cochaperone Ah1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell* **127**, 803–815
12. Morello, J. P., Petäjä-Repo, U. E., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 466–469
13. Ulloa-Aguirre, A., Janovick, J. A., Brothers, S. P., and Conn, P. M. (2004) Pharmacologic rescue of conformationally defective proteins. Implications for the treatment of human disease. *Traffic* **5**, 821–837
14. Bernier, V., Lagacé, M., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2004) Pharmacological chaperones. Potential treatment for conformational diseases. *Trends Endocrinol. Metab.* **15**, 222–228
15. Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., and Balch, W. E. (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 959–991
16. Jacquemin, E., De Vree, J. M., Cresteil, D., Sokal, E. M., Sturm, E., Dumont, M., Scheffer, G. L., Paul, M., Burdelski, M., Bosma, P. J., Bernard, O., Hadchouel, M., Elferink, R. P. (2001) The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* **120**, 1448–1458
17. Zhang, F., Kartner, N., and Lukacs, G. L. (1998) Limited proteolysis as a probe for arrested conformational maturation of delta F508 CFTR. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 180–183
18. Polli, J. W., Wring, S. A., Humphreys, J. E., Huang, L., Morgan, J. B., Webster, L. O., and Serabjit-Singh, C. S. (2001) Rational use of *in vitro* P-glycoprotein assays in drug discovery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 620–628
19. Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1994) Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis. *J. Biol. Chem.* **269**, 28683–28689
20. Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1995) P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones. *J. Biol. Chem.* **270**, 21839–21844
21. Hartl, F. U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571–579
22. Rubenstein, R. C., Egan, M. E., and Zeitlin, P. L. (1997) *In vitro* pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing Δ F508-CFTR. *J. Clin. Invest.* **100**, 2457–2465
23. Egan, M. E., Glöckner-Pagel, J., Ambrose, C., Cahill, P. A., Pappoe, L., Balamuth, N., Cho, E., Canny, S., Wagner, C. A., Geibel, J., and Caplan, M. J. (2002) Calcium pump inhibitors induce functional surface expression of Δ F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat. Med.* **8**, 485–492
24. Hayashi, H., and Sugiyama, Y. (2007) 4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps. *Hepatology* **45**, 1506–1516
25. Delisle, B. P., Anderson, C. L., Balijepalli, R. C., Anson, B. D., Kamp, T. J., and January, C. T. (2003) Thapsigargin selectively rescues the trafficking defective LQT2 channels G601S and F805C. *J. Biol. Chem.* **278**, 35749–35754
26. Tveten, K., Holla, Ø. L., Ranheim, T., Berge, K. E., Leren, T. P., and Kulseth, M. A. (2007) 4-Phenylbutyrate restores the functionality of a misfolded mutant low-density lipoprotein receptor. *FEBS J.* **274**, 1881–1893
27. Sobolewski, A., Rudarakanchana, N., Upton, P. D., Yang, J., Crilley, T. K., Trembath, R. C., and Morrell, N. W. (2008) Failure of bone morphogenetic protein receptor trafficking in pulmonary arterial hypertension. Potential for rescue. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 3180–3190
28. Tamai, I., and Safa, A. R. (1990) Competitive interaction of cyclosporins with the Vinca alkaloid-binding site of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 16509–16513
29. Loo, T. W., Bartlett, M. C., and Clarke, D. M. (2004) Thapsigargin or curcumin does not promote maturation of processing mutants of the ABC transporters, CFTR, and P-glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 580–585
30. Morello, J. P., Salahpour, A., Petäjä-Repo, U. E., Laperrière, A., Lonergan, M., Arthus, M. F., Nabi, I. R., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2001) Association of calnexin with wild-type and mutant AVPR2 that causes nephrogenic diabetes insipidus. *Biochemistry* **40**, 6766–6775
31. Swanton, E., High, S., and Woodman, P. (2003) Role of calnexin in the glycan-independent quality control of proteolipid protein. *EMBO J.* **22**, 2948–2958
32. Okiyoneda, T., Niibori, A., Harada, K., Kohno, T., Michalak, M., Duszyk, M., Wada, I., Ikawa, M., Shuto, T., Suico, M. A., and Kai, H. (2008) Role of calnexin in the ER quality control and productive folding of CFTR. Differential effect of calnexin knockout on wild-type and Δ F508 CFTR. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 1585–1594
33. Choo-Kang, L. R., and Zeitlin, P. L. (2001) Induction of HSP70 promotes Δ F508 CFTR trafficking. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **281**, L58–68
34. Singh, L. R., and Kruger, W. D. (2009) Functional rescue of mutant human cystathionine β -synthase by manipulation of Hsp26 and Hsp70 levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **284**, 4238–4245
35. Norez, C., Antigny, F., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2006) Maintaining low Ca^{2+} level in the endoplasmic reticulum restores abnormal endogenous F508del-CFTR trafficking in airway epithelial cells. *Traffic* **7**, 562–573
36. Robben, J. H., Sze, M., Knoers, N. V., and Deen, P. M. (2006) Rescue of vasopressin V2 receptor mutants by chemical chaperones. Specificity and mechanism. *Mol. Biol. Cell* **17**, 379–386
37. Prulière-Escabasse, V., Planès, C., Escudier, E., Fanen, P., Coste, A., and Clerici, C. (2007) Modulation of epithelial sodium channel trafficking and function by sodium 4-phenylbutyrate in human nasal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 34048–34057
38. van der Velden, L. M., Stapelbroek, J. M., Krieger, E., van den Berghe, P. V., Berger, R., Verhulst, P. M., Holthuis, J. C., Houwen, R. H., Klomp, L. W., and van de Graaf, S. F. (2010) Folding defects in P-type ATP 8B1 associated with hereditary cholestasis are ameliorated by 4-phenylbutyrate. *Hepatology* **51**, 286–296
39. Rubenstein, R. C., and Zeitlin, P. L. (2000) Sodium 4-phenylbutyrate down-regulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of Δ F508-CFTR. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**, C259–267
40. Zhang, X. M., Wang, X. T., Yue, H., Leung, S. W., Thibodeau, P. H., Thomas, P. J., and Guggino, S. E. (2003) Organic solutes rescue the functional defect in Δ F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.* **278**, 51232–51242
41. Arakawa, T., Ejima, D., Kita, Y., and Tsumoto, K. (2006) Small molecule pharmacological chaperones. From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **1764**, 1677–1687
42. Liu, X. L., Doné, S. C., Yan, K., Kilpeläinen, P., Pikkarainen, T., and Trygvason, K. (2004) Defective trafficking of nephrin missense mutants rescued by a chemical chaperone. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1731–1738
43. Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1997) Correction of defective protein kinetics of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators. *J. Biol. Chem.* **272**, 709–712
44. Fan, J. Q., Ishii, S., Asano, N., and Suzuki, Y. (1999) Accelerated transport and maturation of lysosomal α -galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat. Med.* **5**, 112–115
45. Morello, J. P., Salahpour, A., Laperrière, A., Bernier, V., Arthus, M. F., Lonergan, M., Petäjä-Repo, U., Angers, S., Morin, D., Bichet, D. G., and Bouvier, M. (2000) Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J. Clin. Invest.* **105**, 887–895
46. Janovick, J. A., Maya-Nunez, G., and Conn, P. M. (2002) Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template. Misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 3255–3262
47. Petäjä-Repo, U. E., Hogue, M., Bhalla, S., Laperrière, A., Morello, J. P., and Bouvier, M. (2002) Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of Δ opioid receptor maturation. *EMBO J.* **21**, 1628–1637
48. Loo, T. W., Bartlett, M. C., and Clarke, D. M. (2003) Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding. *J. Biol. Chem.* **278**, 13603–13606

Effets de la mutation I541F :

Résultats complémentaires des articles présentés

Des résultats non publiés permettent de mieux comprendre le défaut de maturation d'ABCB4-I541F, les mécanismes de sa dégradation et l'effet de la cyclosporine A.

-Matériels et Méthodes-

Les « Matériels et Méthodes » des résultats complémentaires sont identiques à ceux disponibles dans les deux articles présentés, auxquels s'ajoutent les suivants :

Etude de la stabilité et cinétique de dégradation. Les cellules MDCK exprimant de façon stable ABCB4-WT ou ABCB4-I541F sont cultivées à confluence (48 h) dans des boîtes P35. Elles sont traitées pendant 15 h avec 10 mM de butyrate de sodium afin de stimuler le promoteur du cytomégalovirus (CMV) dont dépend l'expression du transgène. L'effet du butyrate de sodium est réversible. La cinétique commence à $t(h)=0$ au moment où le butyrate est retiré et se poursuit jusqu'à 72 h. Les boîtes sont lavées au PBS froid et congelées à -20°C à différents temps. L'analyse est faite par électrophorèse et Western blot, en déposant 10 μg de protéines par échantillon dans des gels à 7.5 % de polyacrylamide.

Inhibiteurs de la dégradation . Les cellules sont cultivées à confluence et traitées avec un inhibiteur du protéasome, le MG132 (BML-PI102, Enzo Life Sciences), à la concentration de 2 μM . La pompe à protons lysosomale est inhibée par la bafilomycine A1 (B 1793, Sigma) utilisée à 100 nM.

Cyclosporine A et stabilité. Les cellules MDCK exprimant de façon stable ABCB1-I541F-GFP ou ABCB4-I541F sont cultivées à confluence (48 h) dans des boîtes P35. Elles sont traitées pendant 12 h avec 10 mM de butyrate de sodium pour stimuler l'expression du transgène. Les cellules sont ensuite placées à 27°C pendant 12 h dans un milieu neuf sans butyrate de sodium pour permettre la maturation. La cinétique commence à $t(h)=0$ au moment où les cellules sont replacées à 37°C . Elle se poursuit jusqu'à 24 h. Pour limiter la durée de traitement des cellules, la CsA est ajoutée à $t(h)=6$ à une concentration de 10 μM . Les boîtes sont lavées au PBS froid et congelées à -20°C à différents temps. L'analyse est faite par

électrophorèse et Western blot, en déposant 10 µg de protéines par échantillon dans des gels à 7.5 % de polyacrylamide.

Substrats/inhibiteurs d'ABCB1/ABCB4 et modulateurs de protéines chaperonnes. Les cellules exprimant de façon stable ABCB4-I541F sont traitées avec les composés suivants : auréobasidine A (Clontech, 630466), daunorubicine (Calbiochem, 251800), paclitaxel (Sigma, T7402), vinblastine (Sigma, V1377), curcumine (Sigma, C1386).

-Résultats-

Comme ABCB1-I541F, ABCB4 présente un défaut de maturation. ABCB4 possède deux sites consensus de N-glycosylation sur la première boucle extracellulaire. La migration électrophorétique d'ABCB4-WT montre deux bandes d'environ 140 kDa et 160 kDa (bande A et B, respectivement). La digestion enzymatique des échantillons montre que la bande A n'est pas sensible à l'EndoH et correspond donc à la forme mature, glycosylée de façon complexe. La bande B est en revanche sensible à la digestion par l'EndoH et correspond donc à la forme immature riche en mannose. ABCB4-I541F migre sous forme d'une seule bande sensible à la digestion par l'EndoH (bande B). Comme ABCB1-I541F, le mutant ABCB4-I541F présente bien une absence de maturation (figure 35).

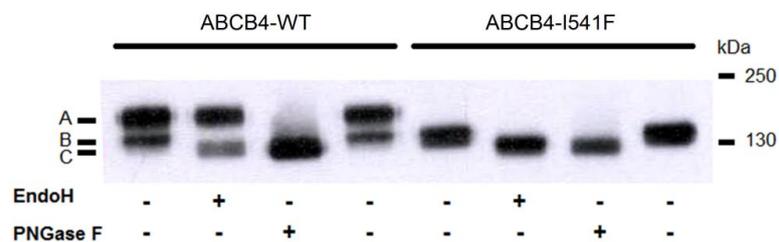


Figure 35 : ABCB4-I541F présente un défaut de maturation. Les lysats cellulaires sont digérés avec l'EndoH ou la PNGaseF selon le protocole utilisé dans le deuxième article. 20 µg de protéines sont déposés par puits pour une migration en SDS-PAGE. L'immuno-empreinte est réalisée avec l'anticorps P3-II26. Les formes mature (A), immature (B) et déglycosylée (C) sont indiquées.

Le mutant ABCB4-I541F est rapidement dégradé par le protéasome. Dans notre système d'expression, la transcription d'ABCB4/ABCB1 est sous le contrôle du promoteur du

cytomegalovirus (CMV). Ce promoteur présente l'avantage de pouvoir être stimulé par le butyrate de sodium qui permet l'hyperacétylation des histones et agit comme un activateur transcriptionnel des gènes (Palermo et al. 1991, Kruh 1982). Les cellules MDCK exprimant de façon stable ABCB4-WT et ABCB4-I541F sont traitées au butyrate de sodium pendant 15 h pour permettre la surexpression du transgène. La cinétique de dégradation est réalisée en prélevant les cellules à différents temps après avoir retiré le butyrate, jusqu'à ce que la transcription revienne à son niveau de base. La forme mature de la protéine WT présente ainsi une demi-vie d'environ 24 h (figure 36A). L'inhibition du protéasome par le MG132 et des enzymes lysosomales par la bafilomycine A1 diminue la vitesse de dégradation de la protéine WT (figure 36B). ABCB4-WT semble donc être dégradé à la fois par la voie protéasomale et par la voie lysosomale. La demi-vie de la protéine mutante, immature, est similaire à celle de la forme immature de la protéine normale, soit environ 2 h (figure 36C).

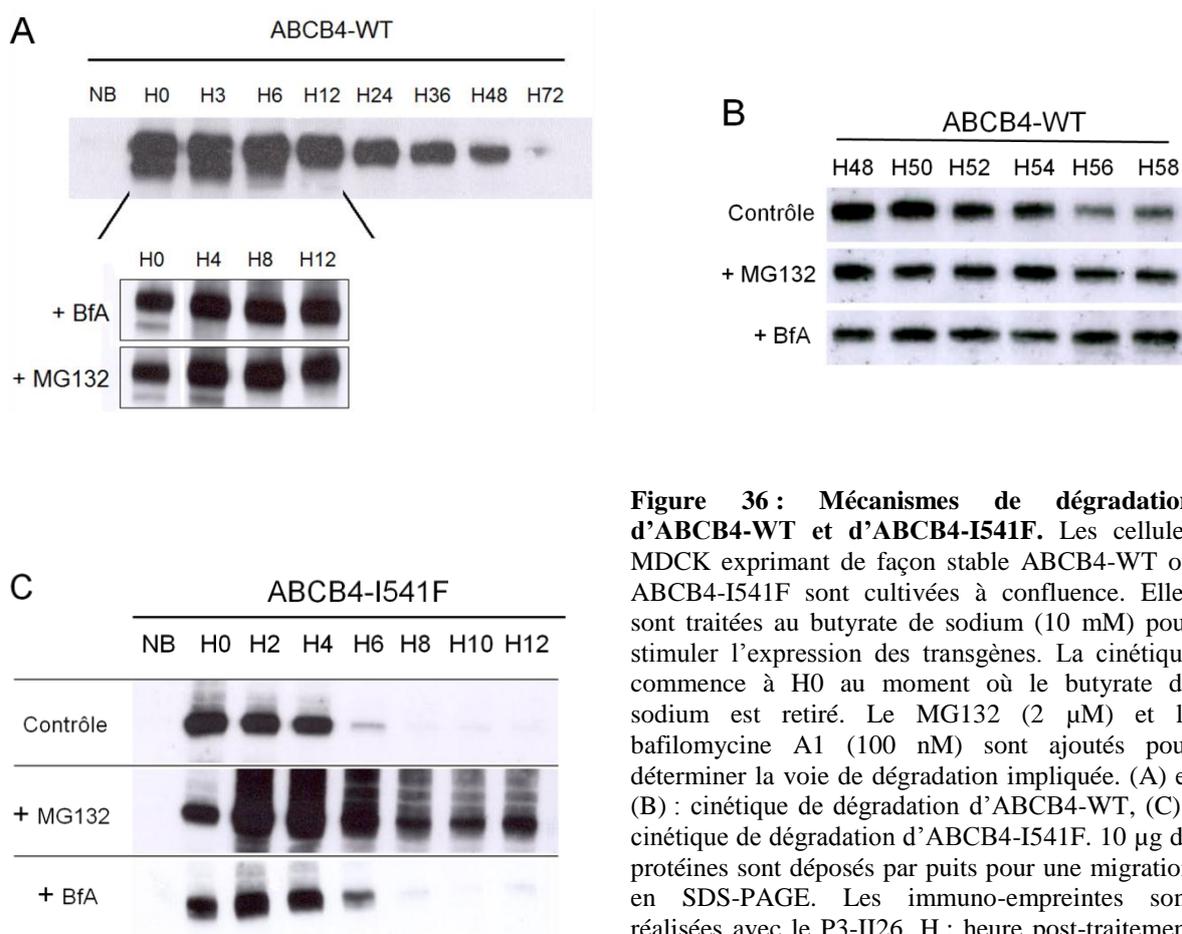


Figure 36 : Mécanismes de dégradation d'ABCB4-WT et d'ABCB4-I541F. Les cellules MDCK exprimant de façon stable ABCB4-WT ou ABCB4-I541F sont cultivées à confluence. Elles sont traitées au butyrate de sodium (10 mM) pour stimuler l'expression des transgènes. La cinétique commence à H0 au moment où le butyrate de sodium est retiré. Le MG132 (2 μ M) et la bafilomycine A1 (100 nM) sont ajoutés pour déterminer la voie de dégradation impliquée. (A) et (B) : cinétique de dégradation d'ABCB4-WT, (C) : cinétique de dégradation d'ABCB4-I541F. 10 μ g de protéines sont déposés par puits pour une migration en SDS-PAGE. Les immuno-empreintes sont réalisées avec le P3-II26. H : heure post-traitement au butyrate de sodium, NB : cellules non traitées au butyrate de sodium, BfA : Bafilomycine A1.

Dans le cas d'ABCB4-I541F, l'inhibition de la voie protéasomale provoque son accumulation et ralentit considérablement sa dégradation, contrairement à l'inhibition de la voie lysosomale. Lorsque le protéasome est inhibé, l'immuno-empreinte d'ABCB4-I541F montre une trainée de poids moléculaire plus élevée, ponctuée de bandes discrètes évocatrices d'une poly-ubiquitination. Cette voie de dégradation serait donc dépendante du système ubiquitine-protéasome. Des co-immunoprécipitations entre l'ubiquitine et ABCB4 manquent pour valider cette hypothèse. Le système lysosomal ne semble pas dépendre de la poly-ubiquitination. Ces résultats montrent que bloquer la dégradation ne permet pas la maturation du mutant. Les formes immatures destinées à la dégradation ne sont pas capables de gagner l'appareil de Golgi. Les mêmes observations ont été faites dans l'étude de la dégradation de CFTR et du mutant CFTR Δ F508 (Ward et al. 1995).

Les chaperonnes cellulaires calnexine et Hsc70 interagissent avec ABCB4-I541F. Comme le montre le deuxième article (Gautherot et al. 2012), la calnexine et Hsc70 coprécipitent avec ABCB1-I541F-GFP. Pour s'assurer que ces chaperonnes sont aussi impliquées dans le repliement d'ABCB4, des co-immunoprécipitations sont réalisées. La forme immature d'ABCB4-WT et ABCB4-I541F sont co-immunoprécipités avec la calnexine (figure 37A), ce qui montre que la calnexine interagit avec ABCB4. En revanche, Hsc70 co-immunoprécipite préférentiellement avec ABCB4-I541F et pas (ou peu) avec ABCB4-WT (figure 37B). Ce résultat montre qu'Hsc70 interagit avec la protéine mal conformée.

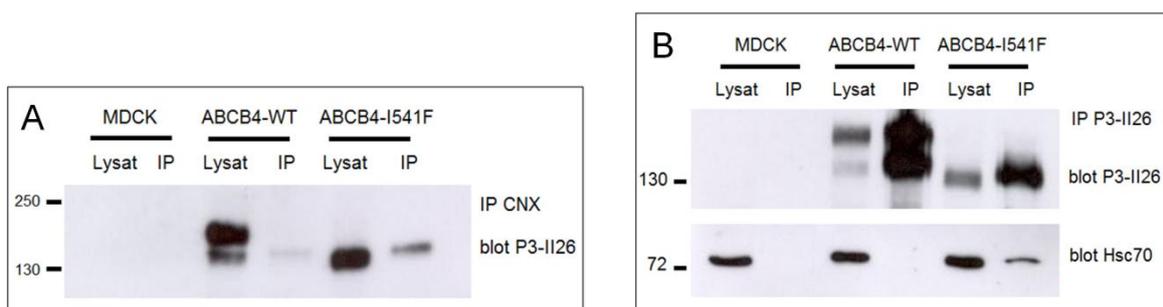


Figure 37 : ABCB4-I541F coprécipite avec la calnexine et Hsc70. Les cellules MDCK témoins ou exprimant de façon stable ABCB4-WT ou ABCB4-I541F sont lysées. L'immunoprécipitation est réalisée avec l'anticorps anti-calnexine (A) ou l'anticorps P3-II26 (B). Figures représentatives de 3 expérimentations. Lysat : 0,5 % de la quantité utilisée pour l'immunoprécipitation. IP : ImmunoPrécipitation.

Le deuxième article met en avant l'action pro-repliement d'Hsc70. Le fait de surexprimer Hsp70 (son homologue inductible) ne permet pas de rétablir la maturation du mutant ABCB1-I541F-GFP. Selon les co-chaperonnes qui modulent l'action de Hsc70, celle-ci peut aussi exercer une action pro-dégradation en recrutant des ubiquitine-ligases qui vont orienter la protéine vers la dégradation par le protéasome. Au contraire de la surexpression de Hsc/Hsp70, la sous-expression pourrait diminuer la dégradation du mutant et, peut-être, favoriser sa maturation. Le 4-phénylbutyrate de sodium (4-PB) a été montré capable de diminuer l'expression de Hsc70 et ainsi de favoriser la maturation de CFTR Δ F508 (Rubenstein and Zeitlin 2000). Son action directe en tant que chaperonne chimique sur ABCB1-I541F-GFP n'est pas vérifiée car il ne permet pas sa maturation (deuxième article). Un traitement plus long (48 h) avec des concentrations croissantes (jusqu'à 10 mM) de 4-PB n'a cependant pas permis de vérifier la diminution de l'expression de Hsc70 dans les cellules MDCK (résultats non montrés).

La maturation et le contrôle qualité d'ABCB4 sont donc similaires à ceux décrits pour le modèle ABCB1-GFP dans le deuxième article. En ajoutant les résultats apportés par les cinétiques de dégradation, nous pouvons proposer un modèle pour la biosynthèse, le contrôle qualité et la dégradation d'ABCB4 et du mutant I541F (figure 38) :

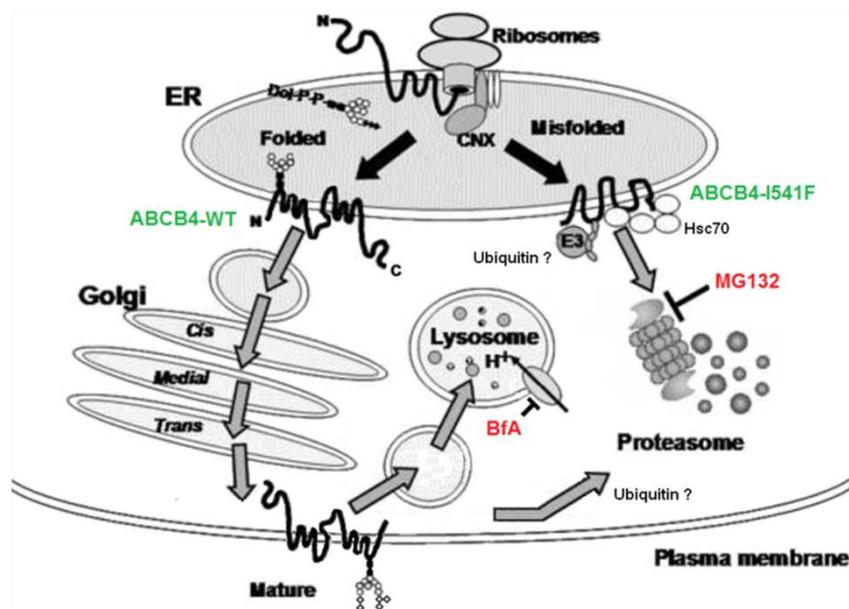


Figure 38 : Modèle proposé de la biosynthèse, le contrôle qualité et la dégradation d'ABCB4-WT et ABCB4-I541F. La calnexine interagit avec ABCB4 dans le réticulum endoplasmique (ER). Lorsque ABCB4-WT est correctement conformé, il passe dans l'appareil de Golgi pour continuer sa maturation. Il atteint ensuite la membrane plasmique. Il est enfin dégradé par le système lysosomal et par le protéasome. ABCB4-I541F ne se replie pas correctement et il est reconnu par Hsc70. Il est probablement ubiquitiné avant de sortir du réticulum endoplasmique pour être dégradé par le protéasome. Inspiré de (Furukawa et al. 2009).

Effets de plusieurs substrats et inhibiteurs d'ABCB1/ABCB4 et de modulateurs de protéines chaperonnes sur l'expression du mutant ABCB4-I541F. Différents composés connus pour leur capacité à rétablir une expression normale de mutants conformationnels de transporteurs ABC ou d'autres protéines ont été testés sur ABCB4-I541F. Les chaperonnes chimiques non spécifiques telles que le DMSO ou le glycérol ne montrent pas d'effet sur la maturation du mutant, bien que le glycérol soit efficace sur ABCB1-I541F-GFP comme le montre le deuxième article. Les chaperonnes pharmacologiques testées sont des molécules connues comme substrats ou inhibiteurs d'ABCB1, certaines pouvant aussi être transportées par ABCB4 (Kino et al. 1996, Loo and Clarke 1997, Smith et al. 2000, Kartner et al. 1983). A l'exception de l'effet de la cyclosporine A décrit dans le deuxième article, aucune des autres molécules testées ne rétablit la maturation d'ABCB4-I541F. Les modulateurs des protéines chaperonnes ne permettent pas non plus la maturation (figure 39).

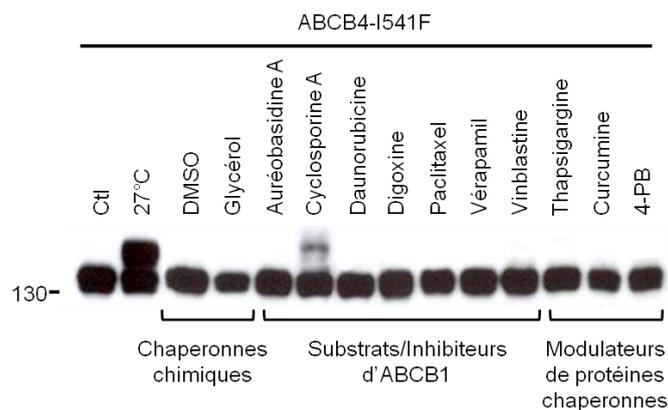


Figure 39 : Effets de différents composés sur la maturation d'ABCB4-I541F. Les cellules exprimant de façon stable ABCB4-I541F sont cultivées à confluence dans une plaque 24 puits. Elles sont traitées 6 h au butyrate de sodium puis les différentes molécules sont ajoutées pendant 6 h aux concentrations suivantes : DMSO 3 %, glycérol 2 %, auréobasidine A 20 μ M, cyclosporine A 20 μ M, daunorubicine 2 μ M, digoxine 0.5 μ M, paclitaxel 20 μ M, vérapamil 100 μ M, vinblastine 20 μ M, thapsigargine 10 μ M, curcumine 40 μ M, 4-phénylbutyrate (4-PB) 10 mM. 20 μ g de protéines sont déposés par échantillon. Les immuno-empreintes sont réalisées avec l'anticorps P3-II26. Ctl : contrôle.

Les mutants ABCB1/ABCB4-I541F-GFP rétablis à la membrane par l'abaissement de la température ne sont pas stables. La stabilité d'ABCB1-I541F-GFP est augmentée par la cyclosporine A (CsA). L'abaissement de la température de culture permet de rétablir la maturation et l'expression apicale des mutants ABCB1-I541F-GFP et ABCB4-I541F. Une cinétique de décroissance est alors réalisée pour connaître la stabilité de ces transporteurs une fois rétablis (r) par l'abaissement de la température. La demi-vie de (r)ABCB1-I541F-GFP et

de (r)ABCB4-I541F est la même, environ 6 h (figure 40). La forme mature (A) restaurée a la même stabilité que la forme immature (B). La stabilité est ensuite mesurée après traitement des cellules par la CsA. La demi-vie de (r)ABCB1-I541F-GFP augmente en présence de CsA où elle atteint environ 10 h (figure 40A). En revanche, la demi-vie de (r)ABCB4-I541F ne change pas avec la CsA (figure 40B). Ces résultats corroborent ceux décrits dans le deuxième article, à savoir que la CsA est non seulement plus efficace pour restaurer la maturation du mutant ABCB1 que de son homologue ABCB4, mais qu'en plus, elle permet de mieux le stabiliser. Ces résultats suggèrent que la CsA a une meilleure affinité pour ABCB1 que pour ABCB4.

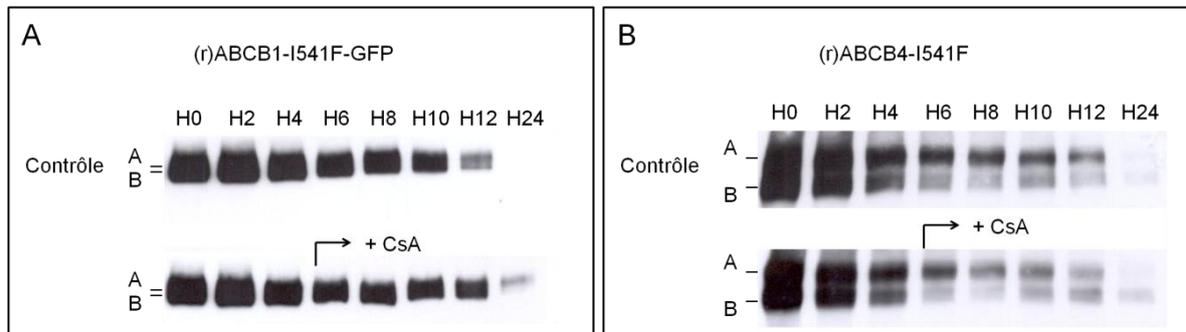


Figure 40 : Effet de la CsA sur la stabilité de (r)ABCB1-I541F-GFP et (r)ABCB4-I541F. Les cellules MDCK exprimant de façon stable ABCB1-I541F-GFP ou ABCB4-I541F sont cultivées à confluence. Elles sont incubées avec du butyrate de sodium (10 mM) pendant 12 h pour stimuler l'expression des transgènes. Le butyrate de sodium est retiré avant de placer les cellules à 27°C pendant 12 h pour restaurer (r) la maturation. La cinétique de dégradation commence à t(h)=0 au moment où les cellules sont replacées à 37°C. La CsA est ajoutée à H6 à une concentration de 10 μ M. 20 μ g de protéines sont déposés par puits. Les immuno-empreintes sont réalisées avec les anticorps anti-GFP ou P3-II26.

Ces résultats complémentaires confirment que la mutation I541F affecte ABCB1 et ABCB4 de façon très similaire. ABCB1-GFP demeure donc un bon modèle dans l'étude du repliement, du trafic, de la stabilité et de la dégradation de son proche homologue ABCB4. L'effet moindre de la CsA sur ABCB4 par rapport à ABCB1 nous incite à poursuivre dans cette voie pour identifier des analogues structuraux de la CsA plus affins pour ABCB4.

DEUXIEME PARTIE :

Etude du domaine N-terminal d'ABCB4

- **Introduction**

Le domaine N-terminal d'ABCB4 est composé, selon les logiciels de prédictions, d'environ 54 acides aminés. Il représente 4.2 % de la longueur totale de la protéine. Localisé du côté cytosolique, il est peu structuré (figure 41). Sa fonction n'est pas connue et il n'est pas conservé entre les différents transporteurs ABC. Des mutations identifiées chez des patients atteints de syndrome LPAC ou de PFIC3 y sont localisées, notamment au niveau de la thréonine 34 et de l'arginine 47. Ces mutations pathologiques indiquent l'importance de ce domaine pour le transporteur.

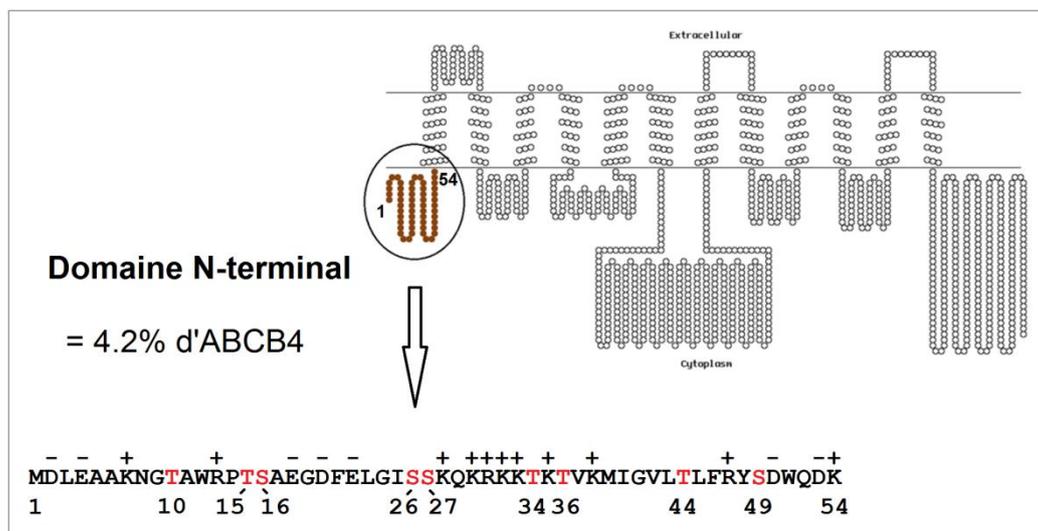


Figure 41 : Le domaine N-terminal d'ABCB4 et sa séquence peptidique. Les sérines et thréonines potentiellement phosphorylables sont en rouge. Les résidus chargés négativement (-) ou positivement (+) sont indiqués. L'organisation membranaire est réalisée sur *TOPO2*: <http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py>.

Le domaine N-terminal possède une région riche en lysines donc chargée positivement qui pourrait jouer un rôle dans des interactions avec des protéines partenaires. Il contient aussi plusieurs sérines et thréonines localisées dans des sites consensus de phosphorylation de différentes protéines kinases (figures 41 et 42).

Figure 42 : Sites prédictifs de phosphorylation par différentes kinases. Prédiction réalisée par le logiciel NetPhosK. <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>. PKC: *Protein Kinase C*, PKA: *cAMP-dependent Protein Kinase*, PKG: *cGMP-dependent Protein Kinase*, CKI: *Casein Kinase 1*, RSK : *Ribosomal S6 Kinase*.

```
Method: NetPhosK without ESS filtering:
Query: Sequence
```

Site	Kinase	Score
T-10	PKC	0.54
T-15	PKA	0.67
T-15	PKG	0.62
S-16	CKI	0.58
S-26	PKC	0.57
S-27	PKC	0.77
T-34	RSK	0.53
T-34	PKC	0.76
T-34	PKA	0.55
T-34	PKG	0.72
T-36	PKC	0.92
T-44	PKC	0.83
S-49	PKA	0.71

Highest Score: 0.92 PKC at position 36

L'objectif de cette deuxième partie est d'étudier le rôle du domaine N-terminal. La stratégie consiste à étudier les effets de délétions partielles, les effets des mutations T34M et R47G décrites chez des patients atteints d'un syndrome LPAC, et les effets des mutations des sérines et des thréonines. Les résultats nous ont incités à explorer la phosphorylation d'ABCB4 par la PKC (*Protein Kinase C*) et la PKA (*cAMP-dependent Protein Kinase*) et plus particulièrement la phosphorylation des sérines et thréonines du domaine cytoplasmique.

• Matériels et Méthodes

Les « Matériels et Méthodes » employés dans cette deuxième partie sont identiques à ceux de la première partie, auxquels s'ajoutent les suivants :

Constructions et Mutagenèse. Les délétions ainsi que les mutations ponctuelles T34M, T34D, R47G et S49D sont effectuées sur le plasmide pcDNA3 (Invitrogen) portant l'isoforme A d'ABCB4 à l'aide du kit QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis. Les délétions $\Delta 1-21$ et $\Delta 1-49$ sont réalisées en commençant par insérer un site de restriction HindIII suivi du nouvel ATG. Pour la délétion $\Delta 1-21$, les amorces utilisées sont CGC CCC ACG AGC GCG GAG AAG CTT GAG ATG GAA CTG GGC ATC AGC (sens) et GCT GAT GCC CAG TTC CAT CTC AAG CTT CTC CGC GCT GGG GCG (anti-sens). Pour la délétion $\Delta 1-49$, les amorces utilisées sont CAT TGT TTC GAT ACA AGC TTG AGA TGG ATT GGC AGG ATA AAT TG (sens) et CAA TTT ATC CTG CCA ATC CAT CTC AAG CTT GTA TCG AAA CAA TG (anti-sens). ABCB4 est inséré dans le pcDNA3 entre un site HindIII en 3' et un site XbaI en 5' (premier article). Le pcDNA3-ABCB4 d'origine et les plasmides portant le

site HindIII supplémentaire sont digérés par HindIII et Bam HI (Invitrogen) car la séquence d'ADNc d'ABC4 contient un site de restriction Bam HI. Après migration sur gel d'agarose 2.5 %, les fragments d'intérêts générés sont récupérés grâce au kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) et ligués avec la T4 DNA ligase (Invitrogen). La délétion Δ 28-38 est réalisée avec les amorces TTG AAC TGG GCA TCA GCA GCA TGA TTG GAG TAT TAA CAT TG (sens) et CAA TGT TAA TAC TCC AAT CAT GCT GCT GAT GCC CAG TTC AA (anti-sens). Les oligonucléotides utilisés pour la mutation T34M sont CAA ACA AAA AAG GAA AAA AAT GAA GAC AGT GAA AAT GAT TG (sens) et CAA TCA TTT TCA CTG TCT TCA TTT TTT TCC TTT TTT GTT TG (anti-sens), ceux utilisés pour la mutation T34D sont GCA GCA AAC AAA AAA GGA AAA AAG ATA AGA CAG TGA AAA TGA TTG (sens) et CAA TCA TTT TCA CTG TCT TAT CTT TTT TCC TTT TTT GTT TGC TGC (anti-sens), ceux utilisés pour la mutation S49D sont GGA GTA TTA ACA TTG TTT CGA TAC GAC GAT TGG CAG GAT AAA TTG TTT ATG (sens) et CAT AAA CAA TTT ATC CTG CCA ATC GTC GTA TCG AAA CAA TGT TAA TAC TCC (anti-sens) et ceux utilisés pour la mutation R47G sont GGA GTA TTA ACA TTG TTT GGA TAC TCC GAT TGG C (sens) et GCC AAT CGG AGT ATC CAA ACA ATG TTA ATA CTC C (anti-sens). Les autres mutations ponctuelles (S26A, S27A, T36A, T44A et S49A) sont réalisées dans le vecteur d'expression rétroviral pMSCVneo (Clontech) dans lequel est cloné l'ADNc d'ABC4 entre EcoRI et BglIII (Invitrogen), en utilisant le kit QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis. Les oligonucléotides utilisés pour la mutation S26A sont CTT TGA ACT GGG CAT CGC CAG CAA ACA AAA AAG G (sens) et CCT TTT TTG TTT GCT GGC GAT GCC CAG TTC AAA G (anti-sens). Ceux utilisés pour la mutation S27A sont ACT GGG CAT CAG CGC CAA ACA AAA AAG GAA AAA (sens) et TTT TTC CTT TTT TGT TTG GCG CTG ATG CCC AGT (anti-sens). Ceux utilisés pour la mutation T36A sont AAA GGA AAA AAA CGA AGG CAG TGA AAA TGA TTG GAG (sens) et CTC CAA TCA TTT TCA CTG CCT TCG TTT TTT TCC TTT (anti-sens). Ceux utilisés pour la mutation T44A sont GAT TGG AGT ATT AGC ATT GTT TCG ATA CTC CG (sens) et CGG AGT ATC GAA ACA ATG CTA ATA CTC CAA TC (anti-sens). Ceux utilisés pour la mutation S49A sont AAC ATT GTT TCG ATA CGC CGA TTG GCA GGA TAA ATT G (sens) et CAA TTT ATC CTG CCA ATC GGC GTA TCG AAA CAA TGT T (anti-sens). Les constructions sont vérifiées par séquençage automatique (kit Big Dye Terminator v1.1 Applied Biosystems).

Transduction du pMSCVneo. Le plasmide pMSCVneo est transfecté dans les cellules GP2-293 (Clontech) qui contiennent les gènes de structure des particules virales. Elles sont capables d'insérer le vecteur dans des particules virales infectieuses non-répliquatives. Les particules virales produites sont récupérées pour infecter les cellules cibles (cellules MDCK et cellules HepG2).

Clonage des cellules MDCK. L'expression d'ABCB4-WT et des différents mutants n'est pas homogène dans chacune des populations cellulaires. De plus, une importante proportion de cellules se révèle négative pour l'expression du transgène. Le clonage des cellules permet d'obtenir des lignées homogènes. La population totale des cellules MDCK (obtenue après 2 semaines de sélection par le G418 à 1 mg/ml) est trypsinée, comptée et diluée à 1 cellule/ μ l. Pour réduire les risques de chevauchement entre deux clones, des boîtes P100 sontensemencées avec 10 à 30 μ l de la dilution. Au bout de 10 jours, les colonies sont visibles à l'œil nu. Les boîtes sont lavées au PBS. Les colonies sont récupérées grâce à des cylindres de clonage en verre ou à des pointes de 200 μ l sectionnées. De la vaseline stérile permet d'étanchéifier le bord des cylindres. Un cylindre est posé sur chaque colonie et 25 μ l de trypsine sont déposés pendant 20 minutes pour décrocher les cellules. Les cellules de chaque colonie sont repiquées dans des plaques 12 ou 24 puits. Parmi les clones obtenus, une partie n'exprime pas le transgène, une partie l'exprime de façon détectable par Western blot et en immunofluorescence uniquement après stimulation par le butyrate de sodium, et une dernière partie, plus rare, l'exprime sans stimulation.

Dosage de la phosphatidylcholine excrétée. Pour le dosage de la PC, des clones de cellules MDCK exprimant ABCB4-WT et les différents mutants sont choisis parmi ceux qui n'ont pas besoin de stimulation par le butyrate de sodium. Le butyrate de sodium entraîne, en effet, une mortalité cellulaire qui peut interférer avec le dosage. Les cellules sont cultivées à confluence dans des plaques 6 puits puis sont lavées deux fois avec du DMEM (phenol red free) (PAA) pour éliminer le SVF. Le milieu de culture utilisé pour le dosage se compose de DMEM (phenol red free) supplémenté de 0.02 % d'albumine (fatty acid free) (Sigma, A8806) et de 0.5 mM de taurocholate de sodium (Sigma, T9034). Après 24 h, le milieu est prélevé et centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes. Le dosage de la PC est réalisé avec le kit Phosphatidylcholine Assay (Biovision, K-576-100). Brièvement, ce kit contient une enzyme spécifique qui hydrolyse la PC pour libérer la tête choline. Celle-ci va réagir avec un produit (OxiRed) pour générer de la fluorescence (Ex/Em : 535 nm/587 nm). Une gamme étalon de

différentes concentrations de PC permet de calculer la quantité excrétée par les cellules. La fluorescence est lue avec le fluorimètre TECAN Infinite® M200.

Purification des phospho-protéines. Les protéines phosphorylées sont purifiées avec le kit Phosphoprotein Purification (Qiagen, Cat. No. 37101). Les cellules MDCK sont cultivées à confluence et lysées avec un tampon de lyse contenant du CHAPS 0.25 %. Le lysat (environ 2.5 mg de protéines) est passé à travers une colonne de chromatographie d'affinité qui retient les protéines phosphorylées. Après élution, les protéines sont concentrées sur des colonnes d'ultrafiltration et déposées sur gel SDS-PAGE.

Modulateurs de kinases. La PKA est activée par la forskoline (Enzo, CN-100) à 10 μ M et inhibée par l'H-89 (Enzo, EI-196) à 10 μ M. La PKC est activée par le PMA (Tocris, Cat.No.1201) à 10 nM et inhibée par le Gö6983 (Tocris, Cat.No.2285) à 10 μ M. Les cellules sont traitées pendant 1 h.

Phosphorylation in vitro et spectrométrie de masse MS/MS. Le fragment N-terminal d'ABCB4 est recombiné avec la GST dans le vecteur d'expression pGEX-4T-1 (GE Healthcare). Les mutations des sérines et des thréonines sont générées par mutagenèse dirigée avec les oligonucléotides cités précédemment. La production des peptides recombinants est réalisée dans des bactéries BL21 (Stratagene) après induction par l'IPTG (IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside) à une concentration de 0,4 mM pendant 3 h. Les bactéries sont lysées et les peptides sont purifiés sur des billes de Glutathion Sépharose (GE Healthcare). Après digestion par la thrombine (Pharmacia, 27-0846-01) (2 unités pour 100 μ g de protéines), pendant 16 h à 22 °C sous agitation, les peptides recombinants sont élués en tampon carbonate de sodium 50 mM, pH 11 pendant 1 h. Pour revenir à un pH physiologique, les peptides sont dialysés à travers une membrane (Thermo scientific, Slide-A-Lyzer® Dialysis) dans un tampon Tris 50 mM, pH 7,4. Cinq μ g de peptides sont phosphorylés *in vitro* par la PKC (Enzo, BML-SE133) ou la PKA (Promega, V5161) pendant 1 h à 30°C en présence d'ATP (200 μ M) et de MgCl₂ (10 mM). Après dessalage sur colonne Zip Tip C18 (Millipore), les échantillons sont immédiatement analysés en spectrométrie de masse MS/MS (technologie MALDI-TOF sur Voyager DE PRO) afin de déterminer leur état de phosphorylation.

• Résultats

Effets des délétions progressives du domaine N-terminal. Afin d'identifier le rôle du domaine N-terminal, des délétions progressives ont été réalisées. La délétion des 21 premiers acides aminés ($\Delta 1-21$) n'affecte pas la maturation de la protéine qui se présente sous deux formes, une forme mature d'environ 140 kDa et une forme immature d'environ 160 kDa, comme la protéine sauvage. Au contraire, la délétion $\Delta 1-49$ provoque l'absence de maturation (figure 43A). En immunofluorescence, ABCB4-WT et ABCB4 $\Delta 1-21$ sont localisés à la membrane des cellules MDCK alors que la délétion $\Delta 1-49$ reste intracellulaire (figure 43B). Contrairement au mutant I541F étudié précédemment, l'abaissement de la température à 27°C, même après 3 jours de culture, ne permet pas de rétablir la maturation du mutant ABCB4 $\Delta 1-49$ (figure 43C), ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'un défaut conformationnel.

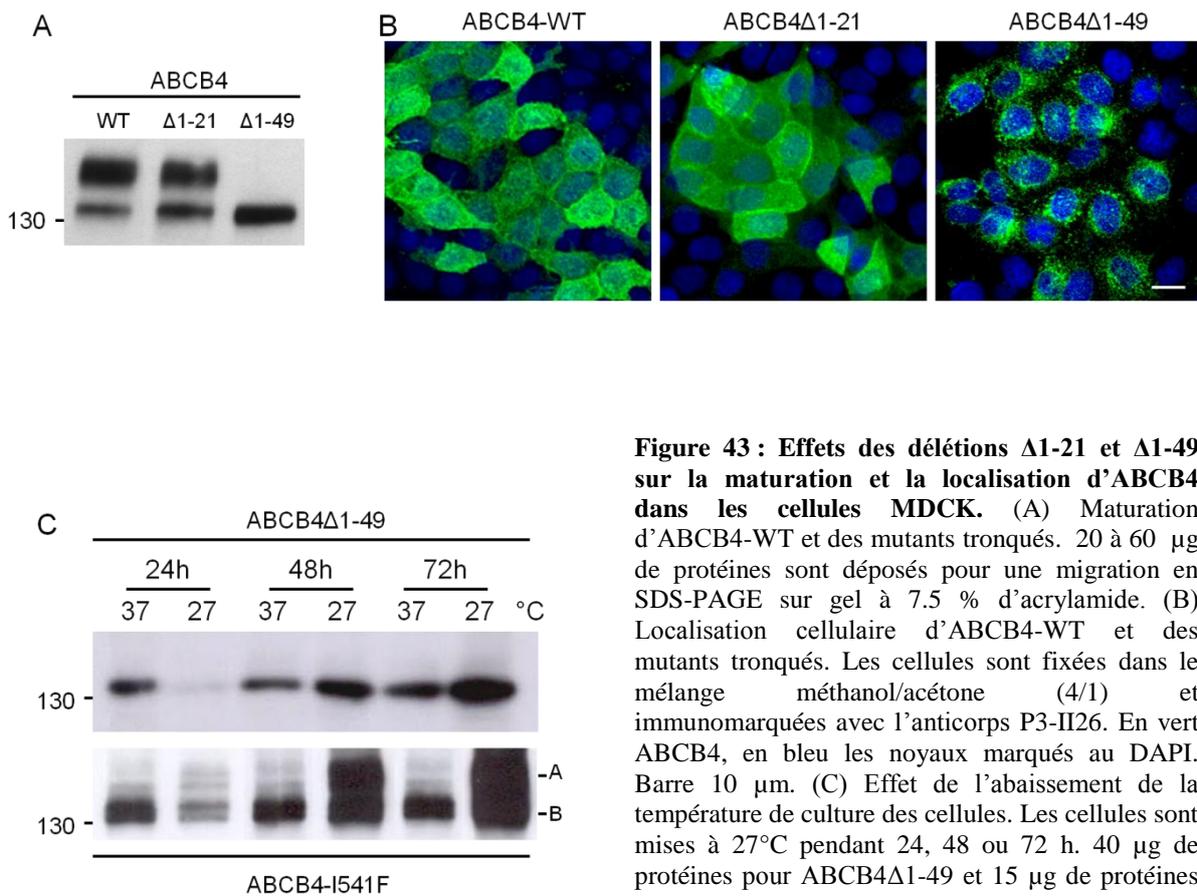


Figure 43 : Effets des délétions $\Delta 1-21$ et $\Delta 1-49$ sur la maturation et la localisation d'ABCB4 dans les cellules MDCK. (A) Maturation d'ABCB4-WT et des mutants tronqués. 20 à 60 μ g de protéines sont déposés pour une migration en SDS-PAGE sur gel à 7.5 % d'acrylamide. (B) Localisation cellulaire d'ABCB4-WT et des mutants tronqués. Les cellules sont fixées dans le mélange méthanol/acétone (4/1) et immunomarquées avec l'anticorps P3-II26. En vert ABCB4, en bleu les noyaux marqués au DAPI. Barre 10 μ m. (C) Effet de l'abaissement de la température de culture des cellules. Les cellules sont mises à 27°C pendant 24, 48 ou 72 h. 40 μ g de protéines pour ABCB4 $\Delta 1-49$ et 15 μ g de protéines pour ABCB4-I541F sont déposés pour une migration en SDS-PAGE sur gel à 7.5 % d'acrylamide.

La zone située entre le vingt-et-unième et le quarante-neuvième acide aminé est donc une partie importante à la fois pour la maturation et pour la localisation d'ABCB4. Cette partie comprend une séquence riche en lysine (acides aminés 28-38) donc fortement chargée positivement (figure 41).

La délétion de la région chargée riche en lysine provoque un défaut de maturation et de trafic d'ABCB4. Dans des cellules MDCK exprimant de façon stable ABCB4 Δ 28-38, la délétion entraîne une absence de forme mature ainsi qu'une rétention d'ABCB4 dans un compartiment intracellulaire, probablement le RE (figures 44A et 44B). Les cellules HepG2 transfectées transitoirement expriment aussi ABCB4 Δ 28-38 dans un compartiment intracellulaire (figure 44B). La colocalisation avec la calnexine montre qu'il s'agit du RE (résultat non montrés). Cette région joue donc un rôle important pour la sortie du RE, la maturation et le trafic vers la surface cellulaire d'ABCB4. Lorsque les cellules sont placées à 27°C pendant 48 h, aucune maturation n'est détectée (figure 44C) ce qui suggère que le défaut n'est pas conformationnel.

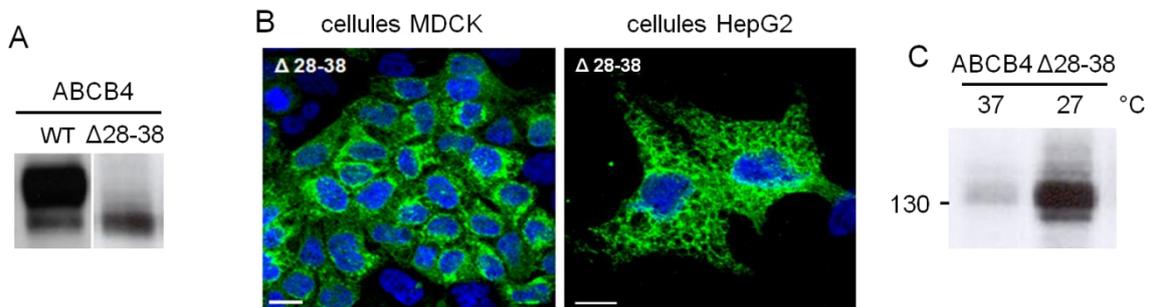


Figure 44 : Effets de la délétion Δ 28-38 sur la maturation et sur la localisation d'ABCB4. Les cellules MDCK et HepG2 sont transfectées avec ABCB4 Δ 28-38. (A) Les cellules MDCK sont lysées et 25 μ g de protéines sont déposés sur gel SDS-PAGE pour l'analyse des immuno-empreintes. (B) Les cellules MDCK et HepG2 sont fixées dans le mélange méthanol/acétone (4/1) et immunomarquées par l'anticorps P3-II26. En vert ABCB4, en bleu les noyaux marqués au DAPI. Barres 10 μ m. (C) Effet de l'abaissement de la température de culture des cellules. Les cellules MDCK sont mises à 27°C pendant 48 h. 40 μ g de protéines sont déposés sur gel SDS-PAGE pour l'analyse des immuno-empreintes.

Les mutations des sérines et des thréonines du domaine N-terminal ne perturbent ni la maturation ni l'expression apicale d'ABCB4. Le domaine N-terminal contient de nombreuses sérines et thréonines potentiellement phosphorylables (figure 42). La phosphorylation est une modification post-traductionnelle fréquente qui constitue un moyen

de régulation dans de nombreux aspects du trafic ou de l'activité des protéines. La phosphorylation d'ABCB4 n'a pas été étudiée. Les sérines et thréonines situées entre le vingt-et-unième et le quarante-neuvième acide aminé ont été mutées en alanine, à l'exception de la thréonine 34, mutée en méthionine, ce qui correspond à la mutation identifiée chez un patient atteint du syndrome LPAC. L'effet de chaque mutation a été étudié individuellement. Les cellules MDCK transfectées de façon transitoire avec les différentes mutations expriment la forme mature d'ABCB4 (figure 45A), avec une localisation à la surface apicale des cellules identique à la protéine non mutée (figure 45B et résultats non montrés pour les mutations S27A, T36A et T44A). De même, dans les cellules HepG2 transfectées de façon transitoire avec ces mutants, la localisation d'ABCB4 est normale avec une expression apicale au niveau du canalicule (figure 45C).

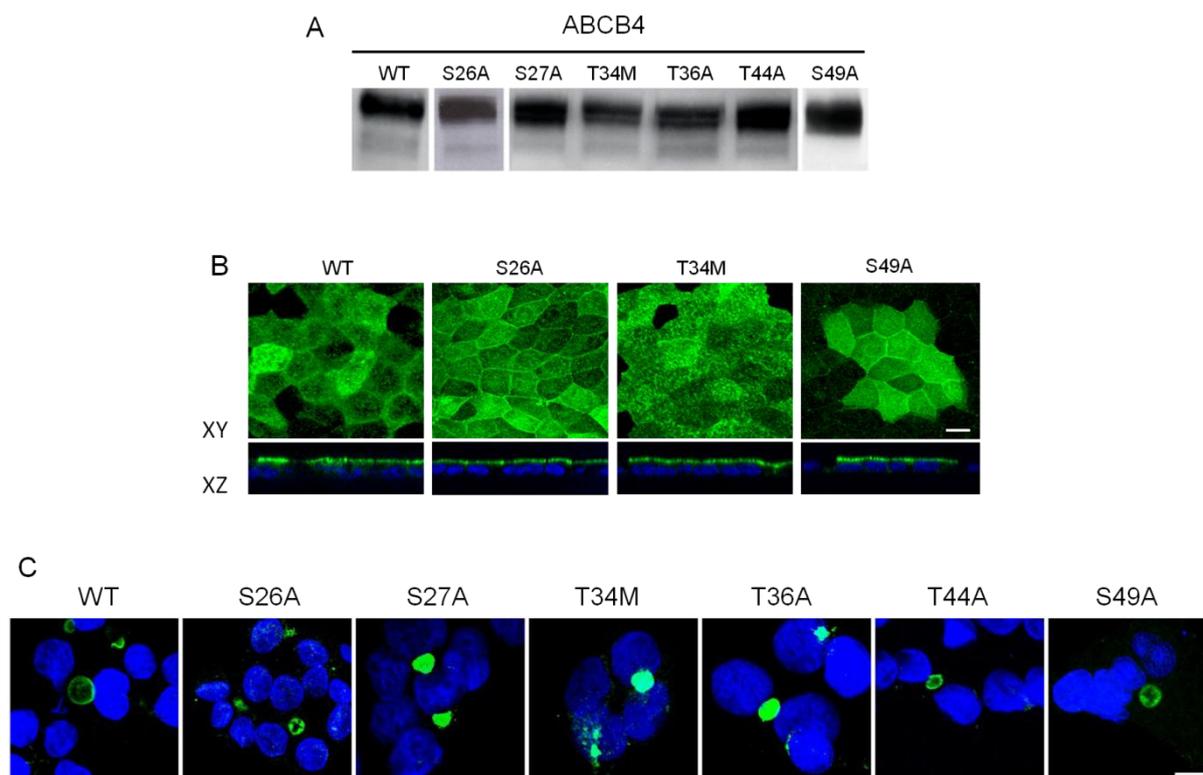


Figure 45 : Effets des mutations des sérines et des thréonines en un acide aminé non chargé dans les cellules MDCK et les cellules HepG2. (A) Les cellules MDCK sont lysées et 25 µg de protéines sont déposés sur gel SDS-PAGE pour l'analyse des immuno-empreintes. Les cellules MDCK (B) et HepG2 (C) sont fixées dans le mélange méthanol/acétone (4/1) et immunomarquées par l'anticorps P3-II26. En vert ABCB4, en bleu les noyaux marqués au DAPI. Barres 10 µm.

La mutation individuelle des sérines et thréonines du domaine N-terminal en un acide aminé non chargé (alanine ou méthionine) ne modifie donc pas la maturation ou le trafic à la membrane d'ABCB4.

Effets de mutations mimant une phosphorylation. A l'inverse, les sérines et thréonines peuvent être mutées en acide aspartique (D) qui porte une charge négative et mime donc une phosphorylation. La thréonine 34 a été ciblée de façon prioritaire car elle est mutée chez des patients. De même, la sérine 49 a été choisie car elle est située à proximité immédiate de l'arginine 47 qui est mutée chez plusieurs patients. Dans les cellules MDCK transfectées de façon transitoire, le mutant ABCB4-T34D montre un profil de migration sur gel normal et une localisation membranaire normale. Au contraire, la mutation S49D entraîne un défaut de maturation et l'accumulation d'ABCB4 dans un compartiment intracellulaire (figure 46A et 46B). La maturation d'ABCB4-S49D n'est pas rétablie après l'abaissement de la température de culture des cellules (Figure 46C), ce qui suggère que le défaut n'est pas conformationnel.

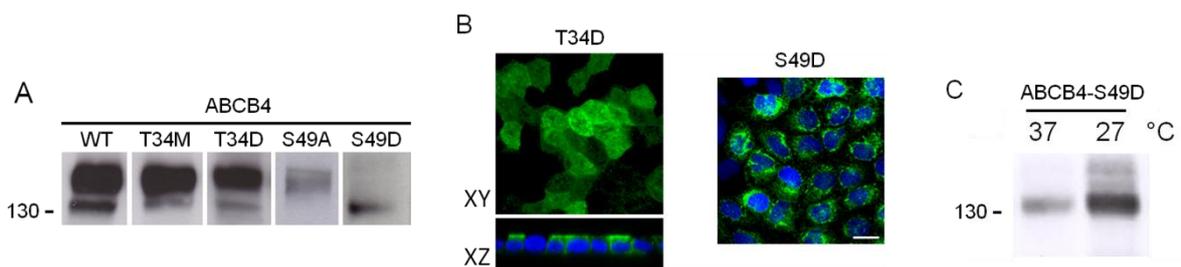


Figure 46 : Effets de la mutation en acide aspartique de la thréonine 34 et de la sérine 49. (A) Les cellules MDCK sont lysées et 25 µg de protéines sont déposés sur gel SDS-PAGE pour l'analyse des immuno-empreintes. (B) Les cellules MDCK sont fixées dans le mélange méthanol/acétone (4/1) et immunomarquées par l'anticorps P3-II26. En vert ABCB4, en bleu les noyaux marqués au DAPI. Barre 10 µm. (C) Effet de l'abaissement de la température de culture des cellules exprimant ABCB4-S49D. Les cellules sont mises à 27°C pendant 48 h. 40 µg de protéines sont déposés sur gel SDS-PAGE pour l'analyse des immuno-empreintes.

Ce résultat laisse penser que la charge de cette région joue un rôle important dans la sortie d'ABCB4 du RE pour permettre sa maturation.

Seule la forme immature d'ABCB4 est retenue par les colonnes de purification des phospho-protéines. ABCB4 est aussi phosphorylé hors du domaine N-terminal. L'état de phosphorylation général d'ABCB4 a été étudié par chromatographie d'affinité sur des colonnes retenant spécifiquement les protéines phosphorylées. Les cellules MDCK exprimant

de façon stable ABCB4-WT ou ABCB4 Δ 1-49 sont lysées et déposées sur les colonnes. Après élution, concentration et migration sur gel SDS-PAGE, seule la forme immature d'ABCB4-WT est détectée. Les effets d'activateur et d'inhibiteur de PKA (forskoline et H-89, respectivement) et de PKC (PMA et Gö6983, respectivement) sont aussi étudiés. L'activation des kinases entraîne une rétention plus importante de la forme immature dans les colonnes, contrairement aux inhibiteurs qui la diminuent. La PKA et la PKC seraient donc impliquées dans la phosphorylation d'ABCB4 (figure 47A). Dans ces expériences, les cellules sont traitées pendant un temps court (1 h) afin de limiter l'effet de ces activateurs et inhibiteurs de kinases sur le promoteur CMV. ABCB4 tronqué du domaine N-terminal (Δ 1-49) est aussi retenu par la colonne de phospho-purification, ce qui indique qu'ABCB4 est phosphorylé à d'autres niveaux (figure 47B).

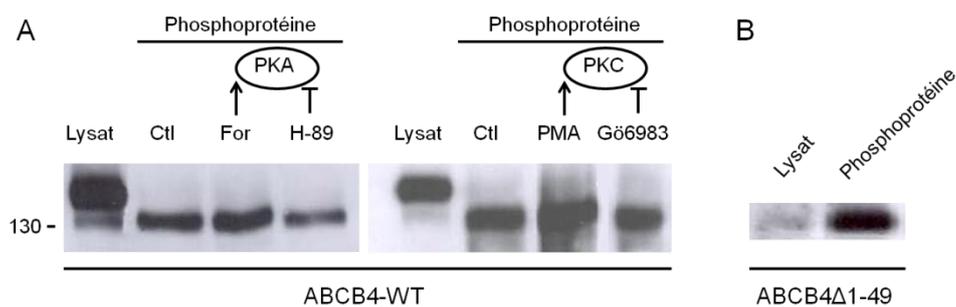


Figure 47 : Phospho-purification d'ABCB4 et effets de modulateurs de PKA et PKC. Le passage d'ABCB4 dans une colonne de chromatographie d'affinité pour les protéines phosphorylées retient uniquement la forme immature. 2.5 mg de protéines sont filtrés à travers une colonne. Après élution, les protéines retenues par la colonne sont concentrées et déposées sur gel pour migration en SDS-PAGE. L'immuno-empreinte est obtenue avec l'anticorps P3-II26. Lysat : 40 μ g de protéines, soit 1.6 % du total déposé sur la colonne. (A) La quantité d'ABCB4-WT retenue varie avec la modulation des protéines kinases. Les cellules MDCK sont cultivées à confluence et traitées 1 h ou non avec de la forskoline (For, 10 μ M), du H-89 (10 μ M), du PMA (10 nM) ou du Gö6983 (10 μ M). \uparrow : active, \downarrow : inhibe. (B) ABCB4 Δ 1-49 est retenu par la colonne.

Ces résultats n'informent pas de la phosphorylation du domaine N-terminal mais donnent des informations sur la phosphorylation d'ABCB4 dans son intégralité. La phosphorylation de la forme immature suggère que cette modification peut jouer un rôle dans le trafic intracellulaire d'ABCB4.

Les thréonines 34 et 44 sont susceptibles d'être phosphorylées par la PKA. Afin d'étudier la phosphorylation potentielle des sérines et des thréonines du domaine N-terminal, des peptides recombinants des 58 premiers acides aminés du domaine N-terminal fusionnés à la GST ont

été réalisés. Les mutations S26A, S27A, T34M, T36A, T44A et S49A y ont été reportées. Après purification et clivage de la GST par la thrombine, les peptides sont phosphorylés *in vitro*. La phosphorylation du peptide N-terminal WT par la PKA montre deux pics à + 80 et + 160 Da à l'analyse spectrométrique, ce qui suggère la présence d'au moins deux sites de phosphorylation. La phosphorylation par la PKA des différents peptides mutants montre une diminution du nombre de pics avec les peptides T34M et T44A, ce qui suggère que les thréonines T34 et T44 sont phosphorylées (figure 48). Les autres peptides analysés après phosphorylation par la PKA ne montrent pas de différences significatives avec le peptide WT (résultats non montrés).

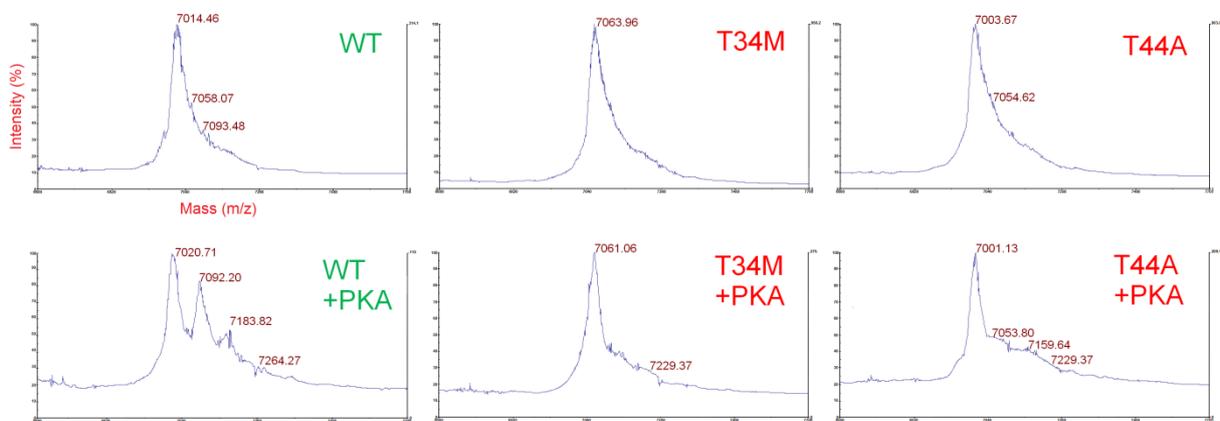


Figure 48 : Phosphorylation *in vitro* par la PKA des peptides N-terminaux WT, T34M et T44A. Les peptides du domaine N-terminal portant les mutations sont phosphorylés et analysés par spectrométrie de masse.

Les mutations pathologiques T34M et R47G n'affectent pas l'expression, la localisation et la stabilité d'ABCB4. Les résultats précédents montrent que les thréonines T34, T44 et la sérine S49 sont potentiellement impliquées dans des régulations de trafic ou de maturation d'ABCB4. Les mutations T34M et R47G ont été identifiées chez des patients atteints d'un syndrome LPAC. L'arginine R47G est entourée par la thréonine T44 et la sérine S49. Sa substitution en glycine pourrait modifier un site consensus de phosphorylation. Pour étudier l'effet de ces mutations, les cellules MDCK sont transfectées de façon stable avec ABCB4-T34M et ABCB4-R47G. Les analyses par immuno-empainte montrent une maturation normale pour chacun des deux mutants (figure 49A). En immunofluorescence, le mutant T34M est exprimé à la membrane apicale comme la protéine sauvage (figures 45B, 45C et 49B). En revanche, la localisation du mutant R47G est plus diffuse dans la cellule avec une

présence apicale moins marquée. Les études de stabilité ne montrent pas de différences significatives entre les mutants T34M et R47G et la protéine sauvage (figure 49C).

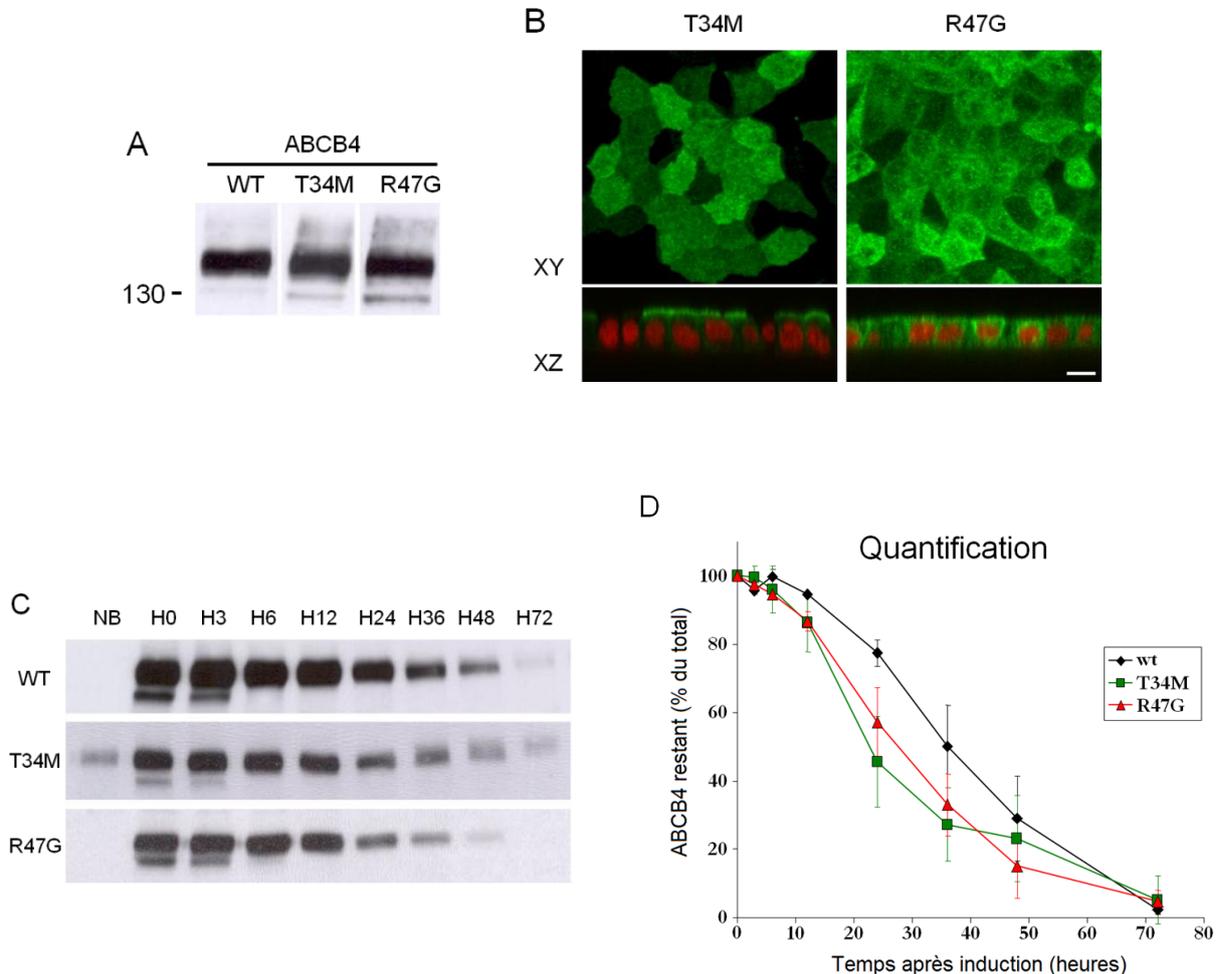
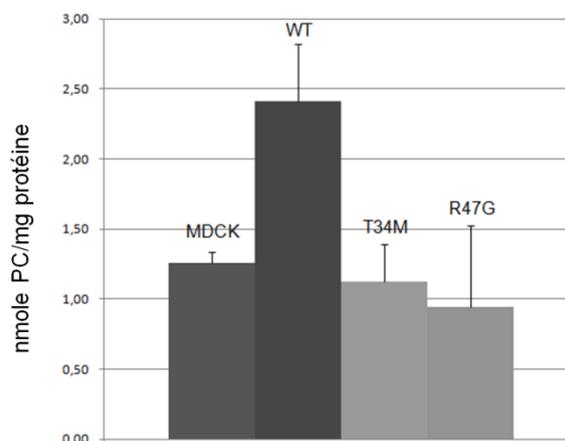


Figure 49 : Expression, localisation et stabilité d'ABCB4-WT, ABCB4-T34M et ABCB4-R47G dans les cellules MDCK. Les cellules MDCK sont transfectées de façon stable avec ABCB4 et les mutants T34M ou R47G. (A) Expression des deux mutants comparée avec celle du WT. Clones isolés exprimant ABCB4 sans stimulation par le butyrate de sodium. 15 μ g de protéines sont déposés sur gel pour une migration SDS-PAGE. L'immuno-empreinte est obtenue avec l'anticorps P3-II26. (B) Les cellules sont fixées avec le mélange méthanol/acétone (4/1) et immunomarquées par l'anticorps P3-II26. En vert ABCB4, en rouge les noyaux marqués à l'iodure de propidium. Barre 10 μ m. (C et D) Stabilité d'ABCB4. Les cellules exprimant ABCB4 sont traitées au butyrate de sodium pendant 16 h. La cinétique de décroissance commence à t(h)=0 au moment où le butyrate de sodium est retiré. NB : cellules non traitées au butyrate de sodium. La quantification d'ABCB4 restant au cours du temps est réalisée avec ImageJ. Le niveau d'ABCB4 est exprimé en pourcentage à partir de t(h)=0. Moyenne de trois expériences indépendantes.

Pour comprendre le phénotype pathologique lié à ces mutations, l'analyse de l'activité est étudiée.

Les mutations pathologiques T34M et R47G affectent l'activité du transporteur. L'activité d'excrétion de la PC par les cellules MDCK exprimant ABCB4 est mesurée après 24 h d'incubation dans le milieu de culture DMEM supplémenté en BSA et en taurocholate de sodium. Le dosage consiste à mesurer la choline libérée par hydrolyse enzymatique de la PC grâce à un réactif fluorescent. Les cellules exprimant ABCB4-WT secrètent significativement plus de PC que les cellules non transfectées, soit environ 2.5 nmol de PC par mg de protéine (figure 50). En revanche, les mutants ABCB4-T34M et ABCB4-R47G sont inactifs car la quantité de PC mesurée dans le milieu de culture est similaire à celle des cellules MDCK non transfectées.

Figure 50 : Dosage de la PC excrétée par ABCB4 et les mutants T34M et R47G. Les cellules MDCK sont transfectées de façon stable avec ABCB4-WT, ABCB4-T34M et ABCB4-R47G. Elles sont isolées et clonées pour obtenir des populations homogènes capables d'exprimer de façon importante le transgène sans stimulation par le butyrate de sodium. Les cellules sont cultivées à confluence pendant 48 h dans des plaques 6 puits. Le milieu est remplacé par le milieu de dosage composé de DMEM additionné de 0.02 % de BSA (*faty acid free*) et de 0.5 mM de taurocholate de sodium. Après 24 h d'incubation, la PC est dosée par fluorométrie.



Ces résultats montrent que le domaine N-terminal joue un rôle dans l'activité d'ABCB4 et que les mutations identifiées chez les patients sont effectivement à l'origine d'un défaut d'activité de sécrétion de PC.

-DISCUSSION-

Très peu de travaux dans la littérature ont été consacrés à l'étude du transporteur ABCB4. Les études réalisées au cours de cette thèse ont permis d'établir une corrélation entre une mutation identifiée chez un patient et le défaut qu'elle engendre, et d'ouvrir des perspectives de traitement pharmacologique ciblé. La seconde partie du travail, consacrée à l'étude du rôle du domaine N-terminal d'ABCB4, apporte des éléments nouveaux concernant les mécanismes de biosynthèse et de transport d'ABCB4 vers la membrane des canalicules biliaires ainsi que la régulation de son activité.

La mutation I541F entraîne un défaut de repliement du domaine NBD1

La mutation I541F avait été rapportée chez un enfant homozygote diagnostiqué pour une PFIC3 (Jacquemin et al. 2001). Les études immunohistochimiques n'avaient pas permis de détecter la protéine dans le foie. En reproduisant la mutation dans des modèles cellulaires, aussi bien dans les cellules MDCK que dans les cellules HepG2, nous avons pu montrer que cette mutation entraîne un défaut de repliement de la protéine qui est retenue dans le RE et n'atteint pas la membrane plasmique. La mutation a le même effet lorsqu'elle est reproduite dans le transporteur ABCB1 dont le domaine NBD1 est presque complètement identique à celui d'ABCB4. Le mutant I541F est plus sensible à la dégradation par des protéases *in vitro*, ce qui montre qu'il a un défaut conformationnel et qu'il expose des sites de coupure protéolytique. Dans la cellule, le mutant est dégradé par le protéasome, ce qui explique probablement que, dans le foie du patient, la protéine n'est pas détectée. Une autre mutation située à quelques acides aminés de distance, la mutation A546D, responsable d'une ICP chez une patiente hétérozygote, a été étudiée après avoir été reproduite dans ABCB1 (Dixon et al. 2000). De façon indirecte, les auteurs ont conclu à un défaut de trafic de ce mutant, ce qui suggère que cette mutation pourrait, elle aussi, entraîner un défaut de repliement. La rétention dans le RE est une des conséquences les plus fréquentes des mutations ponctuelles. Le mutant CFTR Δ F508 est un exemple de mutant retenu dans le RE qui a fait l'objet de nombreuses études. Les mutants G238V, D482G, G932R, R1153C ou R1286Q du transporteur ABCB11/BSEP, à l'origine d'une PFIC2, sont eux aussi retenus dans le RE (Wang et al. 2008). Le défaut de localisation de ces transporteurs mutants reste le facteur principal de pathogénicité.

La mutation I541F est située dans le premier domaine NBD. La structure tridimensionnelle du domaine NBD est très importante puisqu'elle doit permettre la fixation de l'ATP. Cependant, le défaut de repliement engendré par la mutation ne semble pas affecter la fixation de l'ATP puisque ABCB1 muté est actif. De façon étonnante, la maturation des mutants peut être plus ou moins touchée en fonction du domaine structural concerné. Dans le cas de CFTR, les mutations localisées dans le NBD1 sont plus sensibles que leurs homologues situées dans le NBD2 (Gregory et al. 1991). En effet, parmi quinze mutations (faux-sens ou délétion) dans le NBD1, seulement trois aboutissent à une protéine mature. Au contraire dans le NBD2, parmi treize mutations identifiées, seulement une provoque une rétention (Kopito 1999). Lorsqu'on regarde la localisation des mutations pathologiques d'ABCB4, on voit nettement que la majorité d'entre elles se situe dans le NBD1 (cf figure 31). Ce phénomène suggère que le processus de contrôle qualité est plus tolérant aux mutations situées dans le NBD2 que dans le NBD1. L'extrémité C-terminale étant synthétisée en dernier, il est possible que le NBD2 soit soumis moins longtemps au contrôle qualité. La position C-terminale aussi peut donner l'avantage d'avoir une extrémité « libre » donc limitant les zones de torsion liées à une mutation.

Nous avons montré que la rétention peut être levée en abaissant la température de culture. A 27°C, la protéine mutée quitte le RE, poursuit sa maturation et gagne la membrane plasmique. Cet effet, initialement montré pour le mutant CFTR Δ F508 (Denning et al. 1992), est souvent observé dans le cas de mutants présentant un défaut conformationnel. Le mécanisme de restauration du trafic provoqué par l'abaissement de la température est mal connu. Une des hypothèses est qu'il pourrait ralentir le processus de repliement et laisser ainsi plus de possibilités à la protéine pour se replier correctement. Cette idée reste discutable car l'effet est réversible : la remise à 37°C du mutant après son sauvetage à 27°C provoque de nouveau sa dégradation rapide, signe d'un problème persistant. La faible température pourrait aussi modifier la fluidité des bicouches lipidiques et les rendre plus tolérantes vis-à-vis d'un défaut de conformation d'une protéine transmembranaire. Enfin, l'affinité des chaperonnes pour le mutant pourrait être diminuée, ce qui permettrait l'échappement du mutant au contrôle qualité.

Les expériences menées à 27°C ont permis de montrer non seulement que l'abaissement de la température rétablissait le trafic vers la membrane plasmique mais aussi que le transporteur ABCB1 muté était actif. Ce point est capital dans la mesure où chercher à rétablir le trafic d'un mutant n'a pas d'intérêt s'il n'a pas d'activité. Pouvoir rétablir la

maturation, le transport et la stabilité d'un mutant actif est un défi pour le traitement de nombreuses maladies génétiques.

La modulation de la calnexine et d'Hsc/Hsp70 ne permet pas de rétablir le trafic du mutant I541F

Les mécanismes de contrôle qualité au niveau du réticulum endoplasmique étant impliqués dans la reconnaissance des protéines mal repliées, ils constituent une cible privilégiée afin d'améliorer le repliement de la protéine mutante, ou bien de lui permettre d'échapper au mécanisme de rétention/dégradation.

La calnexine est une des chaperonnes qui a été la plus ciblée (Okiyoneda et al. 2004, Norez et al. 2006). Une des hypothèses est que la calnexine séquestre le mutant dans le RE et l'empêche ainsi de poursuivre sa maturation vers l'appareil de Golgi. Cependant, nous avons observé que la diminution d'expression de la calnexine par des ARN interférents ne permet pas au mutant de sortir du RE. La diminution de la quantité de calnexine entraîne même l'accumulation de la forme immature d'ABCB1-WT, ce qui suggère que la calnexine favorise le repliement et la maturation de la protéine. De la même manière, l'utilisation de la thapsigargine ou de la curcumine (des inhibiteurs des canaux calcium du RE et donc indirectement de l'activité calcium-dépendante de la calnexine) ne restaure pas la maturation des mutants ABCB1-I541F ou ABCB4-I541F, en accord avec des résultats déjà obtenus pour des mutants d'ABCB1 et de CFTR retenus dans le RE (Loo et al. 2004).

Une autre chaperonne très ciblée est Hsc70, une chaperonne cytosolique qui interagit avec les domaines NBDs (Loo and Clarke 1995). Son interaction préférentielle avec le mutant par rapport à la protéine normale est largement démontrée. En fonction des co-chaperonnes avec lesquelles Hsc70 s'associe, elle peut avoir une action favorisant le repliement ou au contraire une action favorisant le ciblage de la protéine-substrat vers la dégradation par le protéasome. Nous avons surexprimé Hsp70 (l'homologue inductible de Hsc70) par différents moyens en espérant favoriser le repliement, mais l'induction d'Hsp70 n'a pas eu d'effet sur la maturation d'ABCB1-I541F. Il aurait pu être intéressant de réprimer Hsc/Hsp70, ce qui pourrait ralentir la dégradation du mutant en diminuant la formation des complexes Hsc70/ubiquitine-ligase et ainsi favoriser l'échappement au contrôle qualité. Le 4-phénylbutyrate (4-PB) diminue l'expression de Hsc70 dans des cellules épithéliales bronchiques (IB3-1) et favorise la maturation de CFTR Δ F508 (Rubenstein and Zeitlin 2000). Dans le cas des mutants ABCB1-I541F et ABCB4-I541F, nous n'avons pas observé d'effet

du 4-PB sur la maturation de ces mutants, mais nous n'avons pas non plus observé de changements significatifs dans l'expression de Hsc70 au niveau protéique. Bien que la modulation de la calnexine ou de Hsc/Hsp 70 n'ait pas eu d'effet sur les mutants ABCB1/ABCB4-I541F, il s'agit d'une piste qui pourrait être intéressante, à condition de mieux connaître les spécificités et le mode d'action des différentes chaperonnes et co-chaperonnes intervenant dans le repliement d'ABCB4. Par exemple, Aha1, une co-chaperonne d'Hsp90, régule négativement la maturation de CFTR. Son inhibition favorise le repliement et la maturation du mutant CFTR Δ F508 (Wang et al. 2006a).

Les chaperonnes pharmacologiques sont une voie prometteuse pour rétablir le trafic du mutant I541F

De petits osmolytes, tels que le glycérol ou le DMSO, sont connus pour stabiliser la conformation native de plusieurs protéines contre la dénaturation thermique ou chimique. Le glycérol s'est révélé très efficace pour favoriser le repliement de CFTR Δ F508 (Sato et al. 1996). Dans nos expériences, le mutant ABCB1-I541F a été assez bien restauré par le glycérol, mais l'efficacité du glycérol a été moins importante dans le cas du mutant ABCB4-I541F. Le DMSO n'a pas montré d'effet.

Ces molécules permettent de tester la possibilité de restaurer la maturation et le trafic d'une protéine mal conformée, mais ne peuvent pas être utilisées comme traitement chez les patients. D'autres molécules, qualifiées de chaperonnes pharmacologiques, peuvent avoir le même effet. De nombreux substrats et inhibiteurs d'ABCB1 sont bien connus et disponibles. La forte homologie entre ABCB1 et ABCB4 permet de penser que si certaines molécules sont actives sur les mutants d'ABCB1-I541F, elles pourraient l'être aussi sur les mutants d'ABCB4. Nous avons testé des substrats (digoxine, daunorubicine, paclitaxel, vinblastine) et des inhibiteurs (vérapamil, cyclosporine A) d'ABCB1 sur des cellules MDCK ou HepG2 exprimant le mutant ABCB1-I541F et ABCB4-I541F. Seule la cyclosporine A (CsA) a permis de restaurer pleinement, et de façon dose-dépendante, la maturation d'ABCB1-I541F. L'effet, bien que moins important, est néanmoins significatif pour ABCB4-I541F. La CsA semble agir comme une chaperonne spécifique qui interagit directement avec la protéine mal repliée en lui permettant d'adopter une conformation plus proche de la conformation native, et d'échapper ainsi au contrôle qualité. Nous avons observé que la CsA augmente la stabilité du mutant ABCB1-I541F à la membrane plasmique. L'augmentation de stabilité est moins bien détectée dans le cas d'ABCB4-I541F, sans doute à cause de l'efficacité moindre de la CsA.

La CsA est un inhibiteur d'ABC1 (Foxwell et al. 1989, Nooter et al. 1990). De ce fait, son intérêt pharmaceutique peut être limité si l'expression membranaire de la protéine est restaurée, mais qu'elle est inactivée. Il était donc important de tester l'activité d'ABC1-I541F après restauration de son trafic par la CsA. Nos résultats montrent que l'inhibition est relativement limitée car l'activité d'ABC1-I541F est bien restaurée jusqu'à une certaine concentration de CsA. Bien que la CsA montre une efficacité modérée pour restaurer le mutant ABC1-I541F, elle reste une piste intéressante à explorer.

Isolée à l'origine à partir du champignon *Tolypocladium inflatum*, la CsA est largement connue pour ces propriétés immunosuppressives lors des greffes d'organes. Elle fait partie de la famille des cyclosporines qui compte près d'une trentaine de représentants naturels (CsA à CsZ). Les cyclosporines ont une formule chimique de base $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ et font environ 1,2 kDa. Ce sont des peptides cycliques de 11 acides aminés, neutres et très hydrophobes, avec 7 liaisons peptidiques N-méthylées et portant certains acides aminés non usuels dans leur structure (Bmt/(4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4-méthyl-L-threonine, L-Abu/ α -amino-n-butyric acid et D-Ala) (figure 51).

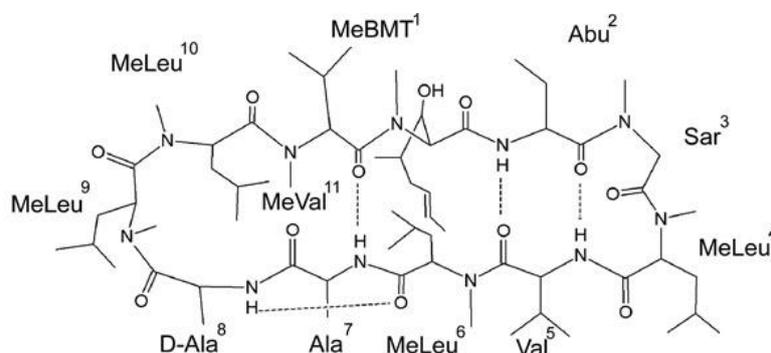


Figure 51 : Structure moléculaire de la cyclosporine A ou cyclo-[MeBmt(1)-Abu(2)-MeGly(3)-MeLeu(4)-Val(5)-MeLeu(6)-Ala(7)-D-Ala(8)-MeLeu(9)-MeLeu(10)-MeVal(11)].

Les cyclosporines diffèrent principalement par leur séquence en acides aminés. Il existe plusieurs dizaines de dérivés de la CsA d'origine synthétique ou semi-synthétique qui peuvent incorporer des résidus amino-acides modifiés (Balakrishnan and Pandey 1996). Certaines cyclosporines ont perdu leurs propriétés immunosuppressives, comme la cyclosporine H (Twentyman 1988, Gelfand, Cheung and Mills 1987) ou sont moins néphrotoxiques que la CsA, comme la CsG (Henry et al. 1995). Leur propriété inhibitrice d'ABC1 est variable (Loor et al. 2002), ce qui suggère que leur affinité pour ABC1 peut

être différente. Certaines pourraient avoir plus d'affinité pour ABCB4 et être plus efficaces sur le repliement d'ABCB4-I541F tout en ne provoquant pas son inactivation. Les nombreux dérivés et analogues structuraux de la CsA sont donc des médicaments potentiels pour traiter la PFIC3 par des moyens pharmacologiques. Il conviendra d'identifier les plus efficaces et les moins toxiques.

Le domaine N-terminal d'ABCB4 est nécessaire à sa sortie du réticulum endoplasmique

De nombreux travaux ont eu pour objectif de comprendre l'implication des différents domaines des transporteurs ABC dans leur fonction. ABCB1 a été particulièrement étudié en raison de son rôle dans la résistance aux drogues des cellules cancéreuses. Dans un certain nombre de travaux, des chimères ont été réalisées entre ABCB1 et ABCB4, afin d'identifier les séquences et les acides aminés importants pour l'activité d'ABCB1 et la sélectivité des substrats (Buschman and Gros 1991, Currier et al. 1992, Zhou, Gottesman and Pastan 1999). Cependant, peu d'attention a été portée au domaine N-terminal. Pourtant ce domaine est très différent dans les deux transporteurs et doit donc jouer un rôle spécifique.

Pour étudier le rôle du domaine N-terminal, nous avons commencé par effectuer des délétions progressives. Les résultats montrent que lorsque les 49 premiers acides aminés, sur les 54 que comporte cette région, sont enlevés, ABCB4 est retenu dans le RE sous forme immature. Contrairement au mutant I541F, l'abaissement de la température ne permet pas de restaurer la maturation et l'expression apicale d'ABCB4 Δ 1-49, ce qui suggère qu'il ne s'agit pas d'un défaut de repliement. De la même façon, la délétion de la partie amino-terminale de CFTR entraîne une absence de maturation de la protéine et un défaut de trafic vers la surface cellulaire (Prince et al. 1999). Des mutations ponctuelles dans ce domaine diminuent fortement la maturation de CFTR et/ou sa stabilité à la membrane (Jurkuvenaite et al. 2006). Il a été montré que des protéines de la machinerie de trafic membranaire appartenant à la famille des SNAREs, en particulier SNAP23 et la syntaxine 1A, interagissent directement avec le domaine N-terminal de CFTR (Cormet-Boyaka et al. 2002). Une autre protéine, la filamine, se lie aussi au domaine N-terminal de CFTR et permet sa stabilisation à la membrane en le reliant au cytosquelette d'actine (Thelin et al. 2007). Dans le cas d'ABCB4, la région riche en lysine, chargée positivement, pourrait être une région d'interaction avec d'autres protéines nécessaires à sa sortie du RE.

Une autre caractéristique importante du domaine N-terminal d'ABCB4 est qu'il comporte de nombreuses sérines et thréonine situées dans des sites consensus de phosphorylation. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle qui peut intervenir à de nombreux niveaux de la régulation d'une protéine. Nos résultats montrent qu'ABCB4 est phosphorylé car il est retenu dans des colonnes de purification des phosphoprotéines. De façon étonnante, seule la forme immature est phosphorylée. Ce résultat suggère que la sortie du RE est associée à une déphosphorylation. Cependant les études de l'état de phosphorylation d'ABCB4 montrent que la protéine est phosphorylée dans des régions autres que le domaine N-terminal puisque le mutant ABCB4 Δ 1-49 est aussi phosphorylé. Dans le cas d'ABCB1, il a été montré que c'est la région « *linker* », située après le premier domaine NBD, qui est phosphorylée au niveau de plusieurs sérines (Orr et al. 1993, Chambers et al. 1994). ABCB4 pourrait être également phosphorylée au niveau de cette région.

Afin de savoir si la phosphorylation du domaine N-terminal d'ABCB4 joue un rôle dans son trafic, nous avons muté les sérines et thréonines situées entre les acides aminés 21 et 49. La mutation individuelle des sérines et thréonines 26, 27, 34, 36, 44 et 49 en un acide aminé non chargé ne provoque pas de rétention dans le RE et la protéine mutée est exprimée à la membrane apicale. En revanche, la mutation de la sérine 49 en acide aspartique provoque une rétention dans le RE très semblable à la rétention provoquée par la délétion des acides aminés 1-49 ou 28-38. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation de la sérine 49 pourrait participer aux mécanismes de sortie/rétention dans le RE.

Le domaine N-terminal d'ABCB4 joue un rôle dans la fonction de transport de PC

La thréonine 34 a été mutée en méthionine car cette mutation a été identifiée chez des patients présentant un LPAC. Le tableau en annexe 4 montre que l'arginine 47 est aussi mutée chez des patients, en glycine ou en glutamine. L'étude des mutations T34M et R47G montre qu'elles ne provoquent pas de rétention dans le RE. En revanche, elles provoquent une diminution, voire une absence de sécrétion de phosphatidylcholine, traduisant un défaut d'activité d'ABCB4. Ces résultats sont en accord avec les études immuno-histologiques menées sur des biopsies de patients qui montrent que les mutations T34M et R47G ne changent pas la localisation d'ABCB4 à la membrane des canalicules biliaires (Dominique Wendum, Hôpital Saint-Antoine, résultats non publiés).

La mutation de la thréonine 34 annule la possibilité qu'elle soit phosphorylée. La mutation de l'arginine 47 pourrait influencer la phosphorylation de la thréonine 44 ou de la sérine 49 par la PKA et/ou la PKC, dont les sites consensus requièrent la présence de lysines ou d'arginines (Kennelly and Krebs 1991). En utilisant des peptides recombinants, nous avons montré que le domaine N-terminal d'ABCB4 était phosphorylable *in vitro* par la PKA et que la mutation des thréonines 34 et 44 diminuait la phosphorylation. Ces études de phosphorylation *in vitro* devront être confirmées et élargies à l'étude des autres sérines et thréonines et à d'autres kinases, en particulier la PKC. Elles suggèrent que l'activité d'ABCB4 pourrait être régulée au niveau du domaine N-terminal par la phosphorylation/déphosphorylation de plusieurs sérines ou thréonines.

Le domaine N-terminal s'avère donc être une zone complexe, impliquée à la fois dans la sortie du RE et dans l'activité d'ABCB4. De façon étonnante, le trafic et l'activité semblent dépendre d'acides aminés communs ou en tout cas voisins. Les mécanismes pourraient faire intervenir l'interaction avec des partenaires et seraient régulés par des modulations de charges. La régulation conjointe de la sortie du RE et de l'activité pourrait être un moyen de s'assurer que la protéine reste inactive lorsqu'elle se trouve dans le RE. En effet, une translocation active de PC du côté luminal serait probablement délétère pour l'intégrité de la membrane du RE.

-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES-

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis de montrer que les mutations identifiées chez des patients sont effectivement à l'origine d'un défaut d'ABCB4. C'est ainsi que la mutation I541F entraîne un problème de repliement, un défaut de transport et la dégradation prématurée de la protéine, tandis que les mutations T34M et R47G entraînent un défaut d'activité. Il est intéressant de noter que la mutation I541F, responsable d'une PFIC3, n'a pas le même effet sur le transporteur que les mutations T34M et R47G associées à un syndrome LPAC. Un plus grand nombre de mutations devra être étudié afin d'établir plus précisément une corrélation entre le génotype des patients, le phénotype moléculaire et la pathologie.

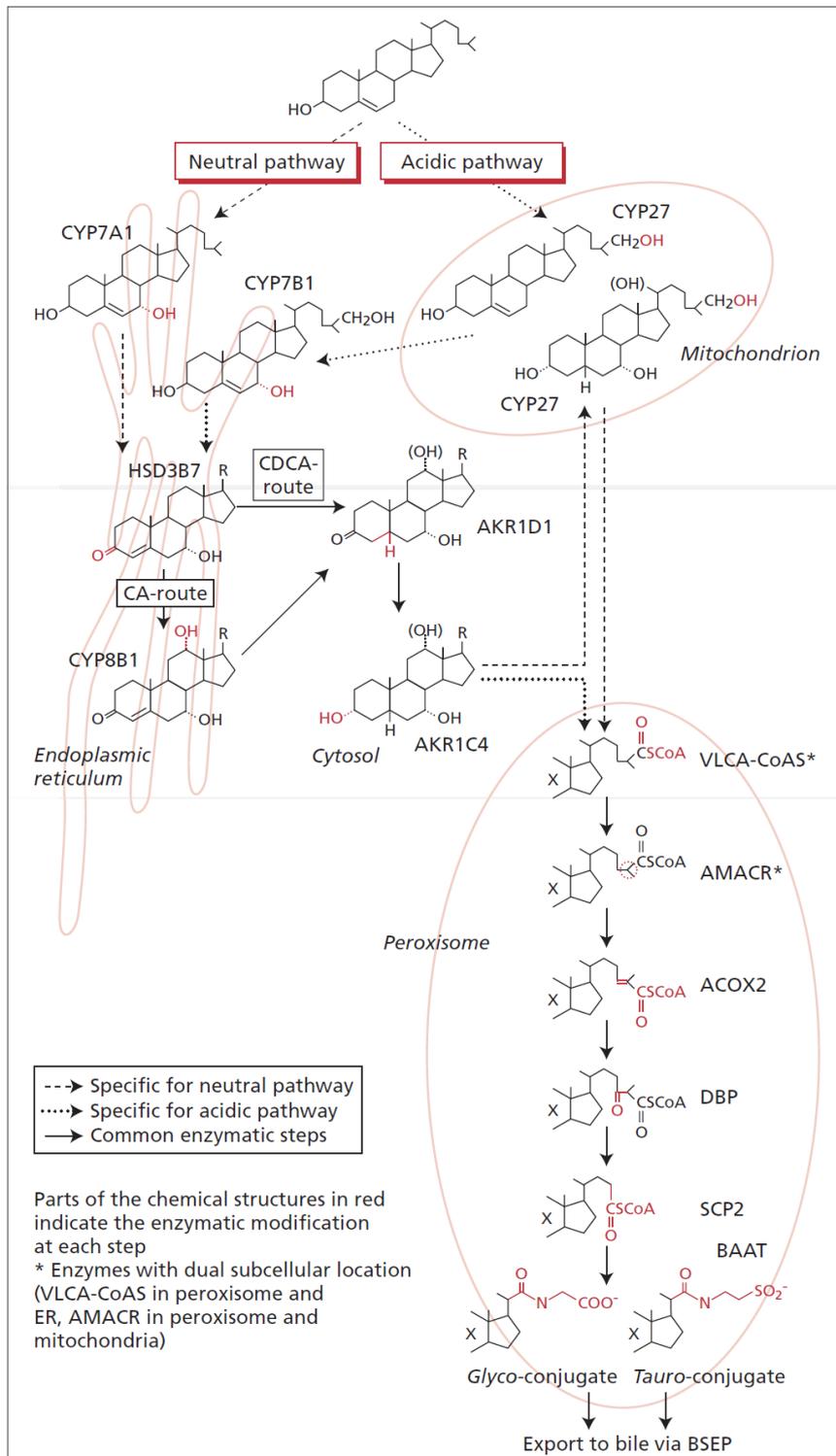
Une avancée majeure de ces travaux est la perspective de traiter la PFIC3 par des moyens pharmacologiques, dans les cas où la mutation entraîne un défaut conformationnel. Une restauration partielle de l'expression d'ABCB4 fonctionnel à la membrane apicale pourrait être suffisante pour éviter ou retarder la transplantation hépatique. La cyclosporine A ou des dérivés sont des traitements envisageables. Néanmoins, il faudra vérifier chez l'animal que le mutant restauré est actif et que la sécrétion de PC est suffisante pour améliorer le phénotype clinique. La réalisation d'un criblage à haut débit de milliers de composés disponibles dans les diverses chimiothèques existantes pourrait mener à la découverte de nouvelles molécules plus efficaces et sans danger.

L'étude du domaine N-terminal a montré que ce domaine est particulièrement important, à la fois pour la sortie du RE et pour l'activité d'ABCB4. L'implication d'une région chargée suggère que cette région est un site de fixation d'autres molécules dont l'identification permettrait de comprendre quels sont les mécanismes de sortie du RE et comment se fait le transport de la PC. Les peptides recombinants seront très utiles pour identifier de tels partenaires pour ensuite préciser leur rôle, en étudiant l'effet de leur surexpression ou de leur invalidation. La phosphorylation des sérines et thréonines devra être étudiée plus complètement afin de préciser quelles sont celles qui sont effectivement phosphorylées *in vivo* et comment la phosphorylation ou l'absence de phosphorylation module l'interaction avec ces partenaires.

Les molécules ainsi identifiées pourraient constituer de nouvelles cibles thérapeutiques. Il est intéressant de rappeler que dans un nombre non négligeable de cas de

PFIC3 ou de syndrome LPAC, aucune mutation d'ABCB4 n'a été identifiée. Des mutations de molécules qui régulent le trafic ou l'activité d'ABCB4 pourraient être à l'origine des PFIC3 ou syndrome LPAC inexpliqués.

Annexe 1. : Biosynthèse des acides biliaires (Jansen and Faber 2007).



Annexe 2. : Les transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire

A

Abbreviation	Function
Basolateral membrane (sinusoidal)	
NTCP/SLC10A1 ¹	Takes up BAs
OATP/SLC21A ¹	Takes up BAs and OA ⁻ and exports BAs, GSH, HCO ₃ ⁻
MRP3/ABCC3	Export OA ⁻ conjugates, GSH
MRP4/ABCC4	Export BAs, GSH
OSTa /OSTb	Organic solute transporter: Exports BAs
NBC4c/SLC4A5 ¹	Na ⁺ -HCO ₃ ⁻ symporter, acid extruder
NHE1/SLC9A1 ¹	Na ⁺ /H ⁺ exchanger, acid extruder
SK2	Potassium channel, potassium efflux
SLC12A2	Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ symporter: Sodium, potassium, chloride uptake
Apical membrane (canalicular)	
BSEP/ABCB11 ¹ , formerly SPGE	Bile salt export pump
MRP2/ABCC2 ¹ , formerly cMOAT	Export non BAs OA ⁻ , GSH
MDR1	Efflux of lipophilic cations
MDR3/ABCB4	Phospholipid flipase
ABCG5/ABCG8	Export sterols
AE2/SLC4A2 ¹	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ anion exchanger: Acid loader
Cl ⁻ channel ¹	Export chloride
AQP8 ¹	Water channel
NHE3/SLC9A3 ¹	Na ⁺ /H ⁺ exchanger: Acid extruder

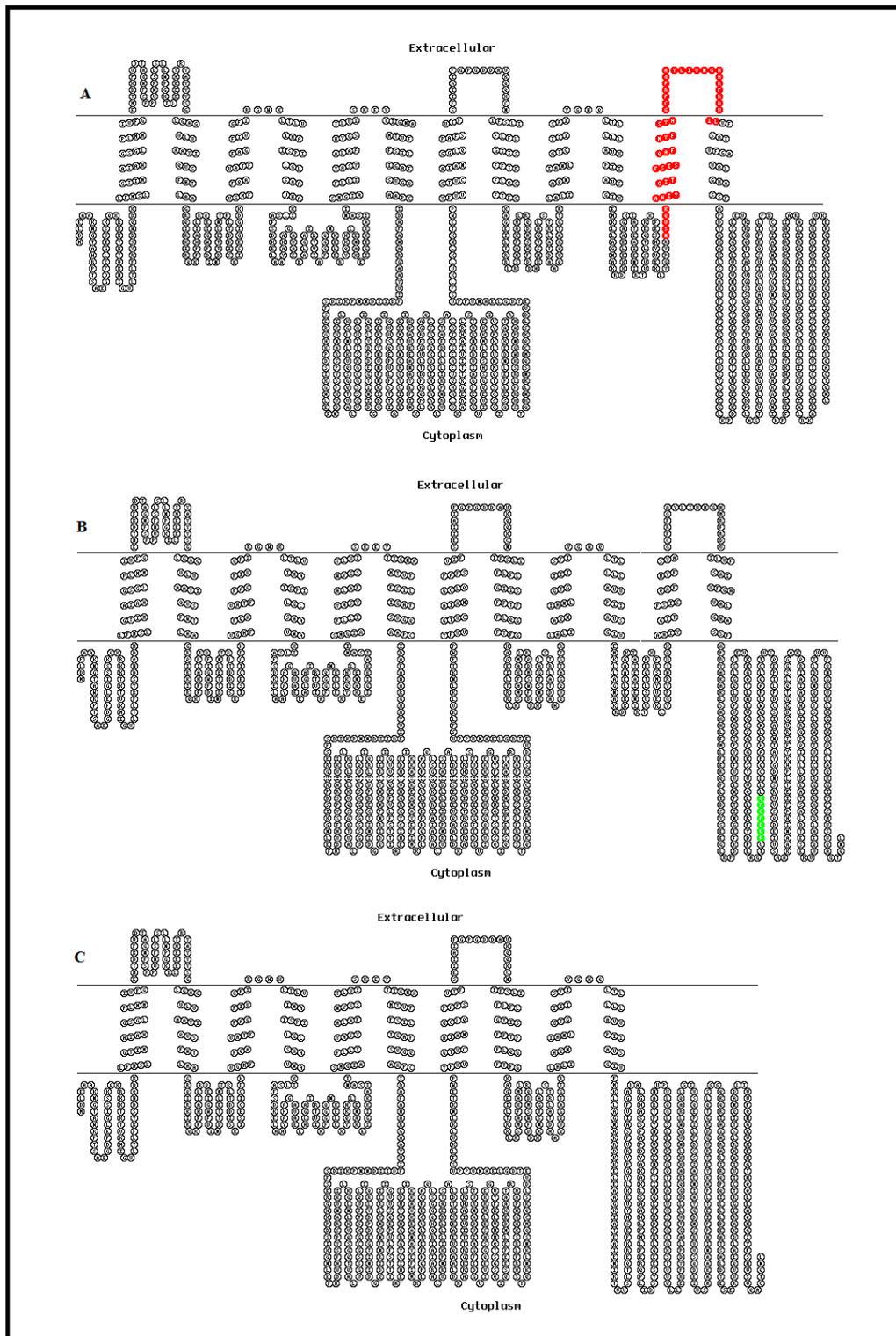
B

Abbreviation	Function
Basolateral membrane	
NDCBE/SLC4A8 ¹	Na ⁺ -dependent Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ exchanger: Import HCO ₃ ⁻ and Na ⁺ , Export H ⁺ and Cl ⁻
NHE/SLC9 ¹	Na ⁺ /H ⁺ exchanger: Acid extruder
AQP4 ¹	Water channel
tASBT/SLC10A2	Export BAs and Na ⁺
SK2	Potassium channel, potassium efflux
SLC12A2	Import Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻
MRP3/ABCC3	Export OA ⁻ conjugates, GSH
MRP4/ABCC4	Export BAs, GSH
Apical membrane	
AE2/SLC4A2 ¹	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ anion exchanger: Acid loader
CFTR ¹	Cl ⁻ channel: Export chloride
AQP1 ¹	Water channel
NBCe/NBC4/SLC4A5	Na ⁺ -HCO ₃ ⁻ symporter: Acid extruder
ASBT/SLC10A2	BAs-Na ⁺ , symport: Uptake of BAs and Na ⁺

¹Transporters relevant to bile flow under physiological basal conditions.

Les transporteurs localisés à la membrane des hépatocytes (A), et les transporteurs localisés à la membrane des cholangiocytes (B) (Esteller 2008).

Annexe 3. : Les isoformes A, B et C d'ABCB4



En rouge, la séquence disparut de l'isoforme C et en vert la séquence supplémentaire de l'isoforme B. Les domaines transmembranaires sont prédits par le logiciel *SACS HMMTOP prediction* de G.E. Tusnady et I. Simon. L'organisation membranaire est réalisée sur *TOPO2* : <http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py>.

Annexe 4. : Les mutations identifiées d'ABCBA

Exon	Nucleotide	Protéine	Domaine	Statut	Mutation associée	Phénotype	Référence	position
Exon 2	c.67-68insAC	L23HfsX16	N-ter	He C	S27GfsX (?)	PFIC3	Kubitz 2011	23
Exon 2	c.79A>G	S27GfsX (?)	N-ter	Ho		PFIC3	Jacquemin 2001	27
Exon 2	c.79A>G	S27GfsX (?)	N-ter	He		LPAC	V. Barbu (N.P.)	27
Exon 2	c.79A>G	S27GfsX (?)	N-ter	He C	L23HfsX16	PFIC3	Kubitz 2011	27
Exon 3	c.100delA	T34RfsX4	N-ter			ICP et autre	V. Barbu (N.P.)	34
Exon 3	c.101insA	T34NfsX20	N-ter			LPAC	V. Barbu (N.P.)	34
Exon 3	c.101C>T	T34M	N-ter	He		LPAC	V. Barbu (N.P.)	34
Exon 4	c.139C>G	R47G	N-ter			LPAC/LV	V. Barbu (N.P.)	47
Exon 4	c.140G>A	R47Q	N-ter				V. Barbu (N.P.)	47
Exon 4	c.139C>T	R47X	N-ter	He		LPAC	V. Barbu (N.P.)	47
Exon 4	c.139C>T	R47X	N-ter	He		autre	Ziol 2008	47
Exon 4	c.139C>G	R47G	N-ter	He C	R406Q	LPAC	Poupon 2010	47
Exon 4	c.140G>A	R47Q	N-ter	He C		LPAC	Davit-Spraul 2010	47
Exon 4	c.153G>A	W51X	N-ter			LPAC	V. Barbu (N.P.)	51
Exon 4	c.202G>A	G68R	TM1			LV	V. Barbu (N.P.)	68
Exon 4	c.208G>C	G70R	TM1	He C	+R590Q ; S320F	PFIC3	Colombo 2011	70
Exon 4	c.212T>A	L71H	TM1	He		LPAC	V. Barbu (N.P.)	71
Exon 4	c.217C>G	L73V	TM1	He		LPAC	V. Barbu (N.P.)	73
Exon 4	c.217C>G	L73V	TM1			PFIC3	Colombo 2011	73
Exon 4	c.233T>G	F78C	TM1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	78
Exon 5 à 9	c.287-1005del	95-335delfsX?	TM1	Ho		PFIC3	Chen HL 2001	95
Exon 5	c.296C>T	S99F	EC1	He		LPAC	V. Barbu (N.P.)	99
Exon 5	c.300G>T	L100F	EC1	He		LPAC	V. Barbu (N.P.)	100
Exon 6	c.354T>A	Y118X	EC1				V. Barbu (N.P.)	118
Exon 6	c.366-370del	G122GfsX28	EC1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	122
Exon 6	c.370G>A	G124S	TM2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	124
Exon 6	c.377G>A	G126E	TM2	He C	A511T	PFIC3	Degiorgio 2007	126
Exon 6	c.394-400del	132YfsX	TM2	Ho		PFIC3	Jacquemin 2001	132
Exon 6	c.394-400del	132delfsX29	TM2	Ho		PFIC3	De Vree 1998	132
Exon 6	c.412T>C	W138R	TM2	He		PFIC3	Jacquemin 2001	138
Exon 6	c.462C>T	R144X	IC1	He		ICP	Bacq 2009	144
Exon 6	c.435G>C	Q145H	IC1			ICP et autre	V. Barbu (N.P.)	145
Exon 6	c.434A>G	Q145R	IC1			LV	V. Barbu (N.P.)	145
Exon 6	c.449G>A	R150K	IC1	He		ICP	Müllenbach 2003	150
Exon 6	c.461T>C	F154S	IC1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	154
Exon 6	c.467C>A	A156D	IC1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	156
Exon 6	c.475C>T	R159X	IC1	He		PFIC3	Degiorgio 2007	159
Exon 6	c.495T>A	F165I	IC1	He		LPAC	Rosmorduc 2003	165
Exon 6	c.502A>G	N168D	IC1	He C		PFIC3	Davit-Spraul 2010	168
Exon 6	c.523A>G	T175A	IC1	He C	F357L+T775M	PFIC3	Degiorgio 2007	175
Exon 6	c.523A>G	T175A	IC1	He		LPAC	Rosmorduc 2003	175
Exon 6	c.523A>G	T175A	IC1	He		autre	Ziol 2008	175
Exon 6	c.526C>T	R176W	IC1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	176
Exon 6	c.526C>T	R176W	IC1	Ho		PFIC3	Davit-Spraul 2010	176
Exon 7	c.537-613del	179fsX?	TM3	He		HL	Kano M 2004	179
Exon 8	c.713delT	L238PfsX8	IC2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	238
Exon 8	c.716C>G	S239L	IC2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	239
Exon 8	c.748G>C	A250P	IC2	He C	+M630V ; E888X	PFIC3	Degiorgio 2007	250
Exon 8	c.763G>A	V255M	IC2			LV	V. Barbu (N.P.)	255
Exon 8	c.808G>A	G270R	IC2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	270
Exon 9	c.837T>A	Y279X	IC2	He C	S320F	PFIC3	Degiorgio 2007	279
Exon 9	c.838C>T	Q280X	IC2			ICP et autre	V. Barbu (N.P.)	280
Exon 9	c.857C>T	A286V	IC2	He C	S320F	PFIC3	Degiorgio 2007	286
Exon 9	c.857C>T	A286V	IC2	He		LPAC	Poupon 2010	287
Exon 9	c.902T>C	M301T	TM5	He		LPAC	Rosmorduc 2003	301
Exon 9	c.937-992del	A313MfsX72	TM5	He C	R595X	PFIC3	Giovannoni 2011	313
Exon 10	c.1015del	314fs	TM6	He		HL	Kano M 2004	314
Exon 10	c.959C>T	S320F	TM5	He C	Y279X ou A286V	PFIC3	Degiorgio 2007	320
Exon 10	c.959C>T	S320F	TM5	Ho		LPAC	Rosmorduc 2003	320
Exon 10	c.959C>T	S320F	TM5	Ho		ICP	Pauli-Magnus 2004	320
Exon 10	c.959C>T	S320F	TM5	He		ICP	Bacq 2009	320
Exon 10	c.1007-1015delT	341fsX	TM6	He		LPAC	Rosmorduc 2003	341

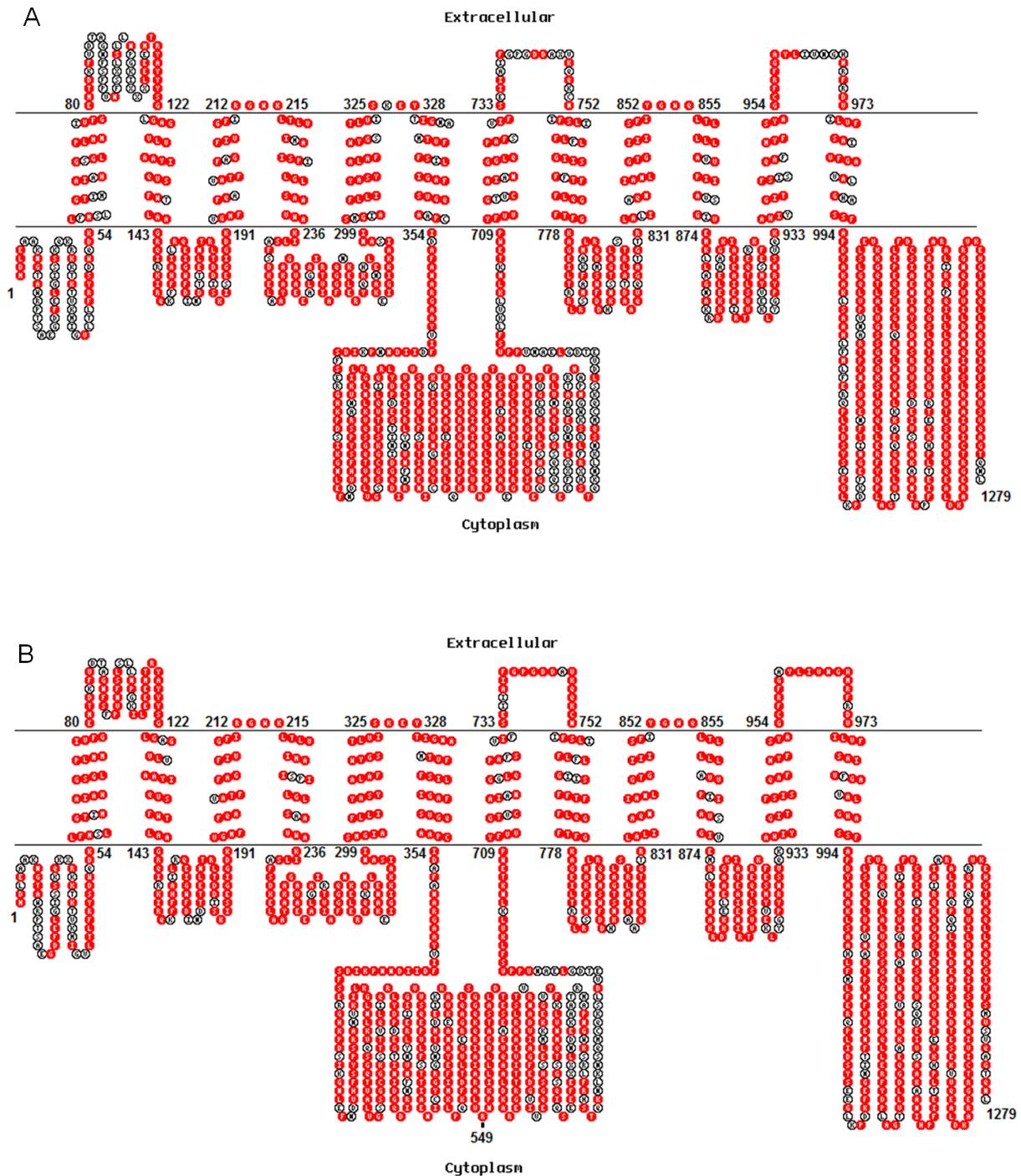
Exon 10	c.1006-1016delT	341fsX	TM6			LPAC	Rosmorduc 2007	341
Exon 10	c.1037G>T	S346I	TM6	Ho		PFIC3	Jacquemin 2001	346
Exon 10	c.1037G>T	S346I	TM6	Ho		PFIC3	Keitel 2005	346
Exon 10	c.1007-1015insT	355fsX	TM6	He		LPAC	Rosmorduc 2003	355
Exon 10	c.1006-1016insT	355fsX	TM6			LPAC	Rosmorduc 2007	355
Exon 10	c.1069T>C	F357L	TM6	He C	+T775M ; T175A	PFIC3	Degiorgio 2007	357
Exon 10	c.1072G>C	A358P	NBD1	He C		PFIC3	Davit-Spraul 2010	358
Exon 10	c.1091C>T	A364V	NBD1	He C	A737V	PFIC3	Degiorgio 2007	364
Exon 10	c.1102T>A	F368I	NBD1	He		ICP	Hardikar 2009	368
Exon 11	c.1135_1136insAA	S379KfsX413	NBD1	He C	L701P	PFIC3	Degiorgio 2007	379
Exon 11	c.1150G>A	G384R	NBD1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	384
Exon 11	c.1150G>A	G384R	NBD1	He		LPAC	Poupon 2010	384
Exon 11	c.1184A>G	E395G	NBD1	Ho		PFIC3	Jacquemin 2001	395
Exon 11	c.1207T>C	Y403H	NBD1	Ho		PFIC3	Degiorgio 2007	403
Exon 11	c.1217G>A	R406Q	NBD1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	406
Exon 11	c.1217G>A	R406Q	NBD1	He C	R47G	LPAC	Poupon 2010	406
Exon 12	c.1270A>G	T424A	NBD1	He		PFIC3	Jacquemin 2001	424
Exon 12	c.1275G>A	V425M	NBD1	He		PFIC3	Jacquemin 2001	425
Exon 12	c.1313C>G	T438R	NBD1			LV	V. Barbu (N.P.)	438
Exon 12	c.1333C>G	L445V	NBD1	He C		LPAC	Davit-Spraul 2010	445
Exon 12	c.1327insA	447fsX	NBD1	He		LPAC	Rosmorduc 2003	447
Exon 13	c.1399-1400ins10	Y467FfsX25	NBD1	He		LPAC	Nakken 2009	467
Exon 13	c.1415T>C	I472T	NBD1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	472
Exon 13	c.1420delG	V474WfsX2	NBD1				V. Barbu (N.P.)	474
Exon 13	c.1424T>C	V475A	NBD1	He C	A840D	PFIC3	Degiorgio 2007	475
Exon 13	c.1436C>T	P479L	NBD1	Ho		PFIC3	Davit-Spraul 2010	479
Exon 13	c.1493C>T	T498I	NBD1			autre	V. Barbu (N.P.)	498
Exon 13	c.1529A>G	N510S	NBD1	He C	P726L (Jacq. , N.P.)	PFIC3/ICP	Davit-Spraul 2010	510
Exon 13	c.1531G>A	A511T	NBD1	He C	G126E	PFIC3	Degiorgio 2007	511
Exon 13	c.1537G>A	E513K	NBD1	He		LPAC	Davit-Spraul 2010	513
Exon 13	c.1553delT	L518YfsX15	NBD1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	518
Exon 13	c.1555C>G	P519A	NBD1			LV	V. Barbu (N.P.)	519
Exon 14	c.1576G>T	V526F	NBD1	He		autre	Ziol 2008	526
Exon 14	c.1576G>T	V526F	NBD1	He		LPAC	Poupon 2010	526
Exon 14	c.1584G>C	E528D	NBD1	He		LPAC	Rosmorduc 2003	528
Exon 14	c.1584G>C	E528D	NBD1	He		ICP	Floreani 2008	528
Exon 14	c.1604G>A	G535D	NBD1	He		ICP et autre	Lucena 2003	535
Exon 14	c.1606G>A	G536R	NBD1	He		ICP	Floreani 2008	536
Exon 14	c.1615G>A	A539T	NBD1	He		autre	Ziol 2008	539
Exon 14	c.1621A>T	I541F	NBD1	Ho		PFIC3	Jacquemin 2001	541
Exon 14	c.1624G>A	A542T	NBD1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	542
Exon 14	c.1633C>G	R545G	NBD1	He		autre	Ziol 2008	545
Exon 14	c.1637C>A	A546D	NBD1	He		ICP	Dixon 2000	546
Exon 14	c.1646G>A	R549H	NBD1	He		ICP	Floreani 2008	549
Exon 14	c.1667T>G	L556R	NBD1	Ho		PFIC3	Jacquemin 2001	556
Exon 14	c.1672G>A	E558K	NBD1	He C	G723E + A1193T	PFIC3	Degiorgio 2007	558
Exon 14	c.1675G>A	A559T	NBD1	He		LPAC	Ziol 2008	559
Exon 14	c.1691A>G	D564G	NBD1	He		PFIC3	Jacquemin 2001	564
Exon 14	c.1712delT	V571DfsX15	NBD1	Ho		PFIC3	Jacquemin 2001	571
Exon 14	c.1712delT	V571DfsX15	NBD1	Ho		PFIC3	Jacquemin 1999	571
Exon 14	c.1712delT	V571DfsX15	NBD1	He		ICP	Jacquemin 1999	571
Exon 15	c.1741G>T	G581Q	NBD1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	581
Exon 15	c.1744C>T	R582W	NBD1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	582
Exon 15	c.1762G>A	A588T	NBD1				V. Barbu (N.P.)	588
Exon 15	c.1765C>T	H589Y	NBD1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	589
Exon 15	c.1769G>A	R590Q	NBD1	He C	+G762X ; P726T	PFIC3	Degiorgio 2007	590
Exon 15	c.1769G>A	R590Q	NBD1	He		autre	Ziol 2008	590
Exon 15	c.1769G>A	R590Q	NBD1	He		ICP	Floreani 2008	590
Exon 15	c.1769G>A	R590Q	NBD1	He		ICP	Bacq 2009	590
Exon 15	c.1768C>T	R590X	NBD1	He		LPAC	Davit-Spraul 2010	590
Exon 15	c.1772T>A	L591Q	NBD1	Ho		LPAC	Rosmorduc 2003	591
Exon 15	c.1777A>G	T593A	NBD1	He		PFIC3	Degiorgio 2007	593
Exon 15	c.1781T>A	V594D	NBD1			LPAC	V. Barbu (N.P.)	594
Exon 15	c.1783C>T	R595X	NBD1	Ho		PFIC3	Giovannoni 2011	595
Exon 15	c.1783C>T	R595X	NBD1	He C	A313MfsX72	PFIC3	Giovannoni 2011	595
Exon 15	c.1783C>T	R595X	NBD1	Ho		PFIC3	Davit-Spraul 2010	595
Exon 15	c.1864G>A	G622R	NBD1				V. Barbu (N.P.)	622
Exon 15	c.1888A>G	M630V	NBD1	He C	+A250P ; E888X	PFIC3	Degiorgio 2007	630

Exon 16	c.1906C>T	Q636X	NBD1	Ho		PFIC3	Jacquemin 2001	636
Exon 16	c.1954A>G	R652G	NBD1	He		ICP	Floreani 2008	652
Exon 16	c.1973G>A	W658X	NBD1	He		LPAC	Rosmorduc 2003	658
Exon 16	c.2000C>T	T667I	NBD1	He		ICP	Floreani 2008	667
Exon 17	c.2102T>C	L701P	Linker region	He C	S379KfsX413	PFIC3	Degiorgio 2007	701
Exon 17	c.2132T>C	F711S	TM7	He		PFIC3	Jacquemin 2001	711
Exon 17	c.2144C>T	T715I	TM7	He		PFIC3	Degiorgio 2007	715
Exon 17	c.2168G>A	G723E	TM7	He C	+ A1193T ; E558K	PFIC3	Degiorgio 2007	723
Exon 17	c.2169_2170insG	L724AfsX744	TM7	Ho		PFIC3	Degiorgio 2007	724
Exon 17	c.2176C>A	P726T	TM7	He C	R590Q + G762X	PFIC3	Degiorgio 2007	726
Exon 17	c.2177C>T	P726L	TM7	He C		PFIC3	Davit-Spraul 2010	726
Exon 17	c.2186C>T	S729L	TM7			LPAC	V. Barbu (N.P.)	729
Exon 17	c.2210C>T	A737V	EC4	He C	A364V	PFIC3	Degiorgio 2007	737
Exon 18	c.2212A>C	I738L	EC4	He		autre	Ziol 2008	738
Exon 18	c.2270-2273insT	757fsX37	IC4	He		LPAC	Rosmorduc 2003	757
Exon 18	c.2274insT	F758FfsX35	TM8			LPAC	V. Barbu (N.P.)	758
Exon 18	c.2284G>T	G762X	TM8	He C	+R590Q ; P726T	PFIC3	Degiorgio 2007	762
Exon 18	c.2285G>A	G762E	TM8	He		ICP	Pauli-Magnus 2004	762
Exon 18	c.2302-2305del	T768FfsX25	TM8			LPAC	V. Barbu (N.P.)	768
Exon 19	c.2317G>C	G773R	TM8	He C		LPAC	Davit-Spraul 2010	773
Exon 19	c.2324C>T	T775M	TM8	He C	+F357L ; T175A	PFIC3	Degiorgio 2007	775
Exon 19	c.2324C>T	T775M	TM8	He		ICP	Bacq 2009	775
Exon 19	c.2324C>T	T775M	TM8	He C	A946T	LPAC	Poupon 2010	775
Exon 19	c.2363G>T	R788E	IC4	He		LPAC	Rosmorduc 2003	788
Exon 19	c.2362C>T	R788W	IC4			ductopénie	Gotthardt 2008	788
Exon 20	c.2405G>A	W802X	IC4			LPAC	V. Barbu (N.P.)	802
Exon 21	c.2485G>A	G829R	IC4			LPAC	V. Barbu (N.P.)	829
Exon 21	c.2519C>A	A840D	TM9	He C	V475A	PFIC3	Degiorgio 2007	840
Exon 21	c.2564A>T	Q855L	EC5	Ho		PFIC3	Davit-Spraul 2010	855
Exon 21	c.2577G>T	L859F	TM10			ICP et autre	V. Barbu (N.P.)	859
Exon 21	c.2576T>G	L859W	TM10	He C		LPAC	Davit-Spraul 2010	859
Exon 21	c.2655insA	A885EfsX1	IC5			LV	V. Barbu (N.P.)	885
Exon 21	c.2662G>T	E888X	IC5	He C	A250P+M630V	PFIC3	Degiorgio 2007	888
Exon 22 à 23	c.2683-2924del	894-975delfs?	TM11	He		HL	Kano M 2004	894
Exon 23	c.2800G>T	A934T	TM11	Ho		LPAC	Rosmorduc 2003	934
Exon 23	c.2800G>T	A934T	TM11	He		autre	Ziol 2008	934
Exon 23	c.2800G>A	A934T	TM11	He		LPAC	Poupon 2010	934
Exon 23	c.2836G>A	A946T	TM11	He C	T775M	LPAC	Poupon 2010	946
Exon 23	c.2858C>A	A953D	TM11			LPAC	V. Barbu (N.P.)	953
Exon 23	c.2858C>A	A953D	TM11	Ho		PFIC3	Keitel 2005	953
Exon 23	c.2860G>A	G954S	EC6	Ho		PFIC3	Degiorgio 2007	954
Exon 23	c.2869C>T	R957X	EC6	Ho		PFIC3	De Vree 1998	957
Exon 23	c.2869C>T	R957X	EC6	He		ICP	Muehlenberg 2008	957
Exon 24	c.2975-2984 del	981VfsX	TM12	He C	G983S	PFIC3	Jacquemin 2001	981
Exon 24	c.2947G>A	G983S	TM12	He C	981VfsX	PFIC3	Jacquemin 2001	983
Exon 25	c.3136C>T	R1046X	NBD2	He		LPAC	Nakken 2009	1046
Exon 25	c.3187C>T	Q1063X	NBD2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	1063
Exon 25	c.3203T>A	V1068E	NBD2	He		LPAC	Denk 2010	1068
Exon 25	c.3215G>T	G1072V	NBD2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	1072
Exon 25	c.3227G>A	S1076N	NBD2	He		ICP	Kubitz 2011	1076
Exon 25	c.3226A>T	S1076C	NBD2	Ho		PFIC3	Davit-Spraul 2010	1076
Exon 25	c.3240delG	Q1080HfsX65	NBD2				V. Barbu (N.P.)	1080
Exon 25	c.3250C>T	R1084Y	NBD2				V. Barbu (N.P.)	1084
Exon 25	c.3258C>A	Y1086X	NBD2				V. Barbu (N.P.)	1086
Exon 25	c.3258C>A	Y1086X	NBD2	He		LPAC	Poupon 2010	1086
Exon 26	c.3296A>G	E1099G	NBD2				V. Barbu (N.P.)	1099
Exon 26	c.3328G>C	A1110P	NBD2	Ho		PFIC3	Davit-Spraul 2010	1110
Exon 26	c.3349C>T	Q1117X	NBD2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	1117
Exon 26	c.3349C>T	Q1117X	NBD2	He		LPAC	Davit-Spraul 2010	1117
Exon 26	c.3394T>G	Y1132D	NBD2				V. Barbu (N.P.)	1132
Exon 26	c.3431T>C	I1144Y	NBD2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	1144
Exon 26	c.3481C>T	P1161S	NBD2	He		LPAC	Rosmorduc 2003	1161
Exon 26	c.3481C>T	P1161S	NBD2				V. Barbu (N.P.)	1161
Exon 27	c.3527C>T	S1176L	NBD2			LV	V. Barbu (N.P.)	1176
Exon 27	c.3541C>G	Q1181E	NBD2	He		PFIC3	Kubitz 2011	1181
Exon 27	c.3359C>T	R1187X	NBD2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	1187
Exon 27	c.3577G>A	A1193T	NBD2	He C	+G723E ; E558K	PFIC3	Degiorgio 2007	1193
Exon 27	c.3580C>T	Q1194X	NBD2			LV	V. Barbu (N.P.)	1194

Exon 27	c.3595G>A	D1199N	NBD2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	1199
Exon 27	c.3595G>A	D1199N	NBD2	He		ICP	<i>Davit-Spraul 2010</i>	1199
Exon 27	c.3599A>C	E1200A	NBD2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	1200
Exon 27	c.3599A>C	E1200A	NBD2	He		LPAC	<i>Davit-Spraul 2010</i>	1200
Exon 28	c.3676T>G	C1226G	NBD2			ICP et autre	V. Barbu (N.P.)	1226
Exon 28	c.3747-3748del	R1249SfsX31	NBD2			LPAC	V. Barbu (N.P.)	1249
Intron 21	G(+1)A			He		ICP	<i>Pauli-Magnus 2004</i>	
Intron 25	G(+5)C			He		ICP	<i>Pauli-Magnus 2004</i>	
Intron 25	C(-3)G			He		ICP	<i>Pauli-Magnus 2004</i>	
Intron 26	T(+2)A			He		ICP	<i>Pauli-Magnus 2004</i>	
Intron 26	c.3486+10insA					autre	V. Barbu (N.P.)	
Intron 26	c.3486+11insA					LPAC	V. Barbu (N.P.)	
Exon/Intron 3	c.80+3A>G					LPAC	V. Barbu (N.P.)	
Exon/Intron 3	c.286+1G>A	épissage		He		PFIC3/LPAC/ICP	<i>Kubitz 2011</i>	
Exon/Intron 8	c.833+2T>C					LPAC	V. Barbu (N.P.)	
	c.1005+5G>A					LPAC	V. Barbu (N.P.)	
Exon/Intron 24	c.3082-2A>C					autre	V. Barbu (N.P.)	
Exon/Intron 25	c.3339+2T>C					autre	V. Barbu (N.P.)	
Exon/Intron 26	c.3486+2T>C					autre	V. Barbu (N.P.)	

Tableau annexe 4: liste des mutations d'ABCB4. La nomenclature des exons est disponible sur la *Leiden Open Variation Database*. He : hétérozygote, Ho : homozygote, C : composite, « + » : touche un même allèle, PFIC3 : *Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type 3*, LPAC : *Low Phospholipid Associated Cholelithiasis*, LV : lithiase vésiculaire, HL : hépatolithiase biliaire, N-ter : domaine N-terminal, TM : segment transmembranaire, EC : boucle extracellulaire, IC : boucle intracellulaire, NBD : *Nucleotid Binding Domain*. Les mutations non publiées (N.P.) proviennent d'un travail réalisé par le Dr. Véronique Barbu et le Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires de l'Hôpital Saint-Antoine, sous l'autorité du Pr. Chantal Housset. Elles sont identifiées par le génotypage des patients du service du Pr. Raoul Poupon et du Pr. Olivier Chazouillères. D'après (Keitel et al. 2005, de Vree et al. 1998, Degiorgio et al. 2007, Zioli et al. 2008, Nakken et al. 2009, Pauli-Magnus et al. 2004, Bacq et al. 2009, Muehlenberg et al. 2008, Floreani et al. 2008, Jacquemin et al. 2001, Denk et al. 2010, Kano et al. 2004, Gotthardt et al. 2008, Lucena et al. 2003, Hardikar et al. 2009, Rosmorduc et al. 2003, Chen et al. 2001, Colombo et al. 2011, Kubitz et al. 2011, Rosmorduc and Poupon 2007, Poupon, Arrive and Rosmorduc 2010, Müllenbach et al. 2003, Davit-Spraul et al. 2010).

Annexe 5. : Les résidus d'ABCB4 conservés dans ABCB1 et chez quelques mammifères



(A) En rouge les résidus identiques entre ABCB4 et ABCB1, reportés sur ABCB4. (B) En rouge les résidus identiques des ABCB4 d'*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Cricetulus griseus* et *Monodelphis domestica*. L'alignement des séquences est réalisé par le logiciel *MULTALIN multiple alignment* : http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_multalin.html et les résidus conservés sont reportés sur ABCB4 humain (*TOPO2* : <http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py>).

-REFERENCES-

- Admirand, W. & D. Small (1968) The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest*, 47, 1043-52.
- Alberti, S., K. Böhse, V. Arndt, A. Schmitz & J. Höfeld (2004) The cochaperone HspBP1 inhibits the CHIP ubiquitin ligase and stimulates the maturation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell*, 15, 4003-10.
- Aller, S., J. Yu, A. Ward, Y. Weng, S. Chittaboina, R. Zhuo, P. Harrell, Y. Trinh, Q. Zhang, I. Urbatsch & G. Chang (2009) Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science*, 1718-1722.
- Alrefai, W. A. & R. K. Gill (2007) Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res*, 24, 1803-23.
- Alvaro, D., A. Cantafora, A. F. Attili, S. Ginanni Corradini, C. De Luca, G. Minervini, A. Di Biase & M. Angelico (1986) Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species. *Comp Biochem Physiol B*, 83, 551-4.
- Amaral, M. D. (2004) CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci*, 23, 41-8.
- Attard, G. S., R. H. Templer, W. S. Smith, A. N. Hunt & S. Jackowski (2000) Modulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by membrane curvature elastic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9032-6.
- Augustine, L. M., R. J. Markelewicz, K. Boekelheide & N. J. Cherrington (2005) Xenobiotic and endobiotic transporter mRNA expression in the blood-testis barrier. *Drug Metab Dispos*, 33, 182-9.
- Bacq, Y., C. Gendrot, F. Perrotin, L. Lefrou, S. Chrétien, V. Vie-Buret, M. C. Brechot & C. R. Andres (2009) ABCB4 gene mutations and single-nucleotide polymorphisms in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Med Genet*, 46, 711-5.
- Balakrishnan, K. & A. Pandey (1996) The panorama of cyclosporin research. *J Basic Microbiol*, 36, 121-47.
- Ballatori, N. & A. T. Truong (1992) Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J Physiol*, 263, G617-24.
- Bartles, J. R., H. M. Feracci, B. Stieger & A. L. Hubbard (1987) Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane in vivo: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J Cell Biol*, 105, 1241-51.
- Bell, P., L. Wang, G. Gao, M. E. Haskins, A. F. Tarantal, R. J. McCarter, Y. Zhu, H. Yu & J. M. Wilson (2011) Inverse zonation of hepatocyte transduction with AAV vectors between mice and non-human primates. *Mol Genet Metab*, 104, 395-403.
- Benharouga, M., M. Haardt, N. Kartner & G. L. Lukacs (2001) COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J Cell Biol*, 153, 957-70.
- Berkane, N., J. J. Cocheton, D. Brehier, P. Merviel, C. Wolf, G. Lefèvre & S. Uzan (2000) Ursodeoxycholic acid in intrahepatic cholestasis of pregnancy. A retrospective study of 19 cases. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 79, 941-6.
- Boberg, K. M. & E. Schrupf (1997) [Treatment of cholestatic liver diseases with ursodeoxycholic acid]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 117, 3370-3.
- Bomberger, J. M., R. L. Barnaby & B. A. Stanton (2009) The deubiquitinating enzyme USP10 regulates the post-endocytic sorting of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelial cells. *J Biol Chem*, 284, 18778-89.
- Borst, P., N. Zelcer & A. van Helvoort (2000) ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta*, 1486, 128-44.
- Brown, C. R., L. Q. Hong-Brown, J. Biwersi, A. S. Verkman & W. J. Welch (1996) Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones*, 1, 117-25.
- Buchberger, A., B. Bukau & T. Sommer (2010) Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol Cell*, 40, 238-52.
- Bull, L. N., M. J. van Eijk, L. Pawlikowska, J. A. DeYoung, J. A. Juijn, M. Liao, L. W. Klomp, N. Lomri, R. Berger, B. F. Scharschmidt, A. S. Knisely, R. H. Houwen & N. B. Freimer (1998) A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet*, 18, 219-24.
- Burke, J. F. & A. E. Mogg (1985) Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin. *Nucleic Acids Res*, 13, 6265-72.

- Buschman, E., R. J. Arceci, J. M. Croop, M. Che, I. M. Arias, D. E. Housman & P. Gros (1992) *mdr2* encodes P-glycoprotein expressed in the bile canalicular membrane as determined by isoform-specific antibodies. *J Biol Chem*, 267, 18093-9.
- Buschman, E. & P. Gros (1991) Functional analysis of chimeric genes obtained by exchanging homologous domains of the mouse *mdr1* and *mdr2* genes. *Mol Cell Biol*, 11, 595-603.
- Caramelo, J. J. & A. J. Parodi (2008) Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles. *J Biol Chem*, 283, 10221-5.
- Chambers, T. C., J. Pohl, D. B. Glass & J. F. Kuo (1994) Phosphorylation by protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase of synthetic peptides derived from the linker region of human P-glycoprotein. *Biochem J*, 299 (Pt 1), 309-15.
- Chan, W., G. Calderon, A. L. Swift, J. Moseley, S. Li, H. Hosoya, I. M. Arias & D. F. Ortiz (2005) Myosin II regulatory light chain is required for trafficking of bile salt export protein to the apical membrane in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, 280, 23741-7.
- Chang, G. & C. B. Roth (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*, 293, 1793-800.
- Chang, X. B., A. Mengos, Y. X. Hou, L. Cui, T. J. Jensen, A. Aleksandrov, J. R. Riordan & M. Gentsch (2008) Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator. *J Cell Sci*, 121, 2814-23.
- Check, E. (2002) A tragic setback. *Nature*, 420, 116-8.
- Chen, H. L., P. S. Chang, H. C. Hsu, J. H. Lee, Y. H. Ni, H. Y. Hsu, Y. M. Jeng & M. H. Chang (2001) Progressive familial intrahepatic cholestasis with high gamma-glutamyltranspeptidase levels in Taiwanese infants: role of MDR3 gene defect? *Pediatr Res*, 50, 50-5.
- Cheng, J., H. Wang & W. B. Guggino (2004) Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J Biol Chem*, 279, 1892-8.
- Cheng, S. H., R. J. Gregory, J. Marshall, S. Paul, D. W. Souza, G. A. White, C. R. O'Riordan & A. E. Smith (1990) Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell*, 63, 827-34.
- Chianale, J., V. Vollrath, A. M. Wielandt, L. Amigo, A. Rigotti, F. Nervi, S. Gonzalez, L. Andrade, M. Pizarro & L. Accatino (1996) Fibrates induce *mdr2* gene expression and biliary phospholipid secretion in the mouse. *Biochem J*, 314 (Pt 3), 781-6.
- Chin, J. E., R. Soffir, K. E. Noonan, K. Choi & I. B. Roninson (1989) Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. *Mol Cell Biol*, 9, 3808-20.
- Cho, H. J., H. Y. Gee, K. H. Baek, S. K. Ko, J. M. Park, H. Lee, N. D. Kim, M. G. Lee & I. Shin (2011) A Small Molecule That Binds to an ATPase Domain of Hsc70 Promotes Membrane Trafficking of Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *J Am Chem Soc*.
- Cohen, D. E. (1999) Hepatocellular transport and secretion of biliary lipids. *Curr Opin Lipidol*, 10, 295-302.
- Cole, L. K. & D. E. Vance (2010) A role for Sp1 in transcriptional regulation of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase in liver and 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 285, 11880-91.
- Coleman, R. (1987) Biochemistry of bile secretion. *Biochem J*, 244, 249-61.
- Colombo, C., P. Vajro, D. Degiorgio, D. A. Coviello, L. Costantino, L. Tornillo, V. Motta, D. Consonni, G. Maggiore & S. S. G. f. G. Cholestasis (2011) Clinical features and genotype-phenotype correlations in children with progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 related to ABCB4 mutations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 52, 73-83.
- Connell, P., C. A. Ballinger, J. Jiang, Y. Wu, L. J. Thompson, J. Höhfeld & C. Patterson (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol*, 3, 93-6.
- Cormet-Boyaka, E., A. Di, S. Y. Chang, A. P. Naren, A. Tousson, D. J. Nelson & K. L. Kirk (2002) CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 12477-82.
- Crawford, A. R., A. J. Smith, V. C. Hatch, R. P. Oude Elferink, P. Borst & J. M. Crawford (1997) Hepatic secretion of phospholipid vesicles in the mouse critically depends on *mdr2* or MDR3 P-glycoprotein expression. Visualization by electron microscopy. *J Clin Invest*, 100, 2562-7.
- Cui, Y. J., X. Cheng, Y. M. Weaver & C. D. Klaassen (2009) Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (*Mdr1a*, *Mdr1b*, *Mdr2*) in mice. *Drug Metab Dispos*, 37, 203-10.
- Culbertson, M. R. (1999) RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet*, 15, 74-80.
- Currier, S. J., S. E. Kane, M. C. Willingham, C. O. Cardarelli, I. Pastan & M. M. Gottesman (1992) Identification of residues in the first cytoplasmic loop of P-glycoprotein involved in the function of chimeric human MDR1-MDR2 transporters. *J Biol Chem*, 267, 25153-9.

- Davit-Spraul, A., E. Gonzales, C. Baussan & E. Jacquemin (2009) Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis*, 4, 1.
- (2010) The spectrum of liver diseases related to ABCB4 gene mutations: pathophysiology and clinical aspects. *Semin Liver Dis*, 30, 134-46.
- de Vree, J. M., E. Jacquemin, E. Sturm, D. Cresteil, P. J. Bosma, J. Aten, J. F. Deleuze, M. Desrochers, M. Burdelski, O. Bernard, R. P. Oude Elferink & M. Hadchouel (1998) Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 282-7.
- De Vree, J. M., R. Ottenhoff, P. J. Bosma, A. J. Smith, J. Aten & R. P. Oude Elferink (2000) Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology*, 119, 1720-30.
- Dean, M., A. Rzhetsky & R. Allikmets (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Research*, 1156-1166.
- Degiorgio, D., C. Colombo, M. Seia, L. Porcaro, L. Costantino, L. Zazzeron, D. Bordo & D. A. Coviello (2007) Molecular characterization and structural implications of 25 new ABCB4 mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3). *Eur J Hum Genet*, 15, 1230-8.
- Delaunay, J. L., A. M. Durand-Schneider, D. Delautier, A. Rada, J. Gautherot, E. Jacquemin, T. Ait-Slimane & M. Maurice (2009) A missense mutation in ABCB4 gene involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 leads to a folding defect that can be rescued by low temperature. *Hepatology*, 49, 1218-27.
- Deleuze, J. F., E. Jacquemin, C. Dubuisson, D. Cresteil, M. Dumont, S. Erlinger, O. Bernard & M. Hadchouel (1996) Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*, 23, 904-8.
- Denk, G. U., H. Bikker, R. H. Lekanne Dit Deprez, V. Terpstra, C. van der Loos, U. Beuers, C. Rust & T. Pusch (2010) ABCB4 deficiency: A family saga of early onset cholelithiasis, sclerosing cholangitis and cirrhosis and a novel mutation in the ABCB4 gene. *Hepatol Res*, 40, 937-41.
- Denning, G. M., M. P. Anderson, J. F. Amara, J. Marshall, A. E. Smith & M. J. Welsh (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature*, 358, 761-4.
- Dhir, R., E. Buschman & P. Gros (1990) Structural and functional characterization of the mouse multidrug resistance gene family. *Bull Cancer*, 77, 1125-9.
- Dijkers, A. & U. J. Tietge (2010) Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World J Gastroenterol*, 16, 5936-45.
- Diop, D., C. Chauvin & O. Jean-Jean (2007) Aminoglycosides and other factors promoting stop codon readthrough in human cells. *C R Biol*, 330, 71-9.
- Dixon, P. H., N. Weerasekera, K. J. Linton, O. Donaldson, J. Chambers, E. Egginton, J. Weaver, C. Nelson-Piercy, M. de Swiet, G. Warnes, E. Elias, C. F. Higgins, D. G. Johnston, M. I. McCarthy & C. Williamson (2000) Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet*, 9, 1209-17.
- Dombrowski, F., R. Kubitz, A. Chittattu, M. Wettstein, N. Saha & D. Häussinger (2000) Electron-microscopic demonstration of multidrug resistance protein 2 (Mrp2) retrieval from the canalicular membrane in response to hyperosmolarity and lipopolysaccharide. *Biochem J*, 348 Pt 1, 183-8.
- Dowling, R. (1973) The enterohepatic circulation of bile acids as they relate to lipid disorders. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)*, 5, 59-67.
- Egan, M. E., J. Glöckner-Pagel, C. Ambrose, P. A. Cahill, L. Pappoe, N. Balamuth, E. Cho, S. Canny, C. A. Wagner, J. Geibel & M. J. Caplan (2002) Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat Med*, 8, 485-92.
- Egan, M. E., M. Pearson, S. A. Weiner, V. Rajendran, D. Rubin, J. Glöckner-Pagel, S. Canny, K. Du, G. L. Lukacs & M. J. Caplan (2004) Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science*, 304, 600-2.
- Elferink, R. O. & A. K. Groen (2002) Genetic defects in hepatobiliary transport. *Biochim Biophys Acta*, 1586, 129-45.
- Ellgaard, L. & E. M. Frickel (2003) Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys*, 39, 223-47.
- Ellgaard, L. & A. Helenius (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 181-91.
- Esteller, A. (2008) Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol*, 14, 5641-9.
- Farinha, C. M., P. Nogueira, F. Mendes, D. Penque & M. D. Amaral (2002) The human DnaJ homologue (Hdj)-1/heat-shock protein (Hsp) 40 co-chaperone is required for the in vivo stabilization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by Hsp70. *Biochem J*, 366, 797-806.

- Fiorucci, S., C. Clerici, E. Antonelli, S. Orlandi, B. Goodwin, B. M. Sadeghpour, G. Sabatino, G. Russo, D. Castellani, T. M. Willson, M. Pruzanski, R. Pellicciari & A. Morelli (2005) Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther*, 313, 604-12.
- Flageul, M., D. Aubert, V. Pichard, T. H. Nguyen, A. Nowrouzi, M. Schmidt & N. Ferry (2009) Transient expression of genes delivered to newborn rat liver using recombinant adeno-associated virus 2/8 vectors. *J Gene Med*, 11, 689-96.
- Floreani, A., I. Carderi, D. Paternoster, G. Soardo, F. Azzaroli, W. Esposito, M. Montagnani, D. Marchesoni, A. Variola, E. Rosa Rizzotto, C. Braghin & G. Mazzella (2008) Hepatobiliary phospholipid transporter ABCB4, MDR3 gene variants in a large cohort of Italian women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Dig Liver Dis*, 40, 366-70.
- Flotte, T. R. & B. L. Laube (2001) Gene therapy in cystic fibrosis. *Chest*, 120, 124S-131S.
- Foxwell, B. M., A. Mackie, V. Ling & B. Ryffel (1989) Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein. *Mol Pharmacol*, 36, 543-6.
- Furukawa, T., K. Wakabayashi, A. Tamura, H. Nakagawa, Y. Morishima, Y. Osawa & T. Ishikawa (2009) Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharm Res*, 26, 469-79.
- Gao, M., H. R. Cui, D. W. Loe, C. E. Grant, K. C. Almquist, S. P. Cole & R. G. Deeley (2000) Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem*, 275, 13098-108.
- Gatmaitan, Z. C., A. T. Nies & I. M. Arias (1997) Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver. *Am J Physiol*, 272, G1041-9.
- Gautherot, J., A. M. Durand-Schneider, D. Delautier, J. L. Delaunay, A. Rada, J. Gabillet, C. Housset, M. Maurice & T. Aït-Slimane (2012) Effects of Cellular, Chemical, and Pharmacological Chaperones on the Rescue of a Trafficking-defective Mutant of the ATP-binding Cassette Transporter Proteins ABCB1/ABCB4. *J Biol Chem*, 287, 5070-8.
- Gelfand, E. W., R. K. Cheung & G. B. Mills (1987) The cyclosporins inhibit lymphocyte activation at more than one site. *J Immunol*, 138, 1115-20.
- Gelman, M. S., E. S. Kannegaard & R. R. Kopito (2002) A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 277, 11709-14.
- Germann, U. A. (1996) P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. *Eur J Cancer*, 32A, 927-44.
- Giovannoni, I., F. M. Santorelli, M. Candusso, M. Di Rocco, E. Bellacchio, F. Callea & P. Francalanci (2011) Two novel mutations in African and Asian children with progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Dig Liver Dis*, 43, 567-70.
- Glozman, R., T. Okiyoneda, C. M. Mulvihill, J. M. Rini, H. Barriere & G. L. Lukacs (2009) N-glycans are direct determinants of CFTR folding and stability in secretory and endocytic membrane traffic. *Journal of Cell Biology*, 184, 847-862.
- Goloubinoff, P. & P. De Los Rios (2007) The mechanism of Hsp70 chaperones: (entropic) pulling the models together. *Trends Biochem Sci*, 32, 372-80.
- Goodwin, B., S. A. Jones, R. R. Price, M. A. Watson, D. D. McKee, L. B. Moore, C. Galardi, J. G. Wilson, M. C. Lewis, M. E. Roth, P. R. Maloney, T. M. Willson & S. A. Kliewer (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*, 6, 517-26.
- Gotthardt, D., H. Runz, V. Keitel, C. Fischer, C. Flechtenmacher, M. Wirtenberger, K. H. Weiss, S. Imparato, A. Braun, K. Hemminki, W. Stremmel, F. Rüschemdorf, A. Stiehl, R. Kubitz, B. Burwinkel, P. Schirmacher, A. S. Knisely, J. Zschocke & P. Sauer (2008) A mutation in the canalicular phospholipid transporter gene, ABCB4, is associated with cholestasis, ductopenia, and cirrhosis in adults. *Hepatology*, 48, 1157-66.
- Gregory, R. J., D. P. Rich, S. H. Cheng, D. W. Souza, S. Paul, P. Manavalan, M. P. Anderson, M. J. Welsh & A. E. Smith (1991) Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide-binding domains 1 and 2. *Mol Cell Biol*, 11, 3886-93.
- Groen, A., M. R. Romero, C. Kunne, S. J. Hoosdally, P. H. Dixon, C. Wooding, C. Williamson, J. Seppen, K. van den Oever, K. S. Mok, C. C. Paulusma, K. J. Linton & R. P. Oude Elferink (2011) Complementary Functions of the Flippase ATP8B1 and the Floppase ABCB4 in Maintaining Canalicular Membrane Integrity. *Gastroenterology*, 141, 1927-1937.e4.
- Gros, P., Y. B. Ben Neriah, J. M. Croop & D. E. Housman (1986a) Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature*, 323, 728-31.
- Gros, P., J. Croop, I. Roninson, A. Varshavsky & D. E. Housman (1986b) Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 337-41.

- Gros, P., D. A. Fallows, J. M. Croop & D. E. Housman (1986c) Chromosome-mediated gene transfer of multidrug resistance. *Mol Cell Biol*, 6, 3785-90.
- Gros, P., M. Raymond, J. Bell & D. Housman (1988) Cloning and characterization of a second member of the mouse *mdr* gene family. *Mol Cell Biol*, 8, 2770-8.
- Grove, D. E., M. F. Rosser, R. L. Watkins & D. M. Cyr (2011) Analysis of CFTR folding and degradation in transiently transfected cells. *Methods Mol Biol*, 741, 219-32.
- Gupta, S., R. Todd Stravitz, W. M. Pandak, M. Müller, Z. Reno Vlahcevic & P. B. Hylemon (2000) Regulation of multidrug resistance 2 P-glycoprotein expression by bile salts in rats and in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology*, 32, 341-7.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J. L. Villeval, C. C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo & A. Fischer (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 348, 255-6.
- Hagey, L. R., D. L. Crombie, E. Espinosa, M. C. Carey, H. Igimi & A. F. Hofmann (1993) Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J Lipid Res*, 34, 1911-7.
- Hardikar, W., S. Kansal, R. P. Oude Elferink & P. Angus (2009) Intrahepatic cholestasis of pregnancy: when should you look further? *World J Gastroenterol*, 15, 1126-9.
- Hayashi, H., K. Inamura, K. Aida, S. Naoi, R. Horikawa, H. Nagasaka, T. Takatani, T. Fukushima, A. Hattori, T. Yabuki, I. Horii & Y. Sugiyama (2012) AP2 mediates BSEP internalization and modulates its hepatocanalicular expression and transport function. *Hepatology*.
- Hayashi, H. & Y. Sugiyama (2007) 4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps. *Hepatology*, 45, 1506-16.
- Hayashi, H., T. Takada, H. Suzuki, H. Akita & Y. Sugiyama (2005) Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology*, 41, 916-24.
- Hebert, D. N. & M. Molinari (2007) In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol Rev*, 87, 1377-408.
- Henry, M. L., E. A. Elkhmmas, E. A. Davies & R. M. Ferguson (1995) A clinical trial of cyclosporine G in cadaveric renal transplantation. *Pediatr Nephrol*, 9 Suppl, S49-51.
- Hershko, A. & A. Ciechanover (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67, 425-79.
- Heuman, D. M., Z. R. Vlahcevic, M. L. Bailey & P. B. Hylemon (1988) Regulation of bile acid synthesis. II. Effect of bile acid feeding on enzymes regulating hepatic cholesterol and bile acid synthesis in the rat. *Hepatology*, 8, 892-7.
- Holzbach, R. T., M. Marsh, M. Olszewski & K. Holan (1973) Cholesterol solubility in bile. Evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man. *J Clin Invest*, 52, 1467-79.
- Howard, M., R. A. Frizzell & D. M. Bedwell (1996) Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med*, 2, 467-9.
- Howard, M. T., B. H. Shirts, L. M. Petros, K. M. Flanigan, R. F. Gesteland & J. F. Atkins (2000) Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 48, 164-9.
- Huang, L., A. Zhao, J. L. Lew, T. Zhang, Y. Hrywna, J. R. Thompson, N. de Pedro, I. Royo, R. A. Blevins, F. Peláez, S. D. Wright & J. Cui (2003) Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem*, 278, 51085-90.
- Hughes, R. D., R. R. Mitry & A. Dhawan (2011) Current Status of Hepatocyte Transplantation. *Transplantation*.
- Ikebuchi, Y., T. Takada, K. Ito, T. Yoshikado, N. Anzai, Y. Kanai & H. Suzuki (2009) Receptor for activated C-kinase 1 regulates the cellular localization and function of ABCB4. *Hepatol Res*, 39, 1091-107.
- Invernizzi, P., A. L. Salzman, C. Szabó, I. Ueta, M. O'Connor & K. D. Setchell (1997) Ursodeoxycholate inhibits induction of NOS in human intestinal epithelial cells and in vivo. *Am J Physiol*, 273, G131-8.
- Jacquemin, E., D. Cresteil, S. Manouvrier, O. Boute & M. Hadchouel (1999) Heterozygous non-sense mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet*, 353, 210-1.
- Jacquemin, E., J. M. De Vree, D. Cresteil, E. M. Sokal, E. Sturm, M. Dumont, G. L. Scheffer, M. Paul, M. Burdelski, P. J. Bosma, O. Bernard, M. Hadchouel & R. P. Elferink (2001) The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology*, 120, 1448-58.
- Jacquemin, E. & M. Hadchouel (1999) Genetic basis of progressive familial intrahepatic cholestasis. *J Hepatol*, 31, 377-81.
- Jacquemin, E., D. Hermans, A. Myara, D. Habes, D. Debray, M. Hadchouel, E. M. Sokal & O. Bernard (1997) Ursodeoxycholic acid therapy in pediatric patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*, 25, 519-23.
- Janowski, B. A., P. J. Willy, T. R. Devi, J. R. Falck & D. J. Mangelsdorf (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, 383, 728-31.

- Jansen & Faber. 2007. *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice, 3rd Edition*. Juan Rodes, Jean-Pierre Benhamou, Andres Blei, Juerg Reichen, Mario Rizzetto.
- Jansen, P. L., S. S. Strautnieks, E. Jacquemin, M. Hadchouel, E. M. Sokal, G. J. Hooiveld, J. H. Koning, A. De Jager-Krikken, F. Kuipers, F. Stellaard, C. M. Bijleveld, A. Gouw, H. Van Goor, R. J. Thompson & M. Müller (1999) Hepatocanicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology*, 117, 1370-9.
- Jelinek, D. F., S. Andersson, C. A. Slaughter & D. W. Russell (1990) Cloning and regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase, the rate-limiting enzyme in bile acid biosynthesis. *J Biol Chem*, 265, 8190-7.
- Jenks, S. (2000) Gene therapy death--"everyone has to share in the guilt". *J Natl Cancer Inst*, 92, 98-100.
- Johnston, J. A., C. L. Ward & R. R. Kopito (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol*, 143, 1883-98.
- Juliano, R. L. & V. Ling (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, 455, 152-62.
- Jung, D., M. G. Elferink, F. Stellaard & G. M. Groothuis (2007) Analysis of bile acid-induced regulation of FXR target genes in human liver slices. *Liver Int*, 27, 137-44.
- Juranka, P. F., R. L. Zastawny & V. Ling (1989) P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J*, 3, 2583-92.
- Jurkuvenaite, A., K. Varga, K. Nowotarski, K. Kirk, E. Sorscher, Y. Li, J. Clancy, Z. Bebok & J. Collawn (2006) Mutations in the amino terminus of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhance endocytosis. *J Biol Chem*, 281, 3329-34.
- Kagawa, T., N. Watanabe, K. Mochizuki, A. Numari, Y. Ikeno, J. Itoh, H. Tanaka, I. Arias & T. Mine (2008) Phenotypic differences in PFIC2 and BRIC2 correlate with protein stability of mutant Bsep and impaired taurocholate secretion in MDCK II cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, G58-67.
- Kano, M., J. Shoda, R. Sumazaki, K. Oda, Y. Nimura & N. Tanaka (2004) Mutations identified in the human multidrug resistance P-glycoprotein 3 (ABCB4) gene in patients with primary hepatolithiasis. *Hepatol Res*, 29, 160-166.
- Kartner, N., D. Evernden-Porelle, G. Bradley & V. Ling (1985) Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature*, 316, 820-3.
- Kartner, N., M. Shales, J. R. Riordan & V. Ling (1983) Daunorubicin-resistant Chinese hamster ovary cells expressing multidrug resistance and a cell-surface P-glycoprotein. *Cancer Res*, 43, 4413-9.
- Keeling, K. M. & D. M. Bedwell (2002) Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. *J Mol Med (Berl)*, 80, 367-76.
- Keitel, V., M. Burdelski, U. Warskulat, T. Kühlkamp, D. Keppler, D. Häussinger & R. Kubitz (2005) Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*, 41, 1160-72.
- Kennelly, P. J. & E. G. Krebs (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem*, 266, 15555-8.
- Keppler, D., J. König & M. Büchler (1997) The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes. *Adv Enzyme Regul*, 37, 321-33.
- Kim Chiaw, P., L. Wellhauser, L. J. Huan, M. Ramjeesingh & C. E. Bear (2010) A chemical corrector modifies the channel function of F508del-CFTR. *Mol Pharmacol*, 78, 411-8.
- Kim, W. S., C. S. Weickert & B. Garner (2008) Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *J Neurochem*, 104, 1145-66.
- Kino, K., Y. Taguchi, K. Yamada, T. Komano & K. Ueda (1996) Aureobasidin A, an antifungal cyclic depsipeptide antibiotic, is a substrate for both human MDR1 and MDR2/P-glycoproteins. *FEBS Lett*, 399, 29-32.
- Kipp, H. & I. M. Arias (2000) Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *J Biol Chem*, 275, 15917-25.
- (2002) Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes. *Annu Rev Physiol*, 64, 595-608.
- Kipp, H., N. Pichetshote & I. M. Arias (2001) Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J Biol Chem*, 276, 7218-24.
- Kleizen, B. & I. Braakman (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 343-9.
- Kopito, R. R. (1999) Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev*, 79, S167-73.
- Krebs, M. P., S. M. Noorwez, R. Malhotra & S. Kaushal (2004) Quality control of integral membrane proteins. *Trends Biochem Sci*, 29, 648-55.

- Kruh, J. (1982) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem*, 42, 65-82.
- Kubitz, R., J. Bode, A. Erhardt, D. Graf, G. Kircheis, I. Müller-Stöver, R. Reinehr, S. Reuter, J. Richter, A. Sagir, M. Schmitt & M. Donner (2011) Cholestatic liver diseases from child to adult: the diversity of MDR3 disease. *Z Gastroenterol*, 49, 728-36.
- Kubota, H. (2009) Quality control against misfolded proteins in the cytosol: a network for cell survival. *J Biochem*, 146, 609-16.
- Laffitte, B. A., H. R. Kast, C. M. Nguyen, A. M. Zavacki, D. D. Moore & P. A. Edwards (2000) Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem*, 275, 10638-47.
- Lam, P., S. Xu, C. J. Soroka & J. L. Boyer (2011) A c-terminal tyrosine-based motif in the bile salt export pump directs clathrin-dependent endocytosis. *Hepatology*.
- Lang, C., Y. Meier, B. Stieger, U. Beuers, T. Lang, R. Kerb, G. A. Kullak-Ublick, P. J. Meier & C. Pauli-Magnus (2007) Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenet Genomics*, 17, 47-60.
- LaRusso, N. (1996) Morphology, physiology, and biochemistry of biliary epithelia. *Toxicol Pathol*, 24, 84-9.
- Lee, J. Y., I. L. Urbatsch, A. E. Senior & S. Wilkens (2002) Projection structure of P-glycoprotein by electron microscopy. Evidence for a closed conformation of the nucleotide binding domains. *J Biol Chem*, 277, 40125-31.
- Li, Z., L. B. Agellon & D. E. Vance (2005) Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure. *J Biol Chem*, 280, 37798-802.
- Lincke, C. R., J. J. Smit, T. van der Velde-Koerts & P. Borst (1991) Structure of the human MDR3 gene and physical mapping of the human MDR locus. *J Biol Chem*, 266, 5303-10.
- Ling, V. (1975) Drug resistance and membrane alteration in mutants of mammalian cells. *Can J Genet Cytol*, 17, 503-15.
- Ling, V., S. A. Carlsen & Y. P. See (1977) Altered drug permeability in mammalian cell mutants. *Adv Exp Med Biol*, 84, 247-64.
- Linton, K. J. (2007) Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)*, 22, 122-30.
- Linton, K. J. & C. F. Higgins (1998) The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol*, 28, 5-13.
- Liu, Y., J. Binz, M. J. Numerick, S. Dennis, G. Luo, B. Desai, K. I. MacKenzie, T. A. Mansfield, S. A. Kliewer, B. Goodwin & S. A. Jones (2003) Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *J Clin Invest*, 112, 1678-87.
- Loo, M. A., T. J. Jensen, L. Cui, Y. Hou, X. B. Chang & J. R. Riordan (1998) Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome. *EMBO J*, 17, 6879-87.
- Loo, T. W., M. C. Bartlett & D. M. Clarke (2004) Thapsigargin or curcumin does not promote maturation of processing mutants of the ABC transporters, CFTR, and P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 325, 580-5.
- (2005a) Rescue of DeltaF508 and other misprocessed CFTR mutants by a novel quinazoline compound. *Mol Pharm*, 2, 407-13.
- (2005b) Rescue of folding defects in ABC transporters using pharmacological chaperones. *J Bioenerg Biomembr*, 37, 501-7.
- (2005c) The dileucine motif at the COOH terminus of human multidrug resistance P-glycoprotein is important for folding but not activity. *J Biol Chem*, 280, 2522-8.
- (2011a) Benzbromarone stabilizes ΔF508 CFTR at the cell surface. *Biochemistry*, 50, 4393-5.
- Loo, T. W., M. C. Bartlett, L. Shi & D. M. Clarke (2011b) Corrector-mediated rescue of misprocessed CFTR mutants can be reduced by the P-glycoprotein drug pump. *Biochem Pharmacol*.
- Loo, T. W. & D. M. Clarke (1993) Functional consequences of proline mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J Biol Chem*, 268, 3143-9.
- (1994) Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis. *J Biol Chem*, 269, 28683-9.
- (1995) P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones. *J Biol Chem*, 270, 21839-44.
- (1997) Correction of defective protein kinesis of human P-glycoprotein mutants by substrates and modulators. *J Biol Chem*, 272, 709-12.
- Loor, F., F. Tiberghien, T. Wenandy, A. Didier & R. Traber (2002) Cyclosporins: structure-activity relationships for the inhibition of the human MDR1 P-glycoprotein ABC transporter. *J Med Chem*, 45, 4598-612.

- Lucena, J. F., J. I. Herrero, J. Quiroga, B. Sangro, J. Garcia-Foncillas, N. Zabalegui, J. Sola, M. Herraiz, J. F. Medina & J. Prieto (2003) A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis. *Gastroenterology*, 124, 1037-42.
- Makishima, M., A. Y. Okamoto, J. J. Repa, H. Tu, R. M. Learned, A. Luk, M. V. Hull, K. D. Lustig, D. J. Mangelsdorf & B. Shan (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, 284, 1362-5.
- Maliepaard, M., G. L. Scheffer, I. F. Faneyte, M. A. van Gastelen, A. C. Pijnenborg, A. H. Schinkel, M. J. van De Vijver, R. J. Scheper & J. H. Schellens (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*, 61, 3458-64.
- Martini, S. V., P. R. Rocco & M. M. Morales (2011) Adeno-associated virus for cystic fibrosis gene therapy. *Braz J Med Biol Res*, 44, 1097-104.
- Matlack, K. E., W. Mothes & T. A. Rapoport (1998) Protein translocation: tunnel vision. *Cell*, 92, 381-90.
- Matsumura, Y., L. L. David & W. R. Skach (2011) Role of Hsc70 binding cycle in CFTR folding and endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Biol Cell*, 22, 2797-809.
- Mattie, H., W. A. Craig & J. C. Pechère (1989) Determinants of efficacy and toxicity of aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother*, 24, 281-93.
- Mayer, M. P. & B. Bukau (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62, 670-84.
- Meacham, G. C., Z. Lu, S. King, E. Sorscher, A. Tousson & D. M. Cyr (1999) The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J*, 18, 1492-505.
- Meacham, G. C., C. Patterson, W. Zhang, J. M. Younger & D. M. Cyr (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol*, 3, 100-5.
- Meusser, B., C. Hirsch, E. Jarosch & T. Sommer (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, 7, 766-72.
- Misra, S., P. Ujházy, Z. Gatmaitan, L. Varticovski & I. M. Arias (1998) The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. *J Biol Chem*, 273, 26638-44.
- Mochizuki, K., T. Kagawa, A. Numari, M. J. Harris, J. Itoh, N. Watanabe, T. Mine & I. M. Arias (2007) Two N-linked glycans are required to maintain the transport activity of the bile salt export pump (ABCB11) in MDCK II cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, G818-28.
- Morita, S. Y., A. Kobayashi, Y. Takanezawa, N. Kioka, T. Handa, H. Arai, M. Matsuo & K. Ueda (2007) Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4. *Hepatology*, 46, 188-99.
- Muehlenberg, K., K. Wiedmann, H. Keppeler, T. Sauerbruch & F. Lammert (2008) [Recurrent intrahepatic cholestasis of pregnancy and chain-like choledocholithiasis in a female patient with stop codon in the ABDC4-gene of the hepatobiliary phospholipid transporter]. *Z Gastroenterol*, 46, 48-53.
- Müllenbach, R., K. J. Linton, S. Wiltshire, N. Weerasekera, J. Chambers, E. Elias, C. F. Higgins, D. G. Johnston, M. I. McCarthy & C. Williamson (2003) ABCB4 gene sequence variation in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Med Genet*, 40, e70.
- Nakagawa, S., I. Makino, T. Ishizaki & I. Dohi (1977) Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid. *Lancet*, 2, 367-9.
- Nakken, K. E., K. J. Labori, O. K. Rødningen, S. Nakken, K. E. Berge, K. Eiklid & M. G. Raeder (2009) ABCB4 sequence variations in young adults with cholesterol gallstone disease. *Liver Int*, 29, 743-7.
- Ng, W. F., F. Sarangi, R. L. Zastawny, L. Veinot-Drebot & V. Ling (1989) Identification of members of the P-glycoprotein multigene family. *Mol Cell Biol*, 9, 1224-32.
- Nies, A. T., Z. Gatmaitan & I. M. Arias (1996) ATP-dependent phosphatidylcholine translocation in rat liver canalicular plasma membrane vesicles. *J Lipid Res*, 37, 1125-36.
- Ninomiya, R., K. Matsuoka & Y. Moroi (2003) Micelle formation of sodium chenodeoxycholate and solubilization into the micelles: comparison with other unconjugated bile salts. *Biochim Biophys Acta*, 1634, 116-25.
- Nooter, K., P. Sonneveld, R. Oostrum, H. Herweijer, T. Hagenbeek & D. Valerio (1990) Overexpression of the *mdr1* gene in blast cells from patients with acute myelocytic leukemia is associated with decreased anthracycline accumulation that can be restored by cyclosporin-A. *Int J Cancer*, 45, 263-8.
- Norez, C., S. Noel, M. Wilke, M. Bijvelds, H. Jorna, P. Melin, H. DeJonge & F. Becq (2006) Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett*, 580, 2081-6.
- Okiyoneda, T., H. Barrière, M. Bagdány, W. M. Rabeh, K. Du, J. Höhfeld, J. C. Young & G. L. Lukacs (2010) Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science*, 329, 805-10.

- Okiyoneda, T., K. Harada, M. Takeya, K. Yamahira, I. Wada, T. Shuto, M. Suico, Y. Hashimoto & H. Kai (2004) Delta F508 CFTR pool in the endoplasmic reticulum is increased by calnexin overexpression. *Mol Biol Cell*, 15, 563-74.
- Orr, G. A., E. K. Han, P. C. Browne, E. Nieves, B. M. O'Connor, C. P. Yang & S. B. Horwitz (1993) Identification of the major phosphorylation domain of murine mdr1b P-glycoprotein. Analysis of the protein kinase A and protein kinase C phosphorylation sites. *J Biol Chem*, 268, 25054-62.
- Ortiz, D. F., J. Moseley, G. Calderon, A. L. Swift, S. Li & I. M. Arias (2004) Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and regulates its abundance in the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*, 279, 32761-70.
- Oude Elferink, R. P. & C. C. Paulusma (2007) Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch*, 453, 601-10.
- Palermo, D. P., M. E. DeGraaf, K. R. Marotti, E. Rehberg & L. E. Post (1991) Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression. *J Biotechnol*, 19, 35-47.
- Patel, P., N. Weerasekera, M. Hitchins, C. A. Boyd, D. G. Johnston & C. Williamson (2003) Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta. *Placenta*, 24, 39-44.
- Pauli-Magnus, C., T. Lang, Y. Meier, T. Zodan-Marin, D. Jung, C. Breymann, R. Zimmermann, S. Kenngott, U. Beuers, C. Reichel, R. Kerb, A. Penger, P. J. Meier & G. A. Kullak-Ublick (2004) Sequence analysis of bile salt export pump (ABCB11) and multidrug resistance p-glycoprotein 3 (ABCB4, MDR3) in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Pharmacogenetics*, 14, 91-102.
- Paulusma, C. C., A. Groen, C. Kunne, K. S. Ho-Mok, A. L. Spijkerboer, D. Rudi de Waart, F. J. Hoek, H. Vreeling, K. A. Hoeben, J. van Marle, L. Pawlikowska, L. N. Bull, A. F. Hofmann, A. S. Knisely & R. P. Oude Elferink (2006) Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport. *Hepatology*, 44, 195-204.
- Paulusma, C. C., M. J. Kothe, C. T. Bakker, P. J. Bosma, I. van Bokhoven, J. van Marle, U. Bolder, G. N. Tytgat & R. P. Oude Elferink (2000) Zonal down-regulation and redistribution of the multidrug resistance protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology*, 31, 684-93.
- Paumgartner, G. & U. Beuers (2002) Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology*, 36, 525-31.
- Peter, K., K. Varga, Z. Bebok, C. M. McNicholas-Bevensee, L. Schwiebert, E. J. Sorscher, E. M. Schwiebert & J. F. Collawn (2002) Ablation of internalization signals in the carboxyl-terminal tail of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator enhances cell surface expression. *J Biol Chem*, 277, 49952-7.
- Pfeffer, S. R. (2001) Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol*, 11, 487-91.
- Pind, S., J. R. Riordan & D. B. Williams (1994) Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, 269, 12784-8.
- Podda, M., C. Ghezzi, P. M. Battezzati, E. Bertolini, A. Crosignani, M. L. Petroni & M. Zuin (1989) Effect of different doses of ursodeoxycholic acid in chronic liver disease. *Dig Dis Sci*, 34, 59S-65S.
- Poupon, R., L. Arrive & O. Rosmorduc (2010) The cholangiographic features of severe forms of ABCB4/MDR3 deficiency-associated cholangiopathy in adults. *Gastroenterol Clin Biol*, 34, 380-7.
- Prince, L., K. Peter, S. Hatton, L. Zaliauskiene, L. Cotlin, J. Clancy, R. Marchase & J. Collawn (1999) Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a tyrosine-based signal. *J Biol Chem*, 274, 3602-9.
- Pullinger, C. R., C. Eng, G. Salen, S. Shefer, A. K. Batta, S. K. Erickson, A. Verhagen, C. R. Rivera, S. J. Mulvihill, M. J. Malloy & J. P. Kane (2002) Human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest*, 110, 109-17.
- Pusl, T. & U. Beuers (2007) Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Orphanet J Rare Dis*, 2, 26.
- Ramalho, A. S., S. Beck, M. Meyer, D. Penque, G. R. Cutting & M. D. Amaral (2002) Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27, 619-27.
- Redinger, R. N. (2003) The coming of age of our understanding of the enterohepatic circulation of bile salts. *Am J Surg*, 185, 168-72.
- Reo, N. V., M. Adinezhadeh & B. D. Foy (2002) Kinetic analyses of liver phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis using (13)C NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1580, 171-88.

- Resseguie, M., J. Song, M. D. Niculescu, K. A. da Costa, T. A. Randall & S. H. Zeisel (2007) Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) gene expression is induced by estrogen in human and mouse primary hepatocytes. *FASEB J*, 21, 2622-32.
- Reyes, H. (1997) Review: intrahepatic cholestasis. A puzzling disorder of pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol*, 12, 211-6.
- (2008) Sex hormones and bile acids in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Hepatology*, 47, 376-9.
- Reyes, H., M. C. Gonzalez, J. Ribalta, H. Aburto, C. Matus, G. Schramm, R. Katz & E. Medina (1978) Prevalence of intrahepatic cholestasis of pregnancy in Chile. *Ann Intern Med*, 88, 487-93.
- Riordan, J. R., K. Deuchars, N. Kartner, N. Alon, J. Trent & V. Ling (1985) Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*, 316, 817-9.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic & J. L. Chou (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245, 1066-73.
- Rodrigues, C. M., G. Fan, X. Ma, B. T. Kren & C. J. Steer (1998) A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest*, 101, 2790-9.
- Roninson, I. B. (1983) Detection and mapping of homologous, repeated and amplified DNA sequences by DNA renaturation in agarose gels. *Nucleic Acids Res*, 11, 5413-31.
- Roninson, I. B., H. T. Abelson, D. E. Housman, N. Howell & A. Varshavsky (1984) Amplification of specific DNA sequences correlates with multi-drug resistance in Chinese hamster cells. *Nature*, 309, 626-8.
- Roninson, I. B., J. E. Chin, K. G. Choi, P. Gros, D. E. Housman, A. Fojo, D. W. Shen, M. M. Gottesman & I. Pastan (1986) Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4538-42.
- Rosmorduc, O., B. Hermelin, P. Y. Boelle, R. Parc, J. Taboury & R. Poupon (2003) ABCB4 gene mutation-associated cholelithiasis in adults. *Gastroenterology*, 125, 452-9.
- Rosmorduc, O., B. Hermelin & R. Poupon (2001) MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology*, 120, 1459-67.
- Rosmorduc, O. & R. Poupon (2007) Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene. *Orphanet J Rare Dis*, 2, 29.
- Rost, D., J. Kartenbeck & D. Keppler (1999) Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology*, 29, 814-21.
- Rowntree, R. K. & A. Harris (2003) The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet*, 67, 471-85.
- Rubenstein, R. C., M. E. Egan & P. L. Zeitlin (1997) In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest*, 100, 2457-65.
- Rubenstein, R. C. & P. L. Zeitlin (1998) A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med*, 157, 484-90.
- (2000) Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278, C259-67.
- Ruddock, L. W. & M. Molinari (2006) N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci*, 119, 4373-80.
- Ruetz, S. & P. Gros (1994) Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell*, 77, 1071-81.
- Russell, D. W. (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*, 72, 137-74.
- Russell, D. W. & K. D. Setchell (1992) Bile acid biosynthesis. *Biochemistry*, 31, 4737-49.
- Rüdiger, S., A. Buchberger & B. Bukau (1997) Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol*, 4, 342-9.
- Sands, M. S. (2011) AAV-Mediated Liver-Directed Gene Therapy. *Methods Mol Biol*, 807, 141-57.
- Sato, S., C. L. Ward, M. E. Krouse, J. J. Wine & R. R. Kopito (1996) Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem*, 271, 635-8.
- Scheffer, G. L., M. Kool, M. Heijn, M. de Haas, A. C. Pijnenborg, J. Wijnholds, A. van Helvoort, M. C. de Jong, J. H. Hooijberg, C. A. Mol, M. van der Linden, J. M. de Vree, P. van der Valk, R. P. Elferink, P. Borst & R. J. Scheper (2000) Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies. *Cancer Res*, 60, 5269-77.
- Schell, M. J., M. Maurice, B. Stieger & A. L. Hubbard (1992) 5'nucleotidase is sorted to the apical domain of hepatocytes via an indirect route. *J Cell Biol*, 119, 1173-82.
- Schimke, R. T. (1984) Gene amplification, drug resistance, and cancer. *Cancer Res*, 44, 1735-42.
- Schinkel, A. H. & J. W. Jonker (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 3-29.

- Schinkel, A. H., S. Kemp, M. Dollé, G. Rudenko & E. Wagenaar (1993) N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J Biol Chem*, 268, 7474-81.
- Schroeder, R., C. Waldsich & H. Wank (2000) Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J*, 19, 1-9.
- Schülein, R. (2004) The early stages of the intracellular transport of membrane proteins: clinical and pharmacological implications. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 151, 45-91.
- Seibert, F. S., T. W. Loo, D. M. Clarke & J. R. Riordan (1997) Cystic fibrosis: channel, catalytic, and folding properties of the CFTR protein. *J Bioenerg Biomembr*, 29, 429-42.
- Senior, A. E., M. K. al-Shawi & I. L. Urbatsch (1995) The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett*, 377, 285-9.
- Senior, A. E. & D. C. Gadsby (1997) ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Semin Cancer Biol*, 8, 143-50.
- Sharma, M., F. Pampinella, C. Nemes, M. Benharouga, J. So, K. Du, K. G. Bache, B. Papsin, N. Zerangue, H. Stenmark & G. L. Lukacs (2004) Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol*, 164, 923-33.
- Shoda, J., Y. Inada, A. Tsuji, H. Kusama, T. Ueda, T. Ikegami, H. Suzuki, Y. Sugiyama, D. E. Cohen & N. Tanaka (2004) Bezafibrate stimulates canalicular localization of NBD-labeled PC in HepG2 cells by PPARalpha-mediated redistribution of ABCB4. *J Lipid Res*, 45, 1813-25.
- Slimane, T. A., G. Trugnan, S. C. Van IJendoorn & D. Hoekstra (2003) Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell*, 14, 611-24.
- Smit, J., A. Schinkel, R. Oude Elferink, A. Groen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. Mol, R. Ottenhoff, N. van der Lugt & M. van Roon (1993a) Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 75, 451-62.
- Smit, J. J., A. H. Schinkel, C. A. Mol, D. Majoor, W. J. Mooi, A. P. Jongsma, C. R. Lincke & P. Borst (1994) Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab Invest*, 71, 638-49.
- Smit, J. J., A. H. Schinkel, R. P. Oude Elferink, A. K. Groen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol, R. Ottenhoff, N. M. van der Lugt & M. A. van Roon (1993b) Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, 75, 451-62.
- Smith, A. J., A. van Helvoort, G. van Meer, K. Szabo, E. Welker, G. Szakacs, A. Varadi, B. Sarkadi & P. Borst (2000) MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem*, 275, 23530-9.
- Sousa, M. & A. J. Parodi (1995) The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *EMBO J*, 14, 4196-203.
- Stapelbroek, J. M., K. J. van Erpecum, L. W. Klomp & R. H. Houwen (2010) Liver disease associated with canalicular transport defects: current and future therapies. *J Hepatol*, 52, 258-71.
- Strautnieks, S. S., L. N. Bull, A. S. Knisely, S. A. Kocoshis, N. Dahl, H. Arnell, E. Sokal, K. Dahan, S. Childs, V. Ling, M. S. Tanner, A. F. Kagalwalla, A. Németh, J. Pawlowska, A. Baker, G. Mieli-Vergani, N. B. Freimer, R. M. Gardiner & R. J. Thompson (1998) A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet*, 20, 233-8.
- Strazzabosco, M. (1997a) New insights into cholangiocyte physiology. *J Hepatol*, 27, 945-52.
- (1997b) Transport systems in cholangiocytes: their role in bile formation and cholestasis. *Yale J Biol Med*, 70, 427-34.
- Thelin, W., Y. Chen, M. Gentsch, S. Kreda, J. Sallee, C. Scarlett, C. Borchers, K. Jacobson, M. Stutts & S. Milgram (2007) Direct interaction with filamins modulates the stability and plasma membrane expression of CFTR. *J Clin Invest*, 117, 364-74.
- Tietz, P. S., R. A. Marinelli, X. M. Chen, B. Huang, J. Cohn, J. Kole, M. A. McNiven, S. Alper & N. F. LaRusso (2003) Agonist-induced coordinated trafficking of functionally related transport proteins for water and ions in cholangiocytes. *J Biol Chem*, 278, 20413-9.
- Trauner, M. & J. L. Boyer (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev*, 83, 633-71.
- Twentyman, P. R. (1988) Modification of cytotoxic drug resistance by non-immuno-suppressive cyclosporins. *Br J Cancer*, 57, 254-8.
- Ueda, K., M. M. Cornwell, M. M. Gottesman, I. Pastan, I. B. Roninson, V. Ling & J. R. Riordan (1986) The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*, 141, 956-62.
- Ujhazy, P., D. Ortiz, S. Misra, S. Li, J. Moseley, H. Jones & I. M. Arias (2001) Familial intrahepatic cholestasis 1: studies of localization and function. *Hepatology*, 34, 768-75.

- Van der Blik, A. M., F. Baas, T. Ten Houte de Lange, P. M. Kooiman, T. Van der Velde-Koerts & P. Borst (1987) The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J*, 6, 3325-31.
- Van der Blik, A. M., F. Baas, T. Van der Velde-Koerts, J. L. Biedler, M. B. Meyers, R. F. Ozols, T. C. Hamilton, H. Joenje & P. Borst (1988) Genes amplified and overexpressed in human multidrug-resistant cell lines. *Cancer Res*, 48, 5927-32.
- van der Laan, L. J., Y. Wang, H. W. Tilanus, H. L. Janssen & Q. Pan (2011) AAV-mediated gene therapy for liver diseases: the prime candidate for clinical application? *Expert Opin Biol Ther*, 11, 315-27.
- Van Goor, F., K. S. Straley, D. Cao, J. González, S. Hadida, A. Hazlewood, J. Joubran, T. Knapp, L. R. Makings, M. Miller, T. Neuberger, E. Olson, V. Panchenko, J. Rader, A. Singh, J. H. Stack, R. Tung, P. D. Grootenhuys & P. Negulescu (2006) Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290, L1117-30.
- Vance, D. E. & C. J. Walkey (1998) Roles for the methylation of phosphatidylethanolamine. *Curr Opin Lipidol*, 9, 125-30.
- Wakabayashi, Y., P. Dutt, J. Lippincott-Schwartz & I. M. Arias (2005) Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15087-92.
- Wakabayashi, Y., H. Kipp & I. Arias (2006) Transporters on demand: Intracellular reservoirs and cycling of bile canalicular ABC transporters. *Journal of Biological Chemistry*, 27669-27673.
- Wakabayashi, Y., J. Lippincott-Schwartz & I. M. Arias (2004) Intracellular trafficking of bile salt export pump (ABCB11) in polarized hepatic cells: constitutive cycling between the canalicular membrane and rab11-positive endosomes. *Mol Biol Cell*, 15, 3485-96.
- Wakabayashi-Nakao, K., A. Tamura, T. Furukawa, H. Nakagawa & T. Ishikawa (2009) Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: ubiquitination and proteasomal degradation. *Adv Drug Deliv Rev*, 61, 66-72.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick & N. J. Gay (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, 1, 945-51.
- Walkey, C. J., L. Yu, L. B. Agellon & D. E. Vance (1998) Biochemical and evolutionary significance of phospholipid methylation. *J Biol Chem*, 273, 27043-6.
- Wang, D. Q., D. E. Cohen & M. C. Carey (2009) Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *J Lipid Res*, 50 Suppl, S406-11.
- Wang, L., H. Dong, C. J. Soroka, N. Wei, J. L. Boyer & M. Hochstrasser (2008) Degradation of the bile salt export pump at endoplasmic reticulum in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *Hepatology*, 48, 1558-69.
- Wang, L., C. J. Soroka & J. L. Boyer (2002) The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest*, 110, 965-72.
- Wang, L., H. Wang, P. Bell, R. J. McCarter, J. He, R. Calcedo, L. H. Vandenberghe, H. Morizono, M. L. Batshaw & J. M. Wilson (2010) Systematic evaluation of AAV vectors for liver directed gene transfer in murine models. *Mol Ther*, 18, 118-25.
- Wang, X., J. Venable, P. LaPointe, D. M. Hutt, A. V. Koulov, J. Coppinger, C. Gurkan, W. Kellner, J. Matteson, H. Plutner, J. R. Riordan, J. W. Kelly, J. R. Yates & W. E. Balch (2006a) Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell*, 127, 803-15.
- Wang, Y., M. C. Bartlett, T. W. Loo & D. M. Clarke (2006b) Specific rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing mutants using pharmacological chaperones. *Mol Pharmacol*, 70, 297-302.
- Ward, C. L. & R. R. Kopito (1994) Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem*, 269, 25710-8.
- Ward, C. L., S. Omura & R. R. Kopito (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, 83, 121-7.
- Wegele, H., L. Müller & J. Buchner (2004) Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 151, 1-44.
- Welch, E. M., E. R. Barton, J. Zhuo, Y. Tomizawa, W. J. Friesen, P. Trifillis, S. Paushkin, M. Patel, C. R. Trotta, S. Hwang, R. G. Wilde, G. Karp, J. Takasugi, G. Chen, S. Jones, H. Ren, Y. C. Moon, D. Corson, A. A. Turpoff, J. A. Campbell, M. M. Conn, A. Khan, N. G. Almstead, J. Hedrick, A. Mollin, N. Risher, M. Weetall, S. Yeh, A. A. Branstrom, J. M. Colacino, J. Babiak, W. D. Ju, S. Hirawat, V. J. Northcutt, L. L. Miller, P. Spatrick, F. He, M. Kawana, H. Feng, A. Jacobson, S. W. Peltz & H. L. Sweeney (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 447, 87-91.

- Willy, P. J., K. Umesono, E. S. Ong, R. M. Evans, R. A. Heyman & D. J. Mangelsdorf (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev*, 9, 1033-45.
- Wilschanski, M., L. L. Miller, D. Shoseyov, H. Blau, J. Rivlin, M. Aviram, M. Cohen, S. Armoni, Y. Yaakov, T. Pugatch, M. Cohen-Cymberek, N. L. Miller, A. Reha, V. J. Northcutt, S. Hirawat, K. Donnelly, G. L. Elfring, T. Ajayi & E. Kerem (2011) Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur Respir J*, 38, 59-69.
- Wilschanski, M., Y. Yahav, Y. Yaacov, H. Blau, L. Bentur, J. Rivlin, M. Aviram, T. Bdolah-Abram, Z. Bebok, L. Shushi, B. Kerem & E. Kerem (2003) Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med*, 349, 1433-41.
- Xie, W., A. Radominska-Pandya, Y. Shi, C. M. Simon, M. C. Nelson, E. S. Ong, D. J. Waxman & R. M. Evans (2001) An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 3375-80.
- Yang, Y., S. Janich, J. A. Cohn & J. M. Wilson (1993) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 9480-4.
- Yon, J. M. & J. M. Betton (1991) Protein folding in vitro and in the cellular environment. *Biol Cell*, 71, 17-23.
- Young, J. C., V. R. Agashe, K. Siegers & F. U. Hartl (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 781-91.
- Yu, L., J. Li-Hawkins, R. E. Hammer, K. E. Berge, J. D. Horton, J. C. Cohen & H. H. Hobbs (2002) Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest*, 110, 671-80.
- Zakarias Kristiansen, T., A. Maitra & A. Pandey. 2007. *Proteomics of Human Body fluids. Principles, Methods, and Applications*. Visith Thongboonkerd, MD, FRCPT.
- Zhang, J. T. & V. Ling (1991) Study of membrane orientation and glycosylated extracellular loops of mouse P-glycoprotein by in vitro translation. *J Biol Chem*, 266, 18224-32.
- Zhou, Y., M. M. Gottesman & I. Pastan (1999) Studies of human MDR1-MDR2 chimeras demonstrate the functional exchangeability of a major transmembrane segment of the multidrug transporter and phosphatidylcholine flippase. *Mol Cell Biol*, 19, 1450-9.
- Ziol, M., V. Barbu, O. Rosmorduc, A. Frassati-Biaggi, N. Barget, B. Hermelin, G. L. Scheffer, S. Bennouna, J. C. Trinchet, M. Beaugrand & N. Ganne-Carrié (2008) ABCB4 heterozygous gene mutations associated with fibrosing cholestatic liver disease in adults. *Gastroenterology*, 135, 131-41.
- Zollner, G. & M. Trauner (2009) Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol*, 156, 7-27.
- Zucchetti, A. E., I. R. Barosso, A. Boaglio, J. M. Pellegrino, E. J. Ochoa, M. G. Roma, F. A. Crocenzi & E. J. Sánchez Pozzi (2011) Prevention of estradiol 17beta-D-glucuronide-induced canalicular transporter internalization by hormonal modulation of cAMP in rat hepatocytes. *Mol Biol Cell*, 22, 3902-15.