



**HAL**  
open science

## Rôle du domaine extracellulaire d'ABCG2 dans l'homéostasie des porphyrines

Elodie Desuzinges Desuzinges-Mandon

► **To cite this version:**

Elodie Desuzinges Desuzinges-Mandon. Rôle du domaine extracellulaire d'ABCG2 dans l'homéostasie des porphyrines. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10236 . tel-00868903

**HAL Id: tel-00868903**

**<https://theses.hal.science/tel-00868903>**

Submitted on 2 Oct 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 L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le  
23 novembre 2010

par

Mme DESUZINGES-MANDON Elodie

**Rôle du domaine extracellulaire d'ABCG2 dans l'homéostasie des porphyrines.**

Directeur de thèse : Dr Pierre FALSON

JURY : M GILLET Germain, président  
M JAULT Jean-Michel, rapporteur  
M PEREZ-VICTORIA José-Maria, rapporteur  
M DESBOIS Alain, rapporteur  
M SZAKACS Gergely, examinateur  
M FALSON Pierre, directeur de thèse

# SOMMAIRE

<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>15</b>
<b>I CANCER : RAPPELS GENERAUX.....</b>	<b>17</b>
1. DEFINITION.....	17
2. LES DIFFERENTS TYPES DE TRAITEMENTS .....	18
a) <i>Chirurgie</i> .....	18
b) <i>Radiothérapie</i> .....	18
c) <i>Chimiothérapie</i> .....	18
<b>II PHENOTYPE DE RESISTANCE A DE MULTIPLES DROGUES.....</b>	<b>19</b>
1. RESISTANCE LIEE A L'ENVIRONNEMENT DE LA TUMEUR.....	19
2. METABOLISATION DES MEDICAMENTS ENTRAINANT LEUR INACTIVATION .....	20
a) <i>Le cytochrome P450</i> .....	20
b) <i>La conjugaison au glutathion</i> .....	20
3. ALTERATION DE LA CIBLE CELLULAIRE .....	21
4. REPARATION DE L'ADN.....	21
5. DEFAILLANCE DU SYSTEME APOPTOTIQUE .....	22
6. EFFLUX ACTIF DES MEDICAMENTS PAR LES TRANSPORTEURS ABC .....	22
<b>III LES TRANSPORTEURS ABC.....</b>	<b>23</b>
1. CLASSIFICATION.....	23
3. TOPOLOGIE ET ORGANISATION STRUCTURALE DES TRANSPORTEURS ABC.....	24
a) <i>Les domaines transmembranaires</i> .....	25
b) <i>Les domaines de fixation des nucléotides</i> .....	25
4. MECANISME DE TRANSPORT .....	27
5. TRANSPORTEURS BACTERIENS : L'EXEMPLE DE BMRA.....	29
6. TRANSPORTEURS HUMAINS .....	31
a) <i>Sous familles</i> .....	31
b) <i>3 principales protéines impliquées dans le phénotype MDR</i> .....	32
i) <i>Glycoprotéine P</i> .....	32
ii) <i>MRP1</i> .....	32
iii) <i>BCRP ou ABCG2</i> .....	32
7. <i>ABCG2</i> .....	33
a) <i>Découverte</i> .....	33
b) <i>Structure et polymorphismes</i> .....	34
c) <i>Dimérisation</i> .....	35
d) <i>Localisation</i> .....	36
i) <i>Tissulaire</i> .....	36
ii) <i>Cellulaire</i> .....	37
e) <i>Dégradation</i> .....	37
f) <i>Rôles physiologiques</i> .....	38
i) <i>Protection contre les endo- et xénobiotiques</i> .....	38
ii) <i>Rôle au niveau des glandes mammaires</i> .....	38
iii) <i>Protection des cellules souches</i> .....	39
g) <i>Substrats et inhibiteurs</i> .....	39
i) <i>Substrats d'ABCG2</i> .....	39
ii) <i>Les inhibiteurs d'ABCG2</i> .....	40
<b>IV HOMEOSTASIE DE L'HEME : QUEL(S) ROLE(S) POUR ABCG2 ? .....</b>	<b>41</b>

1.	METABOLISME DE L'HEME ET ROLES PHYSIOLOGIQUES.....	41
a)	<i>Structure des composés porphyriques</i> .....	41
b)	<i>Biosynthèse et catabolisme</i> .....	42
c)	<i>Rôles physiologiques</i> .....	44
i)	Hémoglobine.....	45
ii)	Régulation de croissance et de différenciation cellulaire.....	46
iii)	Protection des cellules contre la cytotoxicité et l'apoptose.....	46
d)	<i>Pathologies liées à un déficit en hème</i> .....	46
8.	TRANSPORT DE L'HEME DANS LES CELLULES DE MAMMIFERES.....	47
a)	<i>Toxicité de l'hème libre et systèmes de détoxification</i> .....	47
b)	<i>Trafic intracellulaire et export de porphyrines libres</i> .....	49
i)	Au niveau mitochondrial.....	50
ii)	Au niveau de la membrane plasmique des cellules.....	53
iii)	Cas particulier : rôle d'ABCG2 dans les cellules souches.....	57
c)	<i>Liaison des porphyrines aux protéines du plasma</i> .....	59
i)	Hemopexine.....	60
ii)	Albumine.....	60
	<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>63</b>
<b>I</b>	<b>TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE.....</b>	<b>65</b>
1.	SOUCHES BACTERIENNE ET DE CELLULES D'INSECTE ET DE MAMMIFERE.....	65
a)	<i>Souches bactériennes</i> .....	65
b)	<i>Cellules d'insecte</i> .....	65
i)	Congélation.....	65
ii)	Décongélation.....	65
iii)	Conditions de culture.....	65
c)	<i>Cellules de mammifère</i> .....	65
i)	Congélation.....	65
ii)	Décongélation.....	66
iii)	Conditions de culture.....	66
2.	VECTEURS PLASMIDIQUES ET CONCEPTION DES CLONAGES.....	66
a)	<i>Clonage dans les souches bactériennes</i> .....	66
i)	Pour la production d'ECL3 en fusion avec la MBP.....	66
ii)	Pour la production d'ECL3 en fusion avec une étiquette 6 histidines.....	67
b)	<i>Clonage dans les cellules d'insectes</i> .....	68
c)	<i>Clonage dans les cellules de mammifères</i> .....	68
3.	AMPLIFICATION D'ADN EN CHAINE.....	69
4.	PREPARATION DES PLASMIDES.....	69
a)	<i>Préparation analytique</i> .....	69
b)	<i>Préparation quantitative</i> .....	70
5.	ELECTROPHORESE DES ACIDES NUCLEIQUES SUR GEL D'AGAROSE.....	70
6.	CLONAGE DU GENE D'INTERET DANS UN PLASMIDE.....	70
a)	<i>Restriction du fragment d'ADN et du plasmide</i> .....	70
b)	<i>Ligature par T<sub>4</sub> DNA ligase</i> .....	71
7.	MUTAGENESE DIRIGEE.....	71
8.	TRANSFORMATION DES BACTERIES.....	72
a)	<i>Préparation des cellules compétentes</i> .....	72
b)	<i>Transformation des bactéries compétentes</i> .....	72
c)	<i>Analyse des clones ayant crû sur milieu sélectif</i> .....	73
9.	PRODUCTION DE BACMIDES RECOMBINANTS.....	73
a)	<i>Principe</i> .....	73
b)	<i>Mode opératoire</i> .....	74
<b>II</b>	<b>PREPARATION ET ANALYSE DES PROTEINES.....</b>	<b>74</b>
1.	SURPRODUCTION DE MBP-ECL3 EN SYSTEME BACTERIEN.....	74
a)	<i>Culture et induction</i> .....	74
b)	<i>Purification</i> .....	75
2.	SURPRODUCTION DE H <sub>6</sub> ECL3 EN SYSTEME BACTERIEN.....	75
a)	<i>Culture et induction</i> .....	76

b)	<i>Purification</i> .....	76
c)	<i>Retrait de l'étiquette poly-histidine</i> .....	76
3.	SURPRODUCTION D'ABCG2 EN CELLULES D'INSECTE <i>Sf9</i> ET <i>Hi-5</i> .....	76
a)	<i>Infection des cellules par le baculovirus</i> .....	77
b)	<i>Préparation des membranes</i> .....	77
c)	<i>Purification de la protéine</i> .....	77
4.	ANALYSE DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE ET IMMUNOREVELATION .....	77
a)	<i>Electrophorèse sur gel de polyacrylamide</i> .....	77
i)	Préparation des échantillons.....	77
ii)	Préparation des gels de 0.75 mm d'épaisseur.....	78
iii)	Migration .....	78
iv)	Coloration et décoloration.....	78
b)	<i>Immunorévélation par Western-blot</i> .....	78
<b>III</b>	<b>ANALYSES BIOCHIMIQUES ET BIOPHYSIQUES .....</b>	<b>79</b>
1.	DOSAGE DES THIOLS LIBRES .....	79
2.	TEST D'OXYDATION EN PRESENCE DE CU(PHE) <sub>3</sub> .....	79
3.	DICHOÏSME CIRCULAIRE .....	79
a)	<i>Principe</i> .....	79
b)	<i>Mode opératoire</i> .....	80
4.	SPECTROMETRIE DE MASSE.....	80
5.	SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORBANCE.....	80
6.	SPECTROFLUORIMETRIE .....	81
a)	<i>Fluorescence intrinsèque</i> .....	81
b)	<i>Cinétique</i> .....	81
7.	BILLES MAGNETIQUES .....	82
8.	"PULL DOWN" SUR RÉSINE D'HÉMINE-AGAROSE.....	82
9.	DOSAGE D'HEME CELLULAIRE ET MITOCHONDRIAL PAR HPLC.....	83
a)	<i>Préparation de lysat cellulaire total</i> .....	83
b)	<i>Préparation de mitochondries par centrifugation différentielle</i> .....	83
c)	<i>Dosage de l'hème par HPLC</i> .....	83
10.	FORMULATION D'ECL3 EN POLYLACTATES .....	84
11.	CYTOMETRIE DE FLUX .....	84
a)	<i>Principe</i> .....	84
b)	<i>Mode opératoire</i> .....	84
<b>RESULTATS.....</b>	<b>.....</b>	<b>87</b>
<b>I</b>	<b>MISE EN EVIDENCE DE LA FIXATION DE PORPHYRINES PAR LE DOMAINE ECL3.....</b>	<b>91</b>
1.	TRANSPORT D'HEME PAR ABCG2 .....	91
a)	<i>Topologie d'ABCG2</i> .....	91
b)	<i>Transport d'hème par ABCG2</i> .....	93
c)	<i>Modulation de la fixation d'ABCG2 sur hémine-agarose par le 5D3</i> .....	93
2.	FIXATION SUR ECL3 EN FUSION AVEC LA MALTOSE BINDING PROTEIN D' <i>E. COLI</i> .....	95
a)	<i>Versions produites</i> .....	95
b)	<i>Expression et purification de MBP-ECL3</i> .....	97
c)	<i>Test de fixation d'hémine sur les protéines produites</i> .....	97
i)	Test de la MBP .....	97
ii)	Test de la MBP-ECL3 périplasmique .....	99
iii)	Test de la MBP-ECL3 cytoplasmique.....	101
3.	FIXATION SUR LE DOMAINE ECL3 EN FUSION AVEC UNE ETIQUETTE HEXAHISTIDINE.....	103
a)	<i>Design du domaine ECL3</i> .....	103
i)	Détermination des extrémités d'ECL3 .....	103
ii)	Clonage dans pET15b.....	103
b)	<i>Expression en BL21</i> .....	103
c)	<i>Solubilisation et purification d'H<sub>6</sub>ECL3</i> .....	105
d)	<i>Vérification de la conformation du domaine isolé</i> .....	109
i)	Spectre de dichroïsme circulaire .....	109

ii)	Spectre de fluorescence.....	111
iii)	Reconnaissance par un anticorps conformationnel .....	111
iv)	Spectrométrie de masse.....	111
d)	<i>Mise en évidence de la fixation d'hémine par ECL3</i> .....	113
i)	Par l'intermédiaire de billes magnétiques .....	113
ii)	Par spectrophotométrie .....	113
iii)	Par spectrofluorimétrie.....	115
e)	<i>Test de fixation d'autres composés par ECL3</i> .....	117
i)	Composés porphyriques.....	117
ii)	Autres substrats.....	119
iii)	Inhibiteurs .....	119
4.	SUR LE DOMAINE ECL3 MUTE.....	121
a)	<i>Choix des mutations</i> .....	121
b)	<i>Fixation des porphyrines sur les mutants</i> .....	121
5.	SUR ABCG2 ENTIERE.....	123
a)	<i>Expression et purification d'ABCG2</i> .....	123
i)	Clonage de H <sub>10</sub> ABCG2 et obtention du baculovirus.....	123
ii)	Culture cellulaire des Hi-5, infection et préparation des membranes.....	125
iii)	Purification d'ABCG2 .....	125
b)	<i>Fixation de porphyrines sur ABCG2</i> .....	129
<b>II</b>	<b>RECHERCHE DE PARTENAIRE.....</b>	<b>131</b>
1.	PARTENARIAT AVEC ECL3 ISOLE .....	131
a)	<i>A partir de lysats cellulaires</i> .....	131
b)	<i>Mise en évidence d'un partenariat avec l'HSA</i> .....	133
i)	Par l'intermédiaire de billes magnétiques .....	133
ii)	Par fluorimétrie intrinsèque.....	133
iii)	Par fluorimétrie cinétique.....	135
iv)	Par spectrophotométrie .....	135
6.	PARTENARIAT AVEC ABCG2 .....	135
a)	<i>Transfert d'hémine entre ABCG2 et HSA</i> .....	137
b)	<i>Interaction directe entre ABCG2 et HSA</i> .....	137
	<b>RESULTATS ANNEXES.....</b>	<b>139</b>
<b>I</b>	<b>ABCG2 EFFLUE-T-IL L'HEME HORS DES MITOCHONDRIES ? .....</b>	<b>141</b>
1.	PREPARATION DE LA FRACTION MITOCHONDRIALE DES CELLULES K562 .....	141
2.	DOSAGE DE PORPHYRINES PAR HPLC .....	143
<b>II</b>	<b>FORMULATION D'ECL3 EN VUE D'IMMUNISATION DE SOURIS POUR L'OBTENTION D'UN ANTICORPS SPECIFIQUE.....</b>	<b>147</b>
1.	FORMULATION D'ECL3 EN PLA .....	147
2.	HYBRIDOMES OBTENUS PAR IMMUNISATION DE SOURIS .....	149
<b>III</b>	<b>TESTS D'HOMOPEPTIDES POTENTIELLEMENT INHIBITEURS .....</b>	<b>151</b>
<b>IV</b>	<b>FIXATION DE SUBSTRATS SUR BMRA SOLUBILISEE EN STABICALIX .....</b>	<b>153</b>
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>155</b>
	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>161</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>165</b>
	<b>ANNEXES.....</b>	<b>187</b>

## ABREVIATIONS

ABC	ATP-Binding Cassette
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADP	Adénosine 5'-DiPhosphate
ALA	δ-Amino Levulinic Acid
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BL	Milieu de Luria Bertani
BSA	Bovine Serum Albumine
CO	Monoxyde de carbone
CPIII	Coproporphyrinogène III
DMSO	DiMéthylSulfOxide
dNTP	DesoxyNucléotide TriPhosphate
D.O.	Densité Optique
ECL3	ExtraCellular Loop 3
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
FC12	Fos choline 12
GSH	Glutathion
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	N-[2-HydroxyEthyl]Piperazidin-N'-[2-EthanSulfonic acid]
HIF-1	Hypoxia Inductible Factor 1
HO-1	Heme-Oxygenase 1
HSA	Human Serum Albumin
HSC	Hematopoïetic Stem cell
HUGO	HUman Genome Organisation
IPTG	IsoPropyl-β-D-thio-Galactopyranoside
Kd	Constante de dissociation
KO	Knock Out
MDR	MultiDrug Resistance
MRP	Multidrug resistance-associated Protein
NATA	N-Acetyl-TryptophanAmide
NBD	Nucleotide-Binding Domain
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
P-gp	P-glycoprotein
PhA	Phéophorbide a
PPIX	Protoporphyrine IX
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SP	Side Population
TEMED	N,N,N,N-TetraMethylEthylene Diamine
TNF	Tumor Necrosis Factor
TMD	TransMembrane Domain
UV	Ultra-Violet
Zn-PPIX	Zinc-protoporphyrine IX

## LISTE DES FIGURES

Figure 1- Conjugaison au glutathion d'un xénobiotique par la S-Transférase $\pi$ .....	20
Figure 2- Arbre phylogénétique simplifié des transporteurs ABC .....	24
Figure 3- Topologie des transporteurs ABC .....	25
Figure 4- Cartographie des deux sites de fixation de l'ATP dans le dimère de MJ0796 .....	26
Figure 5 - Structure de Sav1866.....	27
Figure 6- Structure de la Glycoprotéine-P murine .....	27
Figure 7-Modèle de transport des drogues "ATP switch model" .....	28
Figure 8- Schéma du changement de conformation des NBD induit par la fixation d'ATP par l'intermédiaire des hélices de couplage .....	29
Figure 10 - Topologie des transporteurs ABC MDR .....	33
Figure 11 - Schéma des ponts disulfures intra- et intermoléculaires d'ABCG2.....	35
Figure 12 - Vue schématique de l'expression d'ABCG2 dans l'organisme .....	37
Figure 13 - Structure chimique de trois substrats d'ABCG2.....	39
Figure 14 - Schéma d'ABCG2 et liste (non exhaustive) de ses substrats.....	40
Figure 15 - Structure de deux inhibiteurs d'ABCG2 .....	40
Figure 16- Structure des composés porphyriques. ....	42
Figure 17- Biosynthèse de l'hème dans la mitochondrie et le cytoplasme.....	43
Figure 18-Devenir des catabolites de l'hème.....	44
Figure 19- Effet délétère de l'hème libre <i>via</i> la production de ROS .....	48
Figure 20 - Systèmes de dégradation de l'hème hors hème-oxygénase .....	49
Figure 21 - Transport cellulaire de l'hème libre .....	50
Figure 22- Modèle décrivant l'effet de la quantité d'ABCB6 sur l'hème et les hémoprotéines	52
Figure 23 - Transporteurs présents à la membrane et devenir de l'hème .....	53
Figure 24- Phototoxicité dépendante du phéophorbide a .....	55
Figure 25 - Rôle proposé d'ABCG2 dans les cellules souches embryonnaires de souris .....	59
Figure 26 - Schéma du rôle potentiel de la troisième boucle extracellulaire d'ABCG2 dans la prise en charge des porphyrines. ....	61
Figure 27 - Le plasmide pMal-p2g.....	67
Figure 28 - Le plasmide pET15b.....	68
Figure 29 - Vecteur pFastBacDual contenant le gène H <sub>10</sub> ABCG2. ....	68
Figure 30 - Schéma de l'expression protéique avec le système Bac to Bac (Invitrogen).....	74
Figure 31 – Topologie d'ABCG2, d'après P. Falson, non publié.....	90
Figure 32 - Topologie d'ECL3. ....	90
Figure 33 - Les cellules K562 exprimant ABCG2 effluent la ZnMP, un analogue de l'hème. 92	
Figure 34 - La présence de 5D3 dont l'épitope se trouve sur ECL3 réduit la fixation d'ABCG2 sur résine d'hémimine-agarose. ....	92
Figure 35 - Localisation des protéines produites en fusion avec la MBP. ....	94
Figure 36 - Profil d'élution de la MBPc-ECL3court. ....	96
Figure 37 – Migration électrophorétique sur SDS-PAGE 12 % des protéines produites par la bactérie BL21(DE3), vecteur pmal p2G, après induction par l'IPTG, avant et après purification par chromatographie d'affinité amylose-maltose. ....	96
Figure 38 - Migration électrophorétique sur SDS-PAGE 12 % des protéines produites par la bactérie BL21(DE3) transformée avec le vecteur pMalc2G-ECL3court (codant pour la MBPc-ECL3court) après induction par l'IPTG, avant et après purification par chromatographie d'affinité amylose.....	96
Figure 39 - Spectres normalisés de 10 $\mu$ M de MBPp en présence d'une concentration croissante d'hémimine. ....	98



Figure 40 – Courbes de saturation de la fixation d’hémine sur la MBPc et la MBPp. ....	98
Figure 41 – Courbes de saturation de la fixation d’hémine sur MBPp et MBPp-ECL3c .....	99
Figure 42 - Spectres corrigés et normalisés de 10 $\mu$ M MBPc-ECL3court en présence de concentrations d’hémine croissantes. ....	100
Figure 43 - Courbes de saturation de la fixation d’hémine sur la MBPc-ECL3 long et court. ....	100
Figure 44 - Construction du domaine ECL3. ....	102
Figure 45 - Test d'expression d'H <sub>6</sub> ECL3 en BL21(DE3). ....	102
Figure 46 - Traitement des corps d'inclusions et caractéristiques de la FC12. ....	104
Figure 47 - Test de solubilité d'H <sub>6</sub> ECL3. ....	104
Figure 48 - Purification du domaine H <sub>6</sub> ECL3. ....	105
Figure 49 - Profils obtenus lors de la purification d'ECL3 .....	106
Figure 50 - Test d'oxydation d'ECL3 avec du Cu(Phe) <sub>3</sub> . ....	107
Figure 51 - Spectre de dichroïsme circulaire d'ECL3. ....	108
Figure 52 - Spectre de fluorescence d'ECL3 et du NATA. ....	110
Figure 53 - Courbe de saturation d'ECL3 en présence de l'anticorps conformationnel 5D3. ....	110
Figure 54 - Test de fixation d’hémine sur H6ECL3 greffée à des billes magnétiques. ....	112
Figure 55 - Spectre de l’hémine. ....	112
Figure 56 - Fixation de l’hémine sur ECL3 visualisée par spectrophotométrie. ....	114
Figure 57 - Structure de l’hémine et de l’hème. ....	114
Figure 58- Courbes de saturation de la fixation d’hémine et d’hème sur ECL3 réduit ou oxydé. ....	115
Figure 59 - Structure de quelques composés porphyriques testés dans cette étude. ....	116
Figure 60 - Courbe de saturation de la fixation de PPIX sur ECL3. ....	116
Figure 61 - Courbes de saturation de la fixation de ZnPPIX, CoPPIX et phéophorbide a sur ECL3. ....	117
Figure 62 - Courbes de saturation de l'interaction entre la vitamine B12 ou la bilirubine et ECL3. ....	118
Figure 63 - Courbe de saturation de différents composés non porphyriques avec ECL3. ....	118
Figure 64 - Courbe de saturation de l'interaction d'inhibiteurs d'ABCG2 avec ECL3. ....	119
Figure 65 - Courbes de saturation de la fixation d’hémine et de PPIX sur ECL3 muté. ....	120
Figure 66 - Alignement de la structure primaire d'ECL3 avec différents cytochromes B5. ....	121
Figure 67 - Constantes de dissociation de l’hémine et de la PPIX fixés sur ECL3 muté. ....	122
Figure 68 – Détection d’ABCG2 par Western blot à partir de cellules <i>Hi-5</i> et <i>Sf9</i> infectées pendant 4 (gauche) ou 3 (droite) jours par des quantités variables de baculovirus. ....	124
Figure 69 - Western blot des membranes préparées à partir de cellules <i>Hi-5</i> surexprimant H <sub>10</sub> ABCG2. ....	124
Figure 70 - Profil de purification de H <sub>10</sub> ABCG2 par chromatographie d'affinité. ....	125
Figure 71 - SDS-PAGE 10% (haut) et western blot (bas) des différentes étapes de la purification de H <sub>10</sub> ABCG2. ....	126
Figure 72 - Spectre de fluorescence d'ABCG2 à 0,1 $\mu$ M, après excitation à 295 nm. ....	126
Figure 73 - Courbes de saturation de la fixation d’hémine et de phéophorbide a sur H <sub>10</sub> ABCG2 pré-incubée avec des substrats. ....	128
Figure 74 - Courbe de saturation de la fixation d’hémine sur H <sub>10</sub> ABCG2. ....	128
Figure 75 - Schéma de la prise en charge des porphyrines par ECL3 et interaction potentielle avec la HSA. ....	130
Figure 76 - Migration électrophorétique sur SDS-PAGE des différentes étapes de la « pêche au ligand ». ....	132
Figure 77 - Relargage d'hémine fixée sur H <sub>6</sub> ECL3 dans une solution de HSA. ....	132
Figure 78 - Intercation du complexe ECL3-hémine avec l'HSA et la lactoferrine. ....	133

Figure 79 – Cinétique de fixation/relargage de l'hémine sur ECL3. ....	134
Figure 80 - Spectres d'absorbance de l'hémine en présence d'ECL3 puis de HSA. ....	134
Figure 81 - Cinétique de fixation/relargage de l'hémine sur H <sub>10</sub> ABCG2. ....	136
Figure 82 - courbe de saturation de la fixation de HSA sur H <sub>10</sub> ABCG2. ....	136
Figure 83 - Schéma de la prise en charge des porphyrines par ECL3 et interaction avec la HSA. ....	138
Figure 84 - Western blot des fractions mitochondriales et cytoplasmiques de cellules K562 exprimant ou non ABCG2. ....	141
Figure 85 - Dosage des porphyrines totales et mitochondriales des cellules K562. ....	142
Figure 86 - Chromatogrammes HLPC obtenus à 400 nm pour différentes concentrations en hémine. ....	144
Figure 87 - Dosage de l'hémine par HPLC. Représentation en fonction de la surface du pic observé. ....	145
Figure 88 - Chromatogramme HLPC obtenu après injection de PPIX. ....	145
Figure 89 - Formulation d'ECL3 en PLA. ....	146
Figure 90 - Mesure de la taille des complexes ECL3-PLA. ....	146
Figure 91 - Test des hybridomes sur des lysats cellulaires contenant ou non ABCG2. ....	148
Figure 92 - Western blot de lysats cellulaires de HEK 293 révélés par AD1 ou BXP-21. ....	148
Figure 93 - Topologie d'ABCG2, et localisation des homopeptides. ....	150
Figure 94 - Mesure de la capacité des homopeptides à inhiber le transport de mitoxantrone. ....	151
Figure 95 - Structure chimique des C4Cn. ....	152
Figure 96 - Courbe de saturation de la fixation de daunorubicine sur BmrA solubilisée en C4C10. ....	152
Figure 97 - Courbe de saturation de l'interaction entre le C4C10 et BmrA solubilisée en FC12 ou C4C10. ....	152

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Implication de l'hème dans les hémoprotéines.....	45
Tableau 2 - Transport de porphyrines et SNP d'ABCG2 .....	56
Tableau 3 - Séquences des amorces pour la mutagenèse de H <sub>6</sub> ECL3. ....	71
Tableau 4 - Pourcentages estimés des structures secondaires d'ECL3 par différentes méthodes .....	108
Tableau 5 - Constantes de dissociation des différents composés testés sur ABCG2 et le domaine ECL3 sauvage et muté.....	122



# INTRODUCTION



Le cancer est un problème majeur de santé publique. On estime à 7,6 millions le nombre de personnes décédées d'un cancer dans le monde en 2008. Plusieurs types de thérapies sont utilisés à ce jour, les plus courantes étant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cette dernière est le traitement le plus utilisé, malgré des effets secondaires importants. L'efficacité des traitements par chimiothérapie est cependant de plus en plus souvent compromise en raison de la surexpression par les cellules cancéreuses de protéines membranaires capables d'effluer un très large spectre de composés. Ce phénomène, appelé Résistance à de Multiples Drogues (MDR) peut être intrinsèque ou acquis à la suite d'une chimiothérapie. Chez l'homme, trois transporteurs sont principalement à l'origine de ce phénotype : la Glycoprotéine P, MRP1 et ABCG2. L'étude de leurs différentes fonctions physiologiques et pathologiques, ainsi que le développement d'inhibiteurs spécifiques, sont au cœur de la recherche menée au sein du Laboratoire des Protéines de Résistance aux Agents Chimiothérapeutiques depuis de nombreuses années.

ABCG2 est une protéine de la famille des transporteurs ABC, physiologiquement présente dans un grand nombre de tissus de l'organisme, en particulier l'intestin, le foie, le placenta, la barrière hémato-encéphalique et les cellules souches. Topologiquement, ABCG2 est un demi-transporteur et se compose d'une région cytoplasmique de fixation de nucléotides qui fixe l'ATP et fournit l'énergie nécessaire au transport et d'une région transmembranaire comprenant 6 hélices  $\alpha$ , numérotées TM1 à TM6, qui porte les sites spécifiques de reconnaissance des substrats. Elle a pour particularité de posséder une grande région extracellulaire entre les TM5 et 6, nommée ECL3 (pour *ExtraCellular Loop 3*). L'unité fonctionnelle est un dimère constitué de l'association de deux demi-transporteurs. ABCG2 est capable d'exporter une grande variété de composés, dont les porphyrines.

L'hème est une porphyrine indispensable à la vie, synthétisée au niveau du cytoplasme et de la mitochondrie. Sa synthèse est particulièrement importante dans les cellules souches hématopoïétiques, où il entre dans la composition de l'hémoglobine qui permet le transport de l'oxygène et la respiration cellulaire. L'hème est également impliqué dans différentes voies de signalisation cellulaire. C'est une molécule qui peut se révéler toxique lorsqu'elle est libre en solution et elle doit être prise en charge par différents véhicules protéiques. Le maintien de l'homéostasie des porphyrines est donc essentiel. ABCG2 participe à cette homéostasie par le transport de ces composés à l'extérieur des cellules. Elle permet ainsi la protection des cellules, et en particulier des cellules souches en conditions d'hypoxie, contre leurs effets délétères en évitant leur accumulation.

Notre étude s'intéresse particulièrement à l'implication d'ABCG2 dans l'homéostasie des porphyrines, et notamment au rôle d'ECL3, son domaine extracellulaire. Nous montrons ici qu'ECL3 constitue un domaine de fixation de porphyrines qui interagit fortement avec l'hème, l'hémine, la protoporphyrine IX, la Zn-protoporphyrine IX et la Co-protoporphyrine IX, et de façon plus faible avec le phéophorbide a, les Kd se situant entre 0,5 et 3,5  $\mu$ M. Cette fixation est spécifique des molécules porphyriniques et les autres substrats et inhibiteurs d'ABCG2 testés ne montrent pas d'interaction avec le domaine. L'hème et l'hémine sont les meilleurs ligands et leur fixation est altérée par les mutations ponctuelles H583A et C603A, tandis qu'elles restent sans effet sur la fixation de la protoporphyrine IX.

ECL3 est localisée en aval du site de transport des substrats, au niveau extracellulaire, ce qui suggère que les porphyrines sont transférées sur le domaine juste après leur efflux. Elles sont alors stratégiquement placées pour pouvoir être prises en charge par une protéine partenaire. Notre étude met en évidence que l'albumine, connue pour fixer des porphyrines et favoriser leur dégradation, pourrait être cette protéine. En effet, elle déplace l'hémine fixée sur ECL3 par une interaction directe avec ABCG2.



# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**



Dans ces rappels bibliographiques, nous aborderons succinctement les transporteurs ABC et leur rôle dans le phénotype de Multi-Drug Resistance (MDR), en particulier le demi-transporteur ABCG2. Puis nous décrirons plus en détail l'homéostasie de l'hème ainsi que le rôle potentiel d'ABCG2 dans ce contexte.

## **I Cancer : Rappels Généraux**

### **1. Définition**

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire rapide et anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme. C'est une pathologie chronique résultant de dérèglements du fonctionnement des gènes, en particulier dans les cellules vieillissantes. La transformation cellulaire tumorale peut être due à des mutations ou à une instabilité génétique et se traduit notamment par une perte du contrôle du cycle cellulaire, une insensibilité à l'apoptose et des anomalies de la réparation de l'ADN. Ces dérèglements confèrent à ces cellules des avantages en termes de prolifération, d'adaptation et de survie, ainsi que la capacité à essaimer dans d'autres organes, formant des métastases.

On peut classer les cancers en deux grandes catégories :

- Les cancers concernant les cellules hématopoïétiques qui causent les leucémies et lymphomes,
- Les tumeurs solides, associées aux autres tissus, formant entre autres des carcinomes ou des sarcomes, selon le type de cellule dans laquelle s'est produite la première transformation.

Les facteurs de risques peuvent être soit génétiques (mutation ou changement épigénétique), soit liés à un agent infectieux ou à l'environnement, en particulier la pollution, l'alimentation, le tabagisme et les radiations (notamment solaires).

Plusieurs types de cancers semblent en augmentation, pour des raisons environnementales ou de modes de vie, ainsi que - pour une partie des cas seulement - en raison du vieillissement de la population. Les taux de cancers détectés augmentent dans chaque tranche d'âge, une meilleure détection qu'autrefois ayant aussi un rôle dans cette augmentation.

## 2. Les différents types de traitements

Les traitements les plus couramment utilisés sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Néanmoins, il existe d'autres techniques, très intéressantes dans certains cas de cancer. Il s'agit notamment de l'immunothérapie et de l'hormonothérapie.

Le choix du traitement dépend de nombreux facteurs individuels, comme le type de cancer, sa localisation, son stade de progression, son agressivité ou l'état général du patient. Les différents traitements peuvent être utilisés seuls ou en combinaison, simultanément ou séquentiellement.

### a) Chirurgie

Dans le traitement du cancer, la chirurgie, associée ou non à d'autres approches, est utilisée dans environ 80 % des cas. Elle peut être à visée diagnostique, curative, palliative ou de réparation. Elle consiste à exciser la tumeur cancéreuse, complètement ou en partie. Elle peut être très efficace, surtout dans les stades précoces, mais est sans effet sur les métastases, ce qui explique qu'on l'associe souvent à une autre forme de traitement.

### b) Radiothérapie

La radiothérapie utilise l'émission de radiations pour ioniser les tissus cancéreux et endommager leur information génétique. Elle agit localement sur la zone irradiée et les régions avoisinantes, et doit être ciblée pour épargner le plus possible les tissus sains. La curiethérapie est une forme particulière de radiothérapie, dans laquelle un élément radioactif (par exemple l'iode 125) est placé directement au contact de la tumeur, limitant l'irradiation des organes sains adjacents. La radiothérapie peut être utilisée seule ou en association, après une chirurgie par exemple.

### c) Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'administration de molécules médicamenteuses cytotoxiques pour les cellules en induisant, le plus souvent, l'apoptose. En agissant au cours du cycle cellulaire, elle cible plus particulièrement les cellules tumorales dont la prolifération est plus rapide. Malheureusement, les effets de ces molécules ne sont pas spécifiques aux cellules cancéreuses et cette thérapie provoque de nombreux effets secondaires, comme des nausées, vomissements, perte des cheveux, du goût, de l'appétit, fatigue, anémie et diminution de l'immunité. En dépit de ces effets secondaires, ce type de traitement reste central dans la

prise en charge des patients, car elle est la seule à pouvoir être employée dans les cas de métastases.

## II Phénotype de résistance à de multiples drogues

La découverte puis le développement des molécules chimiothérapeutiques ont permis d'augmenter considérablement l'espérance de vie des patients atteints de cancer. Néanmoins, les médecins se heurtent fréquemment à des cancers résistants aux traitements. La compréhension des mécanismes de défense des cellules cancéreuses s'avère primordiale pour adapter les traitements existants ou en développer de nouveaux. Ce phénotype de résistance à de multiples drogues (MDR), décrit pour la première fois en 1970 (Bielder et Riehm, 1970), est multifactoriel et se caractérise par une diminution de la sensibilité des cellules tumorales vis-à-vis des agents cytotoxiques employés, mais aussi d'autres molécules sans lien structural. Cette résistance s'explique par la physiologie des cellules tumorales et/ou par la pression de sélection exercée par les agents chimiothérapeutiques. On peut citer plusieurs mécanismes :

- Mécanisme lié à l'environnement de la tumeur,
- Métabolisation du médicament entraînant son inactivation,
- Altération de la cible cellulaire,
- Réparation de l'ADN,
- Défaillance du système apoptotique,
- Efflux actif des médicaments par les transporteurs ABC.

### 1. Résistance liée à l'environnement de la tumeur

Ce mécanisme est observé uniquement pour les tumeurs solides. Les cellules ne présentent pas de résistance *in vitro*, mais la tumeur est hautement résistante *in vivo* (Teicher et al, 1990). Les tumeurs solides étant très irrégulièrement vascularisées, les agents anticancéreux pénètrent faiblement. De la même façon, les nutriments parviennent à la tumeur de manière limitée, ce qui diminue les divisions cellulaires (Durant, 2001). Or, les agents chimiothérapeutiques ciblent justement les cellules en division. De récentes découvertes indiquent que la résistance liée à l'environnement provient d'un dialogue et d'une adaptation entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement (Meads et al, 2009). De nouvelles thérapies ciblant cette interaction représentent donc un espoir important.

## 2. Métabolisation des médicaments entraînant leur inactivation

La métabolisation des médicaments, c'est-à-dire les modifications qu'ils subissent en vue de leur inactivation et de leur élimination, est un phénomène indispensable pour en limiter la toxicité. Elle a lieu dans l'organisme sain pour la grande majorité des drogues que l'on absorbe. Dans le cas des agents chimiothérapeutiques, une métabolisation trop importante peut entraîner une inefficacité du traitement. Il existe plusieurs voies de métabolisation, dont les principales sont le cytochrome P450 et la conjugaison au glutathion.

### a) Le cytochrome P450

Il existe plusieurs isoformes du cytochrome P450, dont le CYP1B1, surexprimé dans de nombreuses tumeurs (Murray et al, 1997), qui métabolise le docétaxel en un métabolite possédant une activité quatre fois plus faible (Mc Fadyen et al., 2001). Le taxol est également métabolisé par une isoforme du cytochrome P450, le CYP2C8, en 6- $\alpha$ -hydrotaxol dont l'activité pharmacologique est trente fois plus faible (Rahman et al., 1994)

### b) La conjugaison au glutathion

Le glutathion cellulaire est un élément essentiel pour la détoxification cytotatique dans la cellule. La conjugaison résulte de la réaction du thiol du glutathion avec le site actif des drogues par l'action de la glutathion S-transférase  $\pi$  (Figure 1). Les conjugués ainsi générés sont moins toxiques, plus hydrosolubles et facilement efflués par des systèmes de transport du glutathion, comme MRP1.

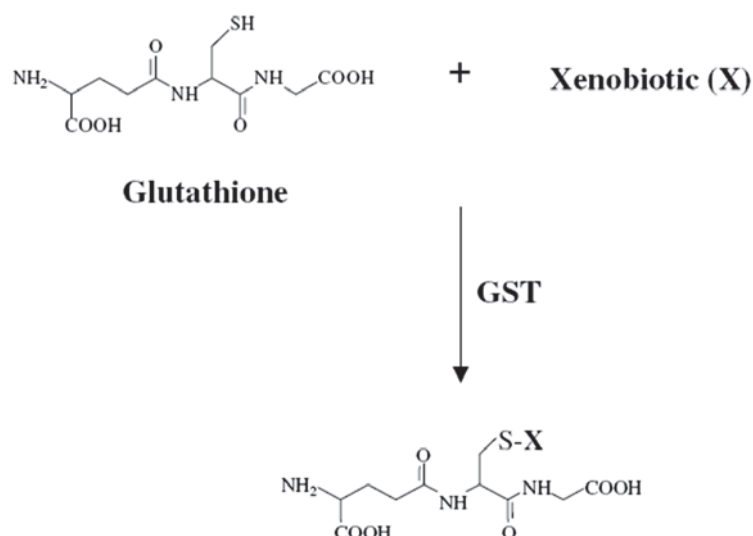


Figure 1- Conjugaison au glutathion d'un xénobiotique par la S-Transférase  $\pi$  (Townsend et Tew, 2003)

La surexpression de la glutathion S-transférase  $\pi$  et l'augmentation du glutathion intracellulaire ont été observées dans les cas de résistances aux agents alkylants tels que la moutarde d'azote, le chlorambucil ou le melphalan (Tew, 1994) ainsi qu'aux anthracyclines et au cisplatine (Peters et Roelofs, 1992 ; Hao et al., 1994).

### 3. Altération de la cible cellulaire

La transformation tumorale des cellules est associée à de nombreuses mutations de gènes. Or, la mutation ou l'altération de l'expression des cibles des agents chimiothérapeutiques peuvent conduire à l'apparition de résistances. Le fluorodésoxyuridine monophosphate, métabolite du 5-FU, est un puissant inhibiteur de la thymidylate synthétase. De nombreuses études ont démontré que l'inhibition de cette enzyme est la clé de l'activité antitumorale du 5-FU (Kohne and Peters, 2000). Des études précliniques ont mis en évidence que le taux d'expression de la thymidylate synthétase conditionne la sensibilité au 5-FU (Longley et al., 2003).

Un autre exemple de résistance par l'altération des cibles se retrouve dans le cas de mutation de la topoisomérase II. Du fait de son rôle essentiel dans la réplication de l'ADN, la topoisomérase II est une cible importante des agents chimiothérapeutiques, tels que les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine), l'étoposide ou la mitoxantrone. Ces derniers agissent en stabilisant l'intermédiaire réactionnel que constitue le complexe covalent topoisomérase II/ADN clivé sur un seul brin. Certaines mutations ponctuelles n'altèrent pas la fonctionnalité de l'enzyme, mais la rendent insensible aux drogues (Nitiss et al., 1994 ; Hsiung et al., 1996).

### 4. Réparation de l'ADN

Les cellules tumorales présentent une grande capacité à réparer leur ADN, ce qui leur confère une résistance aux traitements qui l'endommagent. La REN (Réparation par Excision des Nucléotides) est un système critique de réparation qui retire les parties endommagées de l'ADN générée par les agents chimiothérapeutiques, notamment les sels de platine, rendant des cellules résistantes. L'importance de ce mécanisme est mise en avant par le fait qu'une défaillance de ce système de réparation rend les cellules hypersensibles au cisplatine, tandis que sa correction restaure un niveau normal d'action (Chaney and Sancar, 1996). La « Excision Repair Cross-Complementing protein » (ERCC1) est un autre exemple de protéine de réparation d'ADN impliquée dans la reconnaissance des dommages dus au cisplatine

(Rosell et al., 2004). Son taux d'expression est élevé dans les cellules résistantes au cisplatine en comparaison de celui des cellules sensibles. Ce taux est également élevé dans les cellules résistantes au carboplatine (Chu, 1994).

### 5. Défaillance du système apoptotique

Les agents anticancéreux induisent de multiples lésions dans la cellule qui entre en apoptose lorsqu'elle ne peut plus les réparer. Cependant, certaines cellules tumorales présentent des mutations dans un ou plusieurs gènes impliqués dans cette voie et échappent ainsi à l'apoptose.

La protéine p53 est un inducteur d'apoptose en réponse à des dommages importants de l'ADN. L'absence d'expression ou la présence d'une protéine p53 non fonctionnelle, retrouvée dans près de 50% des tumeurs (Levine, 1997), rend les cellules insensibles aux signaux apoptotiques qui poursuivent leur division malgré d'importants dommages (Beroud et Soussi, 1998). De plus, la protéine p53 aurait un rôle dans la régulation de l'expression du gène du transporteur de drogues P-gp (glycoprotéine-P) (Bush et Li, 2002). En effet, une mutation de la p53 augmenterait l'expression de la P-gp *via* une action sur son promoteur, tandis que la protéine p53 sauvage limiterait son expression.

D'autres protéines pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bid...) et anti-apoptotiques (Bcl2, Bcl-XL...) sont également impliquées dans la chimiorésistance (Burger et al., 1999). La protéine Bcl2 intervient dans la voie mitochondriale de l'apoptose et la retarde dans les cellules exposées à des agents cytotoxiques (Walton et al., 1993). Ainsi, la surexpression de Bcl2 constitue un facteur de mauvais pronostic pour certaines tumeurs, tels que le cancer de la vessie, les lymphomes et les leucémies myéloïdes (Allouche et al., 1997). La sous-expression des protéines pro-apoptotiques implique également une insensibilité des cellules cancéreuses à certains agents chimiothérapeutiques (Makin et Dive, 2001).

### 6. Efflux actif des médicaments par les transporteurs ABC

L'un des mécanismes le plus souvent mis en oeuvre par les cellules cancéreuses pour se soustraire à l'action des agents chimiothérapeutiques est la surexpression à la membrane plasmique de pompes d'efflux de médicaments. Ces transporteurs membranaires appartiennent à la famille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette). Ils utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour expulser les molécules thérapeutiques à l'extérieur des cellules, diminuant leur concentration intracellulaire et limitant ainsi leur efficacité.



Trois transporteurs sont particulièrement concernés chez l'homme. Le premier à avoir été découvert est la Glycoprotéine-P (P-gp) (Juliano et Ling, 1976), le second la *Multidrug Resistance Protein* (MRP1) (Cole et al., 1992) et le dernier la *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP ou ABCG2) (Doyle et al., 1998 ; Allikmets et al., 1998 ; Miyake et al., 1999), présent dans 79% des tumeurs avant tout traitement (Diestra et al., 2002).

Physiologiquement présents dans de nombreux tissus, leur fonctionnement diminue la biodisponibilité d'un large spectre de médicaments, en limitant leur absorption au niveau de différents organes et en augmentant leur élimination. La compréhension de leurs rôles physiologiques et de leur implication dans le phénotype MDR apparaît donc essentielle pour lutter contre les tumeurs résistantes.

### III Les transporteurs ABC

La famille des transporteurs ABC regroupe un nombre élevé de protéines, retrouvées dans toutes les espèces, des micro-organismes jusqu'à l'Homme. Chez la bactérie, on dénombre 70 transporteurs ABC (Linton et Higgins, 1998), responsables de l'import et de l'export de nombreuses molécules différentes et de la résistance aux antibiotiques. Chez l'Homme, on retrouve 48 gènes codant pour des transporteurs ABC (Dean et al., 2001). Certaines des protéines de cette famille sont impliquées dans le phénotype de Multi-Drug Resistance (MDR), et sont responsables de la tolérance à un très large spectre de molécules sans homologie de structure, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Chez l'Homme, trois protéines sont plus particulièrement impliquées dans ce phénotype. Il s'agit de la Glycoprotéine-P, de MRP1 et d'ABCG2.

#### 1. Classification

Les transporteurs ABC ont été classés grâce à une analyse de la séquence de leurs domaines de fixation de nucléotides. Il se dégage un arbre phylogénétique de 33 clusters, correspondant à 29 familles de protéines (Dassa et Bouige, 2001) (Figure 2).

Cet arbre phylogénétique se divise en trois classes :

- La classe 1 comprend tous les exportateurs dont les domaines transmembranaires sont fusionnés aux domaines nucléotidiques (dont P-gp, MRP1 et ABCG2),
- La classe 2 comprend les protéines ABC sans domaine transmembranaire connu,

- La classe 3 comprend toutes les BDP (Binding Dependant Protein) impliquées dans la récupération des solutés de l'environnement, notamment les protéines dont les domaines transmembranaires ne sont pas fusionnés aux domaines nucléotidiques.

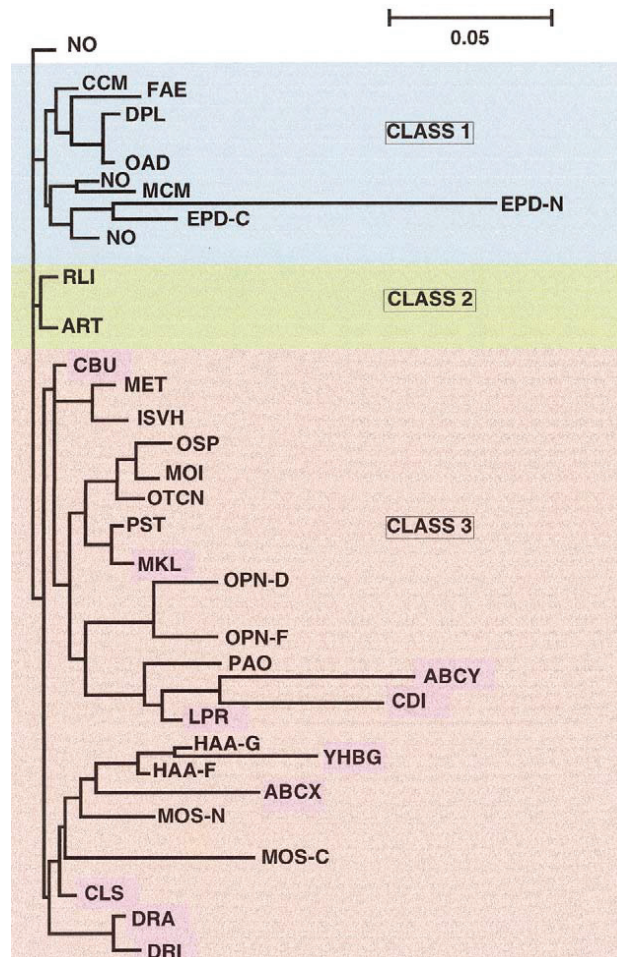


Figure 2- Arbre phylogénétique simplifié des transporteurs ABC (Dassa et Bouige, 2001)

Tous les gènes humains et murins des protéines ABC ont désormais une nomenclature standard développée par HUGO (Human Genome Organisation) (Klein et al., 1999). Le détail de cette nomenclature concernant les gènes humains peut être consulté sur le site internet : [www.nutrigenet.com/humanabc.htm](http://www.nutrigenet.com/humanabc.htm); et concernant les gènes humains et murins sur le site [www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily.abc.html](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily.abc.html). Sept sous-familles ont été identifiées et classées selon une nomenclature allant de A à G, avec à l'intérieur de chaque sous-famille, un numéro correspondant à chaque transporteur.

### 3. Topologie et organisation structurale des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC ont une structure relativement conservée, comprenant 2 domaines transmembranaires (ou TMD) qui assurent la reconnaissance des substrats et 2

domaines de fixation des nucléotides (ou NBD), qui hydrolysent l'ATP et fournissent l'énergie nécessaire au transport des drogues (Figure 3).

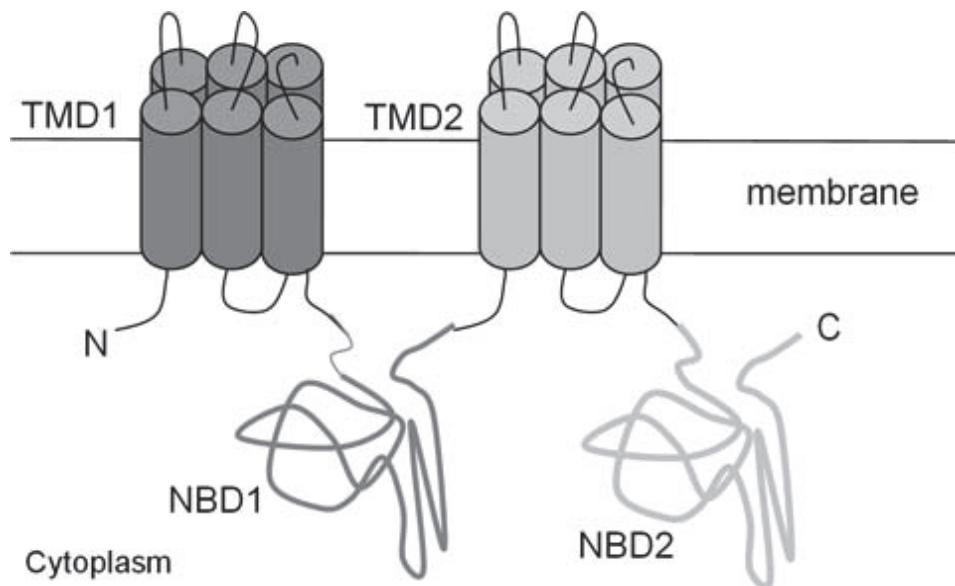


Figure 3- Topologie des transporteurs ABC (d'après Kos et Ford, 2009)

a) Les domaines transmembranaires

Ils sont constitués d'hélices  $\alpha$  transmembranaires. Chez les exportateurs entiers, on dénombre le plus souvent deux TMDs de 6 hélices  $\alpha$  chacun, reliés par des boucles. Chez les importateurs, le nombre d'hélices  $\alpha$  est plus variable. De nombreuses études montrent que les TMDs interviennent dans la spécificité de fixation et de translocation des substrats.

b) Les domaines de fixation des nucléotides

Les domaines de fixation de nucléotides sont hydrophiles et interagissent avec les boucles intracellulaires des TMDs. Ils fixent et hydrolysent l'ATP, ce qui permet la translocation des substrats. La structure de plus de 50 NBDs a été déterminée, notamment celle de HisP chez *E. coli* (Hung et al., 1998). Ces domaines sont hautement conservés chez tous les transporteurs ABC. Il existe notamment trois motifs consensus :

- Le motif A de Walker (GXXXXGKS/T), qui interagit avec la chaîne phosphate de l'ATP ou de l'ADP (Walker et al., 1982 ; Chen et al., 2003 ; Gaudet et Wiley, 2001 ; Karpowich et al., 2001)
- Le motif B de Walker (hhhhD, où h est un résidu hydrophobe) et le résidu aspartate forment une liaison de coordination avec le  $Mg^{2+}$  (Walker et al., 1982 ; Karpowich et al., 2001)

- La signature S des transporteurs ABC (LSGGQ), aussi appelée C-loop (Schmitt et Tampe, 2002)

Deux autres motifs conservés sont présents dans les NBD : la H-loop, nommée aussi «  $\gamma$ -phosphate sensor » (Smith et al., 2002) et la Q-loop, qui interviendrait dans la communication entre TMD et NBD, *via* des changements conformationnels ( Jones et George, 2002).

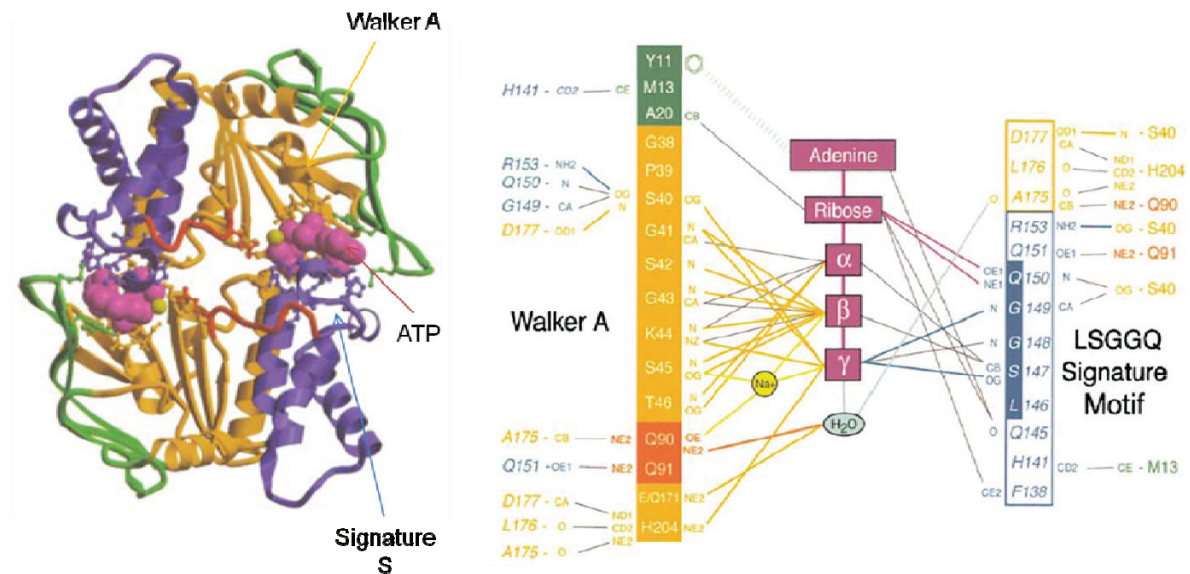


Figure 4- Cartographie des deux sites de fixation de l'ATP dans le dimère de MJ0796 (d'après Smith et al., 2002)

La plupart des transporteurs ABC dont la structure est connue sont bactériens. L'un des premiers à avoir été cristallisé est le transporteur Sav1866 de *Staphylococcus aureus* (Dawson and Locher, 2006) (Figure 5). Néanmoins, la structure de la Glycoprotéine-P murine a été récemment résolue par Aller et ses collaborateurs, avec une diffraction de 3,8 Å (Aller et al., 2009) (Figure 6).

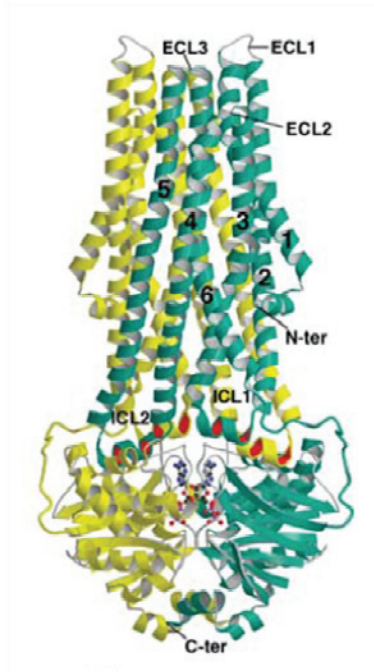


Figure 5 - Structure de Sav1866 (Dawson et al., 2006)

Les deux sous-unités sont colorées en jaune et en turquoise. L'ADP lié aux NBDs est représenté. Les hélices transmembranaires de la sous-unité turquoise sont numérotées.

ICL = IntraCellular Loop

ECL = ExtraCellular Loop

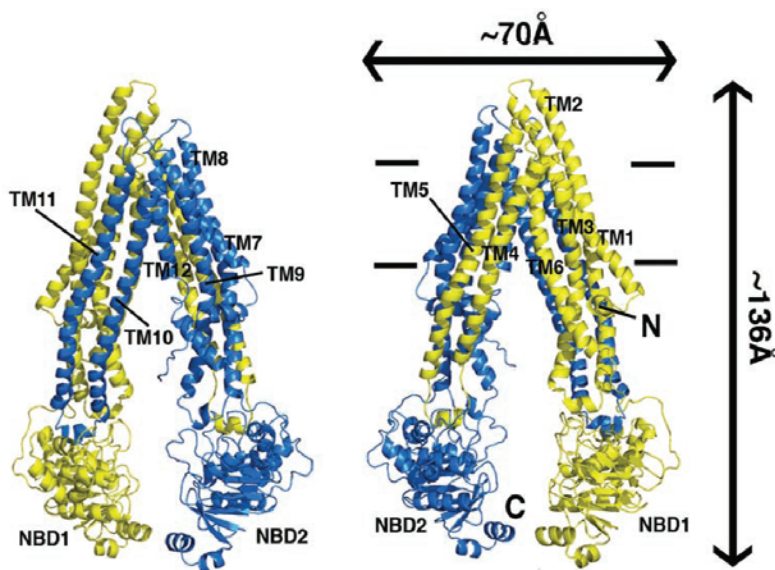


Figure 6- Structure de la Glycoprotéine-P murine (Aller et al., 2009)

A : vue de face

B : rotation de 180°

Les TMD sont numérotés de 1 à 12.

Les deux moitiés du transporteur sont en jaune et bleu, respectivement.

Les barres horizontales représentent la position approximative de la double couche lipidique de la membrane plasmique

#### 4. Mécanisme de transport

La translocation des substrats d'un côté à l'autre de la membrane plasmique nécessite une transduction de l'énergie des NBD vers les TMD. Il a été montré que la fixation de l'ATP sans hydrolyse est suffisante pour induire des changements de conformation dans les TMD de

P-gp (Rosenberg et al., 2001) et d'ABCG2 (Mc Devitt, 2006), ainsi que pour diminuer l'affinité pour les substrats (Martin et al., 2000).

Plusieurs modèles tentent d'expliquer ce mécanisme de transport. Le plus couramment utilisé est « l'ATP switch model » (Higgins et Linton, 2004) (Figure 7), dont on peut décrire les étapes comme suit :

- Etape I : fixation du substrat sur les TMD, qui augmente l'affinité du transporteur pour l'ATP et provoque le passage de la conformation ouverte vers la conformation fermée du dimère.
- Etape II : le changement conformationnel expose le site de fixation des drogues du côté extracellulaire. Le substrat est libéré.
- Etape III : l'ATP est hydrolysé.
- Etape IV : le dimère reprend sa conformation ouverte.

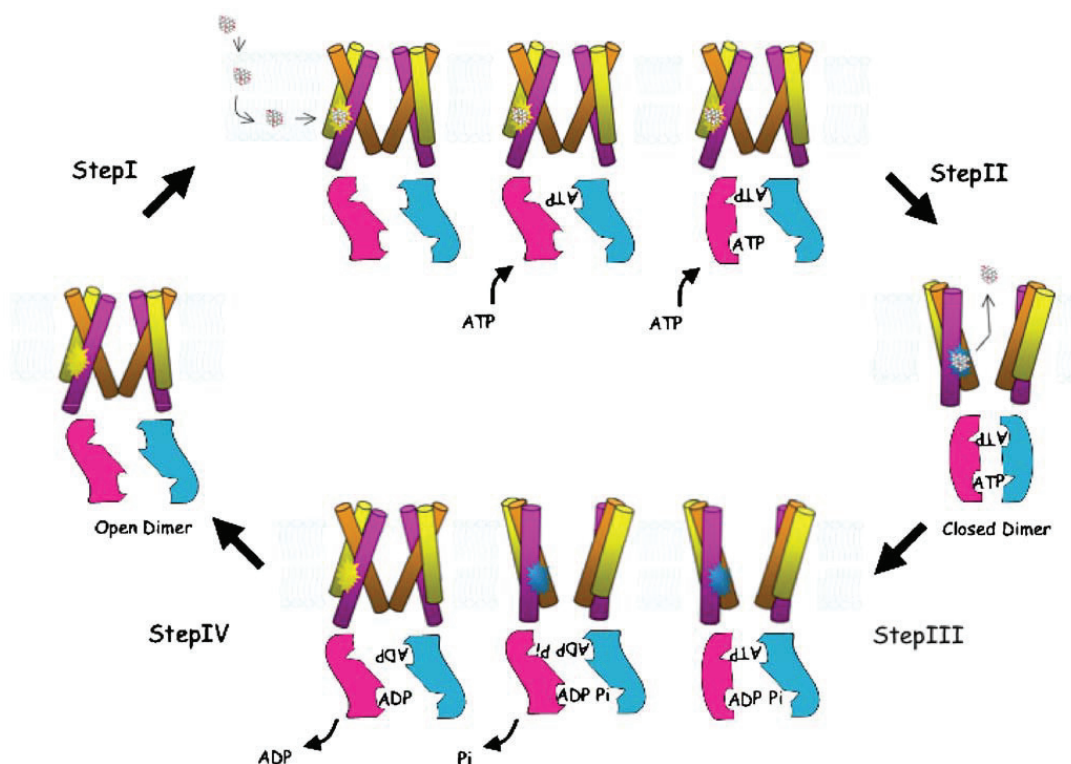


Figure 7-Modèle de transport des drogues "ATP switch model" (Higgins et Linton, 2004)

La dimérisation des NBDs par la fixation de l'ATP a été décrite comme l'une des étapes les plus énergétiques du cycle catalytique (Smith et al., 2002). L'étude menée par Orelle et ses collaborateurs sur BmrA appuie cette hypothèse. Ils montrent en effet que la dimérisation des NBDs ATP-induite produit un changement conformationnel suffisamment

important pour déstabiliser les assemblages supramoléculaire en roulette de BmrA (Orelle et al., 2008).

D'autres modèles ont été proposés, notamment « l'occlusion-induced switch model », par Sauna et Ambudkar (Sauna et al, 2006). Les auteurs avancent que le relargage du substrat serait conditionné à l'occlusion des deux molécules d'ATP et à l'hydrolyse de l'une d'elles. La conformation ouverte de départ serait alors retrouvée par l'hydrolyse de la deuxième molécule d'ATP.

L'obtention de structures cristallographiques de transporteurs bactériens, tels que Sav1866 (Dawson et al., 2007) ou BtuCD (Locher et al., 2002) a permis une meilleure compréhension du mécanisme de couplage entre les TMD et les NBD. Il semble que des hélices de couplage transmettent les changements conformationnels induits par la fixation d'ATP, ou son hydrolyse et son relargage (Dawson et al., 2007) (Figure 8).

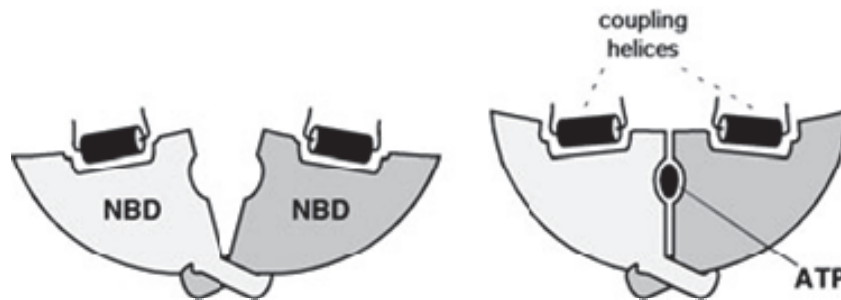


Figure 8- Schéma du changement de conformation des NBD induit par la fixation d'ATP par l'intermédiaire des hélices de couplage (Dawson et al., 2007)

## 5. Transporteurs bactériens : l'exemple de BmrA

On dénombre 70 transporteurs ABC chez la bactérie, dont l'impact sur la physiologie bactérienne est important. En effet, certains transporteurs interviennent dans la viabilité, la virulence et la pathogénicité bactérienne (Davidson et al., 2008). On peut citer l'exemple les importateurs de fer, qui sécrètent des sidérophores qui lient le fer des « high affinity iron-binding proteins », comme la ferritine ou la lactoferrine, ou des composants des érythrocytes, comme l'hème ou l'hémoglobine chez leur hôte. Ces transporteurs importent ensuite le complexe sidérophore-fer (Köster, 2001).

Les transporteurs ABC participent également à la résistance aux antibiotiques, en effluant les composés délétères pour la bactérie. Ce mécanisme est à l'origine d'un problème majeur de santé publique, croissant depuis la découverte des premiers antibiotiques au début du XX<sup>ème</sup> siècle. BmrA, dans un premier temps appelée YvcC, est un transporteur exprimé chez *Bacillus subtilis* dont l'activité de transport de drogues est strictement dépendante de son

activité ATPasique. Son spectre de transport recouvre en partie celui du transporteur humain P-gp. BmrA est notamment capable de transporter le Hoechst 33342, la doxorubicine et la 7-aminoactinomycine D (Steinfels et al., 2004).

Les transporteurs ABC bactériens ont été les premiers à être cristallisés et l'analyse des données cristallographiques a apporté un éclairage important sur la structure tridimensionnelle de ces protéines. La structure précise de BmrA reste encore mal connue, malgré l'obtention d'une structure tridimensionnelle à basse résolution (25 Å) en reconstitution en bicouche lipidique. Les données obtenues suggèrent que BmrA se présenterait en homodimère (Chami et al., 2002).



## 6. Transporteurs humains

### a) Sous familles

Chez l'homme, les 49 gènes recensés ont été classés en 7 sous-familles, de ABCA à ABCG dans le système de nomenclature HUGO, d'après l'analyse de leurs séquences.

- La sous-famille ABCA

Elle compte 14 membres, dont ABCA1, dont l'un des mutants (délétion en position G1764) est responsable de la maladie de Tangier (Bodzioch et al., 1999) et ABCA4 dont les mutations provoquent de sévères rétinopathies.

- La sous-famille ABCB

Elle comprend trois transporteurs entiers, exprimé à la membrane plasmique, à savoir ABCB1 (P-gp), ABCB4 et ABCB11. Les autres transporteurs de cette famille sont des demi-transporteurs situés dans le réticulum endoplasmique (ABCB2 et ABCB3 ou TAP1 et TAP2), dans la mitochondrie (ABCB6, ABCB7, ABCB8 et ABCB10) ou dans les lysosomes (ABCB9).

- La sous-famille ABCC

Elle comporte 12 transporteurs entiers, dont la plupart sont situés à la membrane plasmique et transportent des ions organiques ou des drogues. C'est le cas d'ABCC1 (MRP1), impliqué dans le phénotype MDR, ABCC6, ABCC10 et ABCC11. Un autre transporteur connu de cette famille est ABCC7 (CFTR). C'est un canal chlorure dont certaines mutations notamment la mutation de la phénylalanine 508) entraînent la mucoviscidose.

- La sous-famille ABCD

Elle compte 4 demi-transporteurs situés à la membrane du peroxysome, dont la dimérisation est nécessaire à leur fonctionnalité.

- Les sous-familles ABCE et ABCF

Elles regroupent des protéines composées seulement de domaine de fixation de nucléotides.

- La sous-famille ABCG

Elle est composée de 5 demi-transporteurs dont le NBD précède le TMD. Parmi ces transporteurs, ABCG2 est responsable du phénotype MDR. Les autres membres de cette famille sont impliqués dans le transport de stérols, notamment le cholestérol. C'est le cas de ABCG5 et ABCG8 qui forment un hétérodimère.

b) 3 principales protéines impliquées dans le phénotype MDR

Trois protéines ABC sont impliquées chez l'Homme dans le phénotype de résistance à de multiples drogues. La surexpression, le plus souvent acquise, de ces protéines dans les cellules cancéreuses rendent les traitements chimiothérapeutiques inefficaces, ce qui cause de nombreux problèmes pour la prise en charge thérapeutique des patients (Sarkadi et al., 2006).

i) Glycoprotéine P

Découverte en 1976 par Juliano et Ling, elle est le produit du gène *MDR1*, localisé sur le chromosome 7q21 (Juliano et Ling, 1976). C'est une protéine de 170 kDa dont l'organisation structurale est classique, à savoir deux moitiés homologues constituées chacune d'un TMD et d'un NBD cytoplasmique, reliées entre elles par une région linker (Chen et al., 1990) (Figure 9). Physiologiquement, la glycoprotéine P est impliquée dans la détoxification de l'organisme, notamment au niveau des barrières hémato-encéphalique, placentaire et intestinale (Begley, 2004 ; Lankas et al., 1998 ; Thiebaut et al., 1987).

ii) MRP1

MRP1 a été découverte en 1989 dans deux lignées cellulaires sélectionnées par la doxorubicine, H69/AR et HT 1080/DR4. Le gène de cette protéine a été cloné en 1992 et MRP1 fut le premier représentant de la sous-famille des MRP (Multidrug Resistance-associated Protein) (Cole et al., 1992). Au niveau structural, MRP1 possède un domaine transmembranaire additionnel du côté *N*-terminal par rapport à P-gp. Ce domaine, nommé MSD0, comporte 5 hélices transmembranaires (Nagata et al., 2000) (Figure 9). MRP1 est bien exprimée au niveau des poumons, des testicules, du rein, des muscles cardiaque et squelettiques et du placenta (Cole et al., 1992 ; Flens et al., 1996). Elle possède de nombreux substrats physiologiques, dont le leucotriène C4 et ses métabolites, ainsi que le glutathion (Loe et al., 2000 ; Leier et al., 1996).

iii) BCRP ou ABCG2

ABCG2 est la troisième protéine impliquée dans le phénotype MDR à avoir été découverte. Sa structure, ses localisations et ses fonctions sont détaillées ci-dessous.

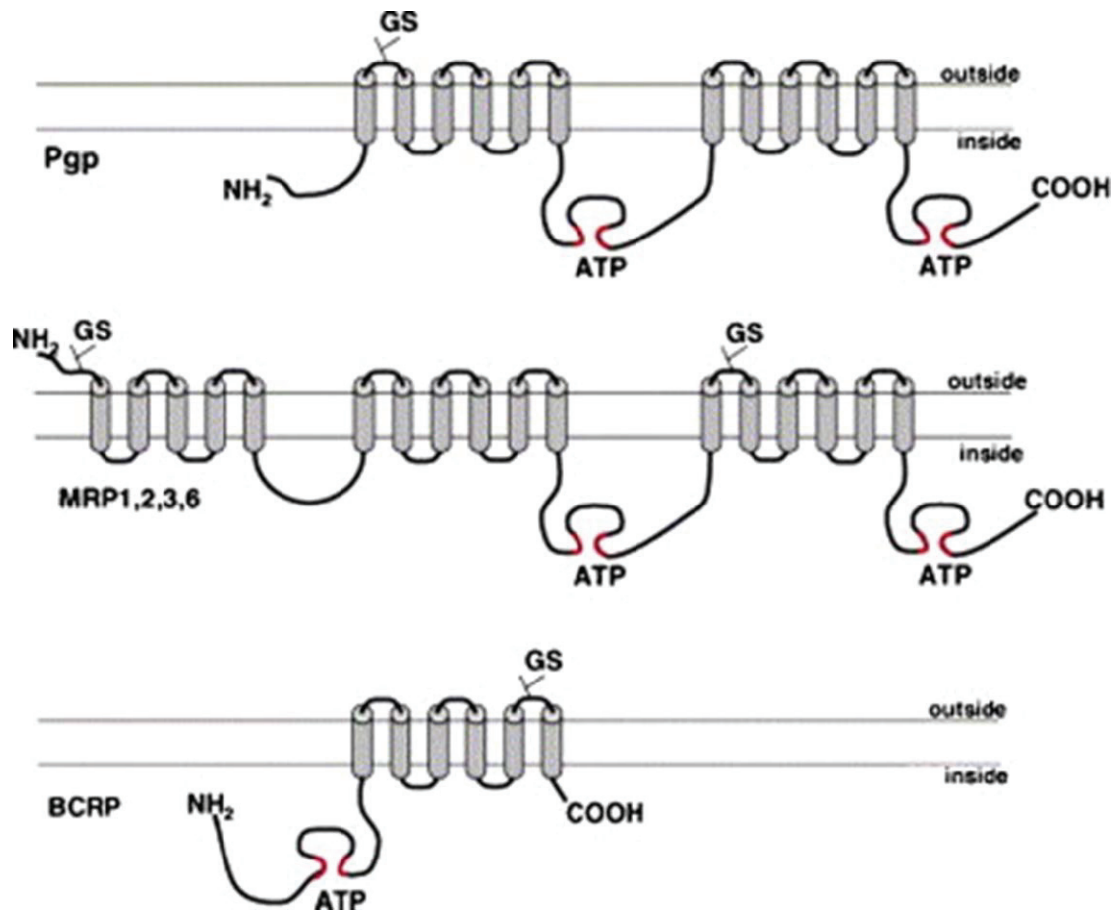


Figure 9 - Topologie des transporteurs ABC MDR (d'après Loscher et al., 2005 )

## 7. ABCG2

### a) Découverte

La protéine ABCG2 a été découverte il y a une douzaine d'années par trois équipes différentes à quelques mois d'intervalle. En effet, Doyle et ses collaborateurs clonent les premiers le gène responsable d'un phénotype de résistance d'une lignée cellulaire de cancer du sein, MCF-7 Adr/Vp (Doyle et al., 1998). Ils nomment alors la protéine BCRP pour *Breast Cancer Resistance Protein*. La même année, Allikmets et son équipe découvrent le même gène en cartographiant le chromosome 4q22, et le clonent à leur tour. L'expression de ce gène étant importante dans le placenta, la protéine est nommée ABCP pour *ABC transporter in Placenta* (Allikmets et al., 1998). Enfin, le groupe de Susan Bates clone un gène d'une lignée cellulaire de carcinome de colon S1-M1-80 hautement résistante à la mitoxantrone. Ils l'appellent MXR pour *Mitoxantrone Resistance-associated gene* (Miyake et al., 1999)

L'analyse phylogénétique montre que cette protéine appartient à la sous-famille des protéines ABCG, et est donc nommée ABCG2 par la nomenclature HUGO.

## b) Structure et polymorphismes

ABCG2 est une protéine de 655 acides aminés qui possède une masse de 72,1 kDa. C'est un demi-transporteur qui s'homodimérise pour devenir fonctionnel (Doyle et al., 1998 ; Kage et al., 2002). Chaque demi-transporteur est constitué d'un domaine de fixation de nucléotides en position *N*-terminale, suivi d'un TMD constitué de 6 hélices transmembranaires, reliées entre elles par des boucles intra- et extracellulaires. La troisième boucle extracellulaire, que l'on nommera ECL3, est de grande taille (environ 60 à 80 résidus selon les auteurs) et est spécifique d'ABCG2. La structure tridimensionnelle d'ABCG2 n'est pas connue, mais de nombreux auteurs ont proposé des modèles, en se basant sur les structures d'autres ABC comme Sav1866, ou sur des résultats expérimentaux obtenus à partir d'insertion d'épitopes ou de cristallisation 2D (Hazai et Bikadi, 2008 ; Wang et al., 2008 ; Rosenberg et al., 2010). ECL3 est glycosylée en position N596, mais cette glycosylation n'est nécessaire ni à l'expression, ni à la fonction de transport d'ABCG2 (Mohrmann et al., 2005 ; Diop et al., 2005) (Figure 9). ABCG2 possède en outre 7 résidus cystéines, dont trois sont localisés au niveau d'ECL3 (C592, C603 et C608). La cystéine 603 a été décrite pour être impliquée dans la dimérisation du transporteur (voir plus bas), tandis que les cystéines 592 et 608 forment un pont disulfure intramoléculaire potentiellement impliqué dans l'adressage et la fonction de transport d'ABCG2 (Henriksen et al., 2005 ; Wakabayashi et al., 2005 ; Liu et al., 2008) (Figure 10). La présence de ce pont intramoléculaire est indispensable à la reconnaissance par l'anticorps conformationnel 5D3 spécifique d'ABCG2. En effet, sa réduction par un agent réducteur comme le DTT entraîne une non-reconnaissance par le 5D3 (Ozvegy-Laczka et al., 2005 ; Ozvegy-Laczka et al., 2008).

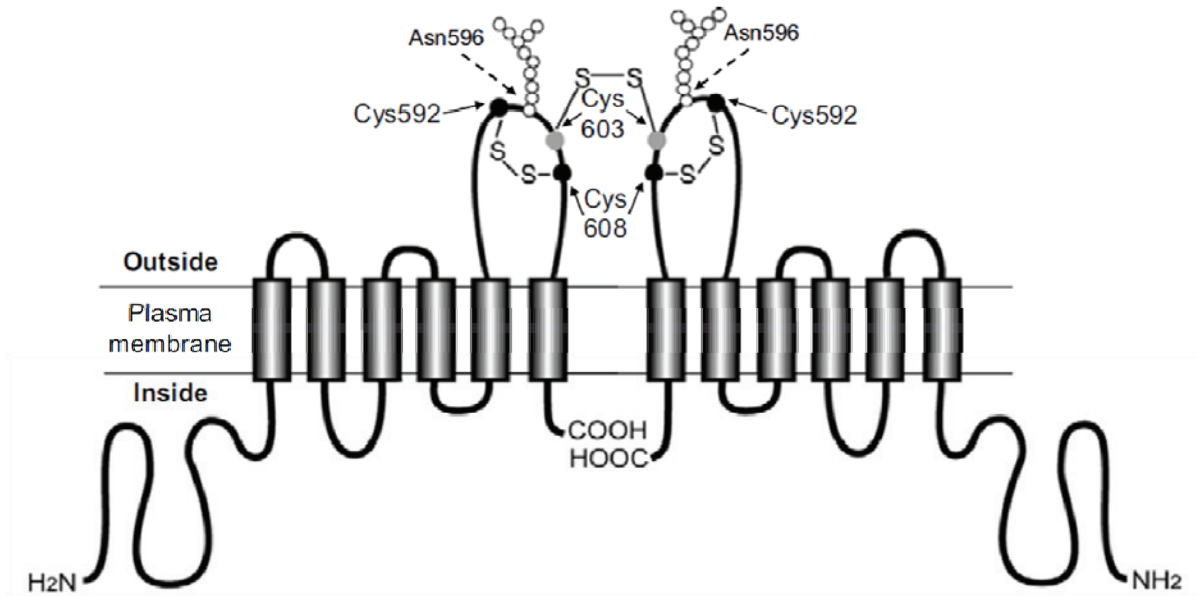


Figure 10 - Schéma des ponts disulfures intra- et intermoléculaires d'ABCG2 (d'après Wakabayashi et al., 2005)

Le pont disulfure entre deux cystéines 603 permet la formation de l'homodimère. Les cystéines 592 et 608 forment un pont intramoléculaire. Le site de glycosylation en position 596 est représenté.

Il existe plusieurs polymorphismes pour ABCG2. Le plus étudié est la mutation du résidu arginine en position 482, R482T et R482G. Ces mutations ont été mises en évidence dans des lignées cellulaires en sélection, mais n'ont jamais été retrouvées *in vivo* (Honjo et al., 2001). Ces mutations sont considérées comme des "gains de fonction" puisque les mutants R482T et R482G sont capables de transporter certains substrats non pris en charge par la forme sauvage, comme la doxorubicine, la daunorubicine et la rhodamine 123 (Robey et al., 2003). Ce gain de fonction ne semble cependant pas être dû à des changements de fixation de ces composés, puisque la forme sauvage les fixe aussi, sans pour autant les transporter (Pozza et al., 2006). D'autres polymorphismes ont été mis en évidence chez des patients, avec des conséquences différentes sur la fonction de transport de la protéine. Pour revue, on peut se reporter à la publication de Hazai et Bikadi de 2008 (Hazai et Bikadi, 2008). L'effet particulier des polymorphismes sur le transport des porphyrines par ABCG2 sera détaillé plus loin.

### c) Dimérisation

La formation du pont disulfure entre deux résidus cystéine 603 participerait à la dimérisation du transporteur, sans que sa présence soit indispensable à la localisation ni à la

fonctionnalité de la protéine (Henriksen et al., 2005 ; Kage et al., 2005). De plus, la formation de ce pont n'est pas suffisante à la dimérisation (Ni et al., 2010).

D'autres études mettent en avant la participation de différentes régions à la dimérisation d'ABCG2. Le motif GXXXG, connu pour être impliqué dans la dimérisation d'autres protéines membranaires (Russ et Engelman, 2002), a été étudié dans ABCG2. La mutagenèse de ces résidus a conduit à une perte de la fonction de transport de certaines drogues, sans que son implication au niveau de la dimérisation ait pu être prouvée (Polgar et al., 2004). Il semblerait néanmoins que le résidu thréonine 402, adjacent au motif GXXXG, puisse être impliqué dans la dimérisation du transporteur (Polgar et al., 2010). Xu et ses collaborateurs montrent par des techniques biochimiques qu'ABCG2 serait majoritairement sous forme d'homo-oligomère, tétra- et octamérique, avec un domaine d'oligomérisation localisé entre les TM5 et 6 (Xu et al., 2007). Ces résultats, bien que surprenants, sont en accord avec les observations de cryomicroscopie de McDevitt qui décrit une structure octamérique (McDevitt et al., 2006) et avec celles de Rosenberg et de l'équipe de Daniel Levy qui observent des tétramères (Rosenberg et al., 2010 ; Dezi et al., sous presse).

### d) Localisation

#### i) Tissulaire

ABCG2 est exprimée physiologiquement dans de nombreux tissus de l'organisme. Elle est particulièrement abondante dans le foie, les intestins, le placenta, la barrière hémato-encéphalique, la glande mammaire et les cellules souches (Doyle et al., 1998 ; Doyle et Ross, 2003 ; Faneyte et al., 2002 ; Zhou et al., 2001). En revanche, elle est absente de certains tissus, comme le cœur, les poumons et les reins. La Figure 11 récapitule les principaux sites d'expression de la protéine ABCG2.

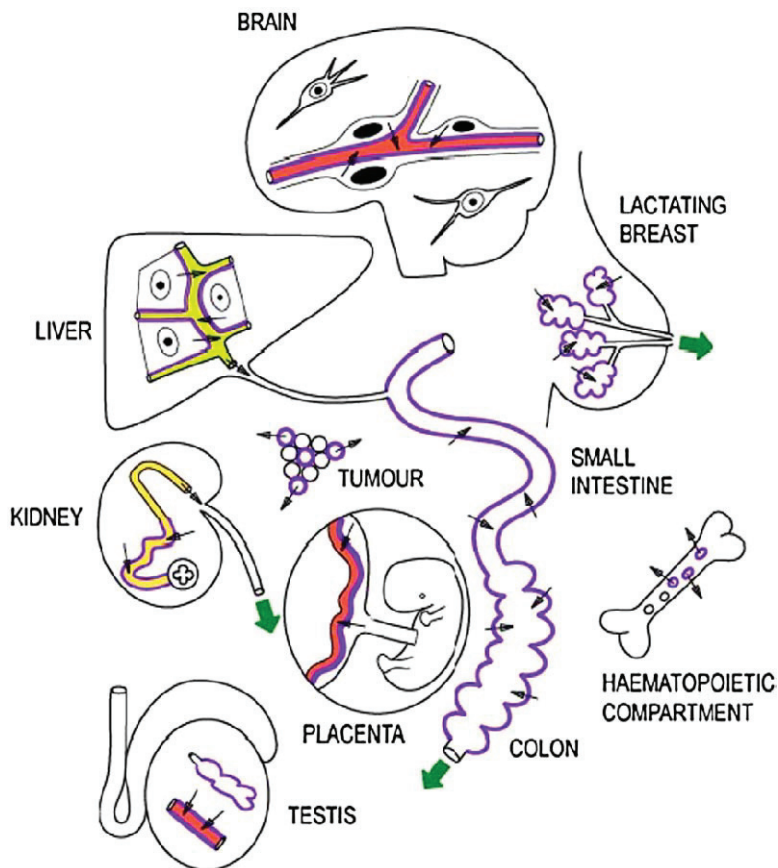


Figure 11 - Vue schématique de l'expression d'ABCG2 dans l'organisme (d'après Vlaming et al., 2009)

Les lignes violettes indiquent la localisation d'ABCG2. A chaque site d'expression, les petites flèches indiquent la direction du transport par ABCG2. Les flèches vertes indiquent l'excrétion des substrats de l'organisme.

ii) Cellulaire

L'expression d'ABCG2 est essentiellement localisée à la membrane plasmique, du côté apical des cellules polarisées (Scheffer et al., 2000 ; Rocchi et al., 2000 ; Maliepaard et al., 2001). Dans une moindre mesure, d'autres études ont mis en évidence l'expression de la protéine dans les lysosomes (Rajagopal et Simon, 2003) et plus récemment au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Solazzo et al, 2009).

e) Dégradation

La dégradation d'ABCG2 interviendrait selon deux voies différentes ; la protéine mature serait éliminée par les lysosomes, tandis que certaines formes mutées, mal repliées ou manquant de maturation seraient dégradées *via* le protéasome, après ubiquitination (Wakabayashi et al., 2007, 2008 et 2009 ; Nakagawa et al., 2008). En effet, Wakabayashi et ses collaborateurs montrent que certains polymorphismes, comme Q141K, F208S et S441N conduisent à des protéines immatures peu ou pas exprimées, et dont les quantités augmentent en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG132 (Furukawa et al., 2009 ; Nakagawa et al., 2008). Le même phénomène est observé pour les formes non glycosylées d'ABCG2

(Nakagawa et al., 2009), ainsi que pour celles ne présentant pas de pont disulfure intramoléculaire C592-C608 (Wakabayashi et al., 2007).

### f) Rôles physiologiques

ABCG2 possède de nombreux rôles physiologiques, en lien avec ses localisations tissulaires, détaillés dans des revues récentes (Sarkadi et al., 2006 ; Vlaming et al., 2009).

#### i) Protection contre les endo- et xénobiotiques

##### • Niveau intestinal

L'expression d'ABCG2 dans le tractus intestinal suggère un rôle de cette protéine dans l'absorption des médicaments. En effet, plusieurs études montrent qu'ABCG2 en limite l'absorption ainsi que celle de composés présents dans l'alimentation (Jonker et al., 2002 ; Alfaras et al., 2010). De ce fait, ABCG2 participerait à la première ligne de défense contre des composés potentiellement toxiques (Sarkadi et al., 2006 ; Szakács et al., 2008).

##### • Barrière hémato-encéphalique

ABCG2 est retrouvée du côté luminal des cellules endothéliales du cerveau (Cooray et al., 2002). Sa localisation en fait un bon candidat pour la protection vis à vis des médicaments. En effet, il semble que la présence d'ABCG2 soit préjudiciable à la pénétration de l'imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase (Breedveld et al., 2005). Il faut toutefois noter que l'action d'ABCG2 au niveau du cerveau est moins bien documentée que celle de P-gp, largement exprimé dans cet organe (Schinkel et al., 1996).

##### • Barrière placentaire

La membrane apicale des syncytiotrophoblastes du placenta est l'un des principaux sites d'expression d'ABCG2. Son taux y est en effet 100 fois supérieur à celui d'autres organes comme le cerveau ou les intestins (Doyle et al., 1998). Ceci suggère un rôle important de protection du fœtus, en favorisant l'efflux des drogues et des toxines du placenta vers la circulation sanguine maternelle. Plusieurs études démontrent cette hypothèse, où l'on observe une diminution du taux fœtal des drogues en présence d'ABCG2 par rapport au contrôle (Jonker et al., 2000 ; Zhang et al., 2007 ; Cygalova et al., 2008).

#### ii) Rôle au niveau des glandes mammaires

Au niveau des glandes mammaires, ABCG2 est localisée du côté apical des cellules épithéliales alvéolaires, principal lieu de production du lait. Son expression est multipliée par 30 en période de lactation et diminue avec le sevrage, ce qui suggère une implication dans l'apport de nutriments dans le lait maternel (Jonker et al., 2005). Son rôle est cependant



ambivalent dans cet organe, car malgré sa capacité à transporter plusieurs vitamines dans le lait, telle la vitamine B2 ou riboflavine (Van Herwaarden et al., 2007), ABCG2 est également responsable de l'accumulation de toxines et de substances médicamenteuses comme la nitrofurantoïne ou la ciprofloxacine (Jonker et al., 2005 ; Merino et al., 2005 ; Merino et al., 2006).

iii) Protection des cellules souches

ABCG2 est très exprimée au niveau des cellules souches, notamment hématopoïétiques (Zhou et al., 2001). L'activité qu'elle exerce dans ces cellules est développée plus loin dans le détail.

g) Substrats et inhibiteurs

i) Substrats d'ABCG2

ABCG2 a la capacité de transporter un large spectre de molécules endogènes et exogènes (Figure 12, Figure 13). Les premiers substrats à avoir été mis en évidence sont les agents chimiothérapeutiques comme la mitoxantrone, le flavopiridol et l'irinotécan (Miyake et al., 1999 ; Robey et al., 2001). ABCG2 transporte également des molécules d'autres classes pharmacologiques, comme les antiviraux ou les antibiotiques (Wang et al., 2003 ; Mérimo et al., 2005), ainsi que des composés naturels exogènes, comme les flavonoïdes (Ahmed-Belkacem et al, 2005) ou le phéophorbide a (Jonker et al., 2002 ; Robey et al., 2004) et endogènes, tels la protoporphyrine IX (Zhou et al., 2005), l'acide urique (Woodward et al., 2009) et les oestrogènes (Imai et al., 2002 et 2003).

Les mutants « gain de fonction » R482T et R482G sont également capables de transporter des anthracyclines (anti-cancéreux), comme la daunorubicine et la doxorubicine (Robey et al., 2003), ainsi que la rhodamine 123.



Figure 12 - Structure chimique de trois substrats d'ABCG2

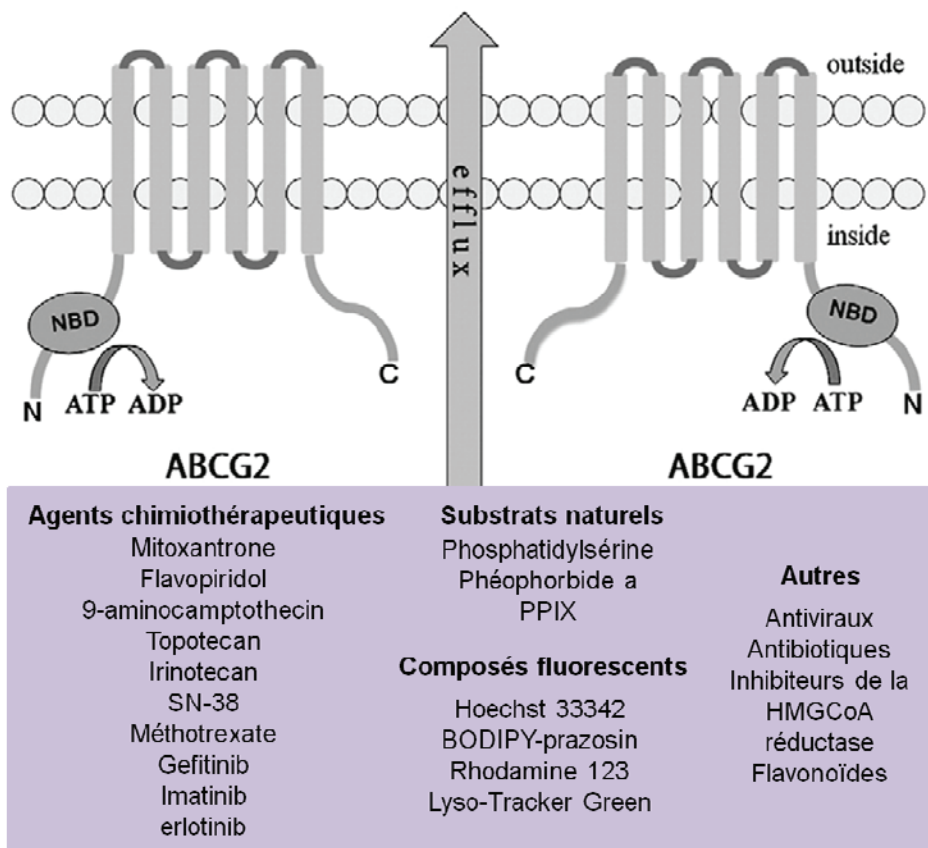


Figure 13 - Schéma d'ABC G2 et liste (non exhaustive) de ses substrats (d'après Ding et al., 2010)

ii) Les inhibiteurs d'ABC G2

Plusieurs inhibiteurs d'ABC G2 ont été découverts ces dernières années. Parmi ceux-ci, on distingue les inhibiteurs spécifiques d'ABC G2, comme la fumitrémorgine C (FTC) et son analogue le KO143 (Rabindran et al., 1998 ; Allen et al., 2002), ou certains composés stéroïdes (Imai et al., 2002) et les inhibiteurs efficaces également sur P-gp et/ou MRP1, comme le GF 120918 (De Bruin et al., 1999). Les inhibiteurs de tyrosines kinases, comme l'imatinib et le géfitinib, constituent également une nouvelle classe d'agents reversants d'ABC G2 (Erllichman et al., 2001 ; Nakamura et al., 2005).

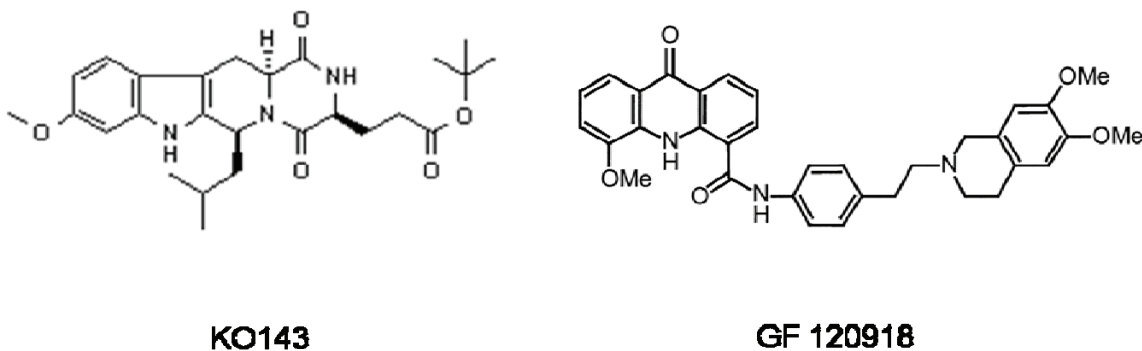


Figure 14 - Structure de deux inhibiteurs d'ABC G2

## IV Homéostasie de l'hème : quel(s) rôle(s) pour ABCG2 ?

Les porphyrines sont à la base des molécules que l'on peut qualifier de « pigments de la vie », telle que la chlorophylle, l'hème et la vitamine B12 (cobalamine). L'hème est un groupement prosthétique issu de la coordination d'un atome de fer  $Fe^{2+}$  dans le cycle tétrapyrrole de la protoporphyrine IX. Sa synthèse a lieu dans les compartiments cytoplasmiques et mitochondriaux, selon une voie enzymatique très conservée. Elle est réalisée majoritairement dans les cellules hématopoïétiques en développement dans la moelle osseuse, mais également dans le foie pour la production d'enzymes, à hauteur de 15 %.

L'hème joue un rôle vital dans de nombreuses réactions biologiques chez l'homme. Il est notamment impliqué dans la respiration et le métabolisme cellulaires, le développement et la différenciation cellulaires, la transduction de signal et la détoxification. Cependant, l'hème, et plus largement les porphyrines, sont des molécules qui peuvent se révéler très toxiques lorsque leur taux est mal régulé. En effet, une accumulation de porphyrines dans les tissus peut être à l'origine de la formation d'espèces réactives de l'oxygène, de photosensibilité et de maladies, les porphyries, dont le type dépend du précurseur en excès. Il est donc indispensable pour les cellules de maintenir très rigoureusement l'homéostasie de l'hème et des porphyrines, afin de garantir leur action et de prévenir leurs effets délétères.

ABCG2 est exprimée à la membrane plasmique de nombreuses cellules de l'organisme, et notamment des progéniteurs hématopoïétiques. Connue pour participer de façon importante à la détoxification de nombreux composés endo- et exogènes, il a été démontré qu'ABCG2 a la capacité de fixer de l'hème (Krishnamurthy et al., 2004) et de transporter des porphyrines (Jonker et al., 2002 ; Zhou et al., 2005). Ceci permet de penser qu'ABCG2 joue un rôle dans l'homéostasie des porphyrines, et en particulier de l'hème.

### 1. Métabolisme de l'hème et rôles physiologiques

#### a) Structure des composés porphyriques

Les composés porphyriques sont constitués d'un cycle de 4 pyrroles, liés par des ponts méthènes, et qui portent des substituants (Tsiftoglou et al., 2006) (Figure 15). Dans le cas de l'hème, un atome de fer  $Fe^{2+}$  est coordonné au noyau tétrapyrrole, qui porte 4 groupements méthyle, 2 propionates et 2 groupements vinyle. Au sein de l'hémoglobine, le fer de l'hème lié à un résidu histidine de la chaîne de globine est dans un état ferreux ( $Fe^{2+}$ ), afin de permettre la combinaison réversible avec un atome d'oxygène (Tsiftoglou et al., 2006). L'oxydation du fer ferreux en fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) et la présence d'un ion chlore transforme

l'hème en hémine. Il existe plusieurs types d'hème naturels (hème a, b, c d et d1) et l'hème b représente la structure de base dont les autres sont dérivés.

La protoporphyrine IX (PPIX) est le précurseur direct de l'hème. Il a la même structure, mais sans l'atome de fer. Au cours de la biosynthèse de l'hème, on peut voir apparaître de la zinc-protoporphyrine IX (ZnPPIX), où l'atome de zinc remplace le fer en cas de carence martiale (Labbé, 1989). Il existe également un dérivé contenant du cobalt (CoPPIX).

Parmi les autres composés porphyriniques, on retrouve le phéophorbide a (PhA), dérivé de la chlorophylle apparaissant lors de son catabolisme. Comme la protoporphyrine IX, le phéophorbide a est un composé non métallique.

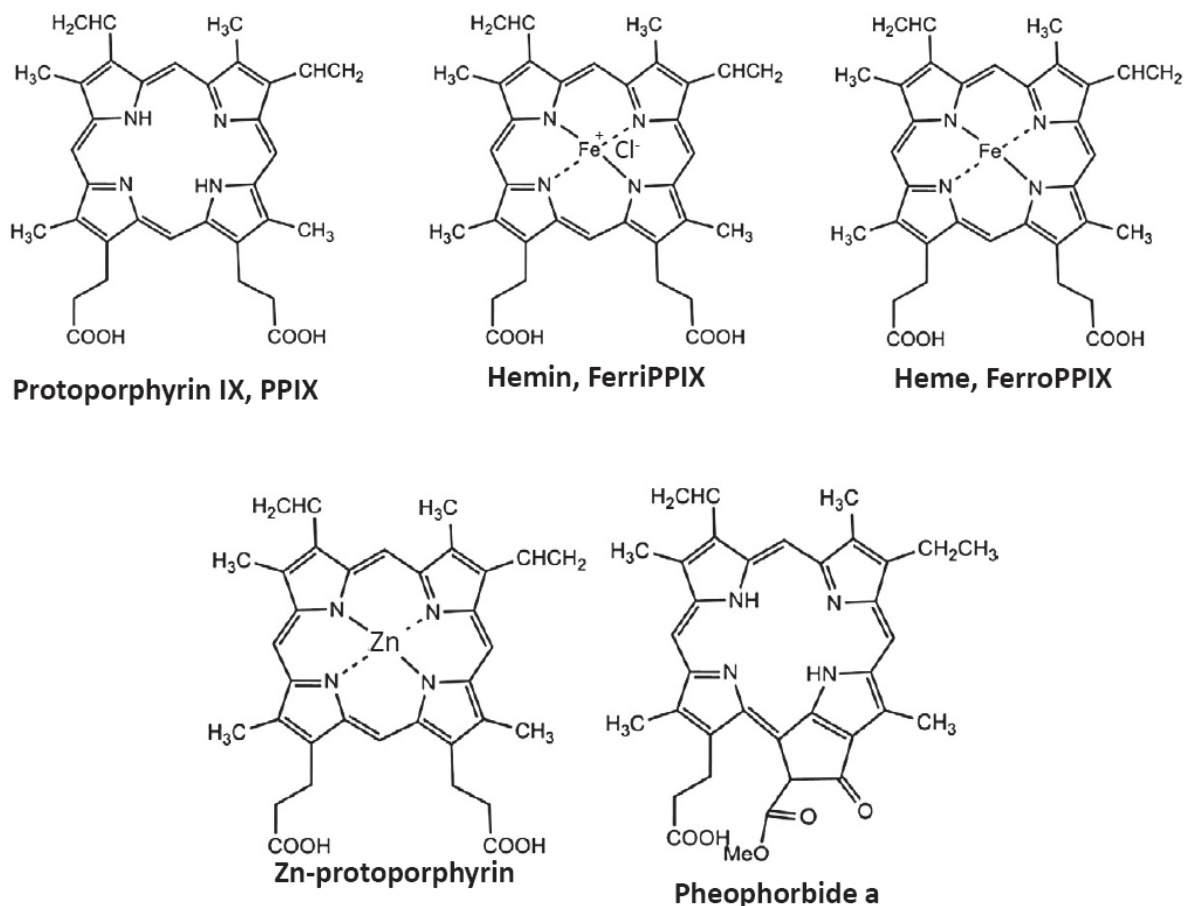


Figure 15- Structure des composés porphyriniques.

#### b) Biosynthèse et catabolisme

La biosynthèse de l'hème comprend plusieurs étapes (Figure 16). La première et les trois dernières ont lieu dans la mitochondrie, tandis que les autres se déroulent dans le cytoplasme (Sassa, 1976 ; Woodard et Dailey, 2000). Ce mécanisme fait intervenir plusieurs

enzymes, dont les structures ont pu être déterminées. L'initiation de la synthèse est réalisée dans la mitochondrie par la formation d'acide  $\delta$ -aminolevulinique (ALA) par l'ALA synthase, à partir de glycine et de succinyl-Coenzyme A. Cette étape est considérée comme l'étape limitante de la synthèse d'hème. L'ALA est ensuite transformé dans le cytoplasme par plusieurs enzymes, jusqu'à l'obtention de coproporphyrinogène III (CPIII). Celui-ci est de nouveau transporté dans la mitochondrie où il est modifié pour obtenir la protoporphyrine IX. La dernière étape de cette voie de synthèse correspond à l'intégration d'un atome de fer  $Fe^{2+}$  par la ferrochelatase pour obtenir l'hème. Cette étape a lieu à la surface interne de la membrane interne de la mitochondrie (Ajioka et al., 2006). L'hème synthétisé régule ensuite la synthèse d'ALA par un rétrocontrôle négatif exercé sur l'ALA synthase (Kaasik et Lee, 2004). Lors de certaines anémies par carence en fer, un atome de zinc peut être incorporé à la place du fer, donnant lieu à la zinc-protoporphyrine IX.

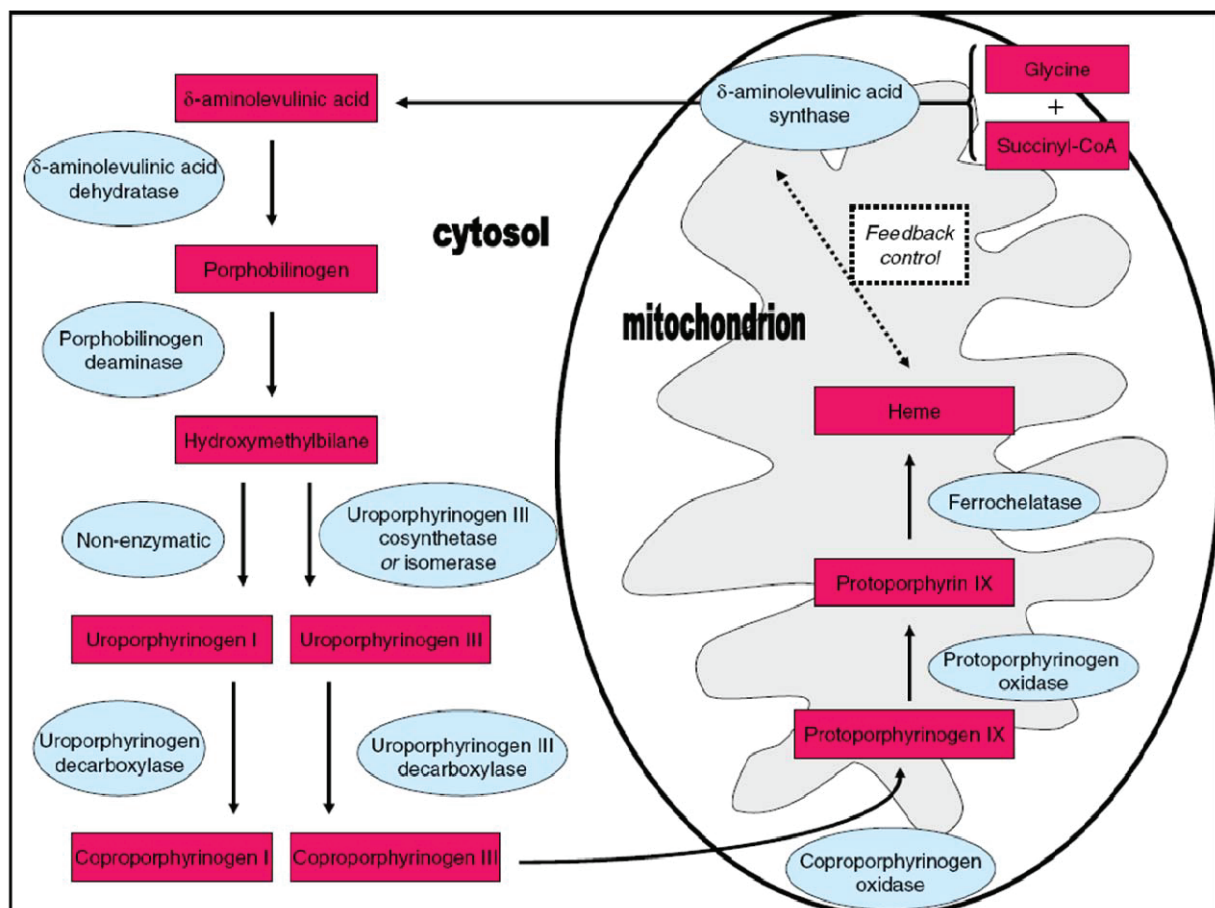
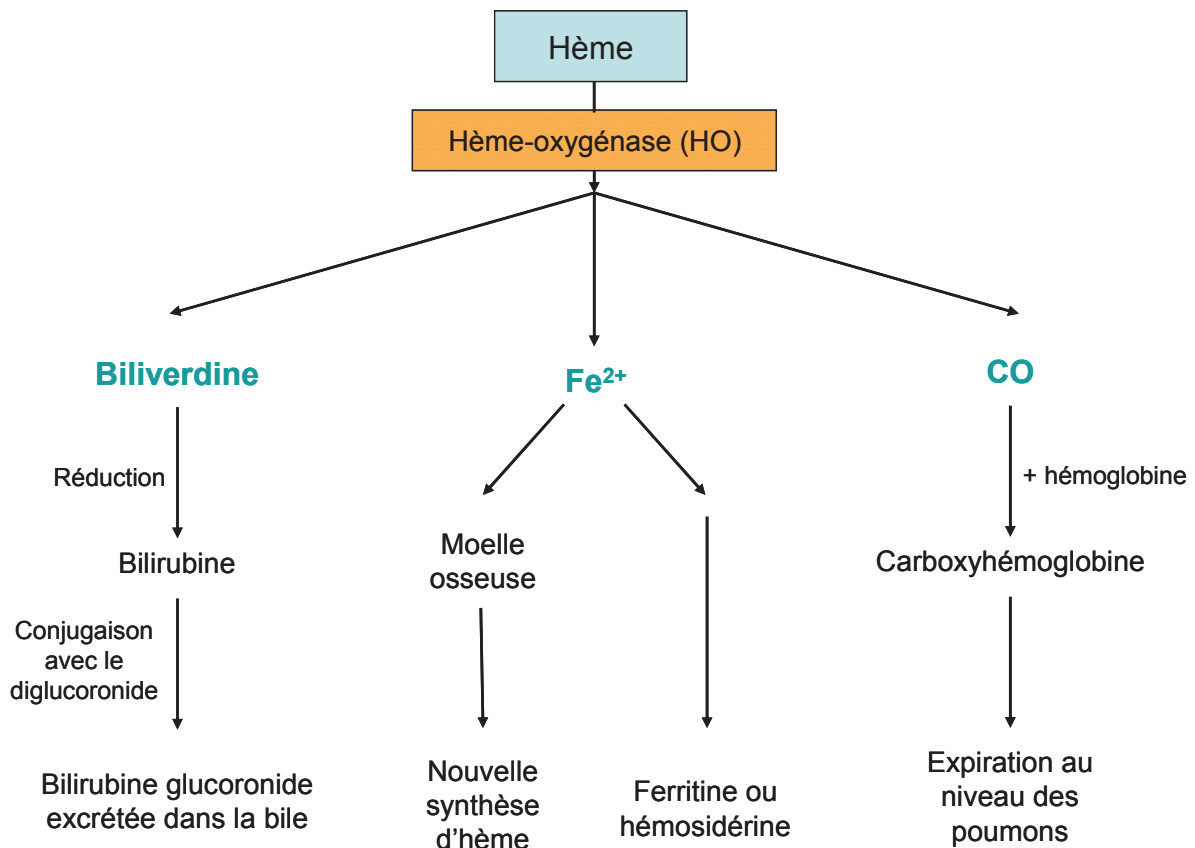


Figure 16- Biosynthèse de l'hème dans la mitochondrie et le cytoplasme (Tsiftoglou et al., 2006)

Le catabolisme de l'hème est un élément essentiel au maintien de son homéostasie cellulaire. Il a lieu principalement dans la rate et en partie dans le foie, à partir de

l'hémoglobine issue des érythrocytes sénescents détruits dans le réticulum endoplasmique (Tenhunen et al., 1970). L'hème est dégradé par l'hème oxygénase et forme des catabolites, à savoir la biliverdine, le monoxyde de carbone (CO) et le fer (Abraham et Kappas, 2005). Le devenir de ces catabolites est explicité dans la Figure 17.



**Figure 17-Devenir des catabolites de l'hème.**

Le schéma a été construit d'après les résultats de différents auteurs (Yoshida et Migita, 2000 ; Kikuchi et al., 2005).

### c) Rôles physiologiques

Les rôles physiologiques de l'hème et de l'hémine sont multiples. En effet, l'hème peut se lier à de nombreuses protéines et participe à l'activité d'un grand nombre d'enzymes (cytochromes P450, cytochromes impliqués dans la respiration cellulaire, hème-senseurs...), comme décrit dans le Tableau 1. Nous n'aborderons ici plus en détail que quelques uns de leurs rôles.

	Fonction	Hémoprotéine	Fonction biologique spécifique
<b>L'hème agit comme un groupement prosthétique stable</b>	transporteur de gaz	Hémoglobine Myoglobine Neuroglobine Cytoglobine	Transport de l'O <sub>2</sub> dans les globules rouges Stockage de l'O <sub>2</sub> et délivrance musculaire Fonction incertaine dans cellules neuronales Fonction incertaine dans les fibroblastes
	Transporteur d'électrons	Cytochrome C Cyt C oxydase Cyt C réductase Cyt B5 Cyt B558	Transfert d'électrons entre complexes III et IV Conversion O <sub>2</sub> moléculaire en 2 H <sub>2</sub> O Catalyse de la réduction du Cyt C Donneur et accepteur d'électrons Sous-unité catalytique de la NADPH oxydase
	Catalyse de dégradation ou de biosynthèse	Famille Cyt P450 Catalase Cyt c peroxydase Eosin. peroxydase	Catalyse l'incorporation d'O <sub>2</sub> dans les substrats Décompose 2H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en 2H <sub>2</sub> O et O <sub>2</sub> Utilise H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> pour oxyder Fe <sup>2+</sup> -Cyt C Produit des ROS
	Senseur de gaz hème dépendants	Neuronal PAS2 Guanylyle cyclase	Facteur de transcription régulé par [CO] Synthèse de cGMP à partir de GTP
<b>L'hème agit comme un messenger cellulaire</b>	Protéine hème-senseur et hème-régulé	Bach 1 ALAS1 Slo1-BK	Répresseur transcriptionnel Enzyme limitante de la biosynthèse de l'hème Mouvements transmembranaire de K <sup>+</sup> - inhibée par l'hème

**Tableau 1 - Implication de l'hème dans les hémoprotéines (d'après Gozzelino et al., 2010).**

i) Hémoglobine

L'hémoglobine est la combinaison de quatre molécules d'hème avec quatre chaînes de globine, identiques deux à deux. Les chaînes de globine  $\alpha$  contiennent 141 résidus et les chaînes  $\beta$  146. Ces deux types de chaînes ont des compositions différentes en aminoacides, mais possèdent des conformations tridimensionnelles similaires, constituées de 8 hélices repliées de façon à ménager une « poche » superficielle dans laquelle se trouve logée la molécule d'hème. Lors de la fixation d'oxygène, l'hémoglobine adopte une structure R (Relax), de haute affinité pour l'oxygène. En revanche, la forme non oxygénée est appelée T (Tense) (Jensen, 2009). L'hémoglobine est un composé vital pour l'organisme, puisqu'il

permet le transport de l'oxygène jusqu'aux tissus. Plusieurs pathologies sont liées à une diminution ou une anomalie de l'hémoglobine (anémies, thalassémies, drépanocytose...).

### ii) Régulation de croissance et de différenciation cellulaire

De nombreuses études démontrent un rôle de l'hémine dans la croissance et la différenciation cellulaire. En effet, l'hémine semble activer l'expression de certains gènes et induire la différenciation de plusieurs types cellulaires, hématopoïétiques et non-hématopoïétiques (Ross et Sautner, 1976 ; Rutherford et al., 1979 ; Chen et London, 1981 ; Monette et al., 1984 ; Tsiftoglou et al., 2003). L'hémine est aussi un inducteur de la synthèse d'hème dans les cellules pro-érythroïdes et active sélectivement l'expression des gènes de la globine embryonnaire et de la globine fœtale, mais pas de la globine de l'adulte, dans les cellules K562 humaines (Rutherford et al., 1979 ; Fibach et al., 1995). Cependant, une étude de Gusella et ses collaborateurs montre que l'hémine en elle-même ne suffit pas à atteindre la différenciation terminale et la perte de prolifération des cellules leucémiques chez la souris (Gusella et al., 1980).

A la lumière de ces études, l'hémine a été testée en adjuvant de traitement dans certaines pathologies, telles les leucémies (traitées par anthracyclines) pour diminuer leur prolifération (Tsiftoglou et al., 1991) et les  $\beta$ -thalassémies (Rund et al., 1998), avec des résultats intéressants.

### iii) Protection des cellules contre la cytotoxicité et l'apoptose

Dans les années 1980, Tsiftoglou et ses collaborateurs observent que l'hémine protège les cellules hématopoïétiques normales et leucémiques de la cytotoxicité des anthracyclines, notamment l'adriamycine, en diminuant leur accumulation intracellulaire (Tsiftoglou et al., 1986 ; Tsiftoglou et al., 1988). D'autres études ont montré que l'hémine active l'expression de HO-1 et protège ainsi les cellules contre le stress oxydatif dans des conditions physiologiques normales. Enfin, il semble que l'hémine posséderait un effet anti-apoptotique, *via* la protéine Bcl-XL (Bhaskaran et al., 2003 ; Benito et al., 1996), même si le mécanisme d'action précis reste inconnu à ce jour.

### d) Pathologies liées à un déficit en hème

L'hème est un élément indispensable à la vie et des anomalies de qualité ou de quantité conduisent à des pathologies sévères.



Les déficits en hème se retrouvent dans certaines anémies sidéroblastiques ou alimentaires, ou dans le cas où un déficit enzymatique induit une anomalie de la biosynthèse de l'hème. Les symptômes sont alors liés non seulement au déficit en hème (diminution du potentiel de membrane mitochondrial, stress oxydatif, bouleversement de l'homéostasie du calcium et apoptose), mais également à l'accumulation des précurseurs de l'hème, qui conduit à des porphyries et à une photosensibilité.

Les maladies génétiques comme les thalassémies ou la drépanocytose sont quant à elles la conséquence d'anomalies au niveau des chaînes de globine, et ne concernent pas directement l'hème.

### 8. Transport de l'hème dans les cellules de mammifères

#### a) Toxicité de l'hème libre et systèmes de détoxification

Dans les conditions physiologiques normales, le catabolisme de l'hème libre est assuré par l'hème oxygénase comme décrit plus haut. Ce système peut être débordé lors de situations pathologiques induisant une hémolyse sévère, tels les ischémies de reperfusion ou le paludisme. On assiste alors à la mise en place de systèmes alternatifs de prise en charge de l'hème libre.

L'hème est une molécule possédant des activités paradoxales selon qu'elle est présente en petite quantité (ou liée à une hémoprotéine ; rôles bénéfiques) ou en quantité excessive. L'hème libre est insoluble et potentiellement très nocif. Maintenu à faible concentration (<nM) dans le cytoplasme des cellules normales (Ryter et Tyrrell, 2000), sa toxicité s'exerce principalement selon trois voies, bien décrites dans la littérature (Kumar et Bandyopadhyay, 2005 ; Gozzelino et al., 2010) :

- *Le stress oxydatif* : il représente le rôle central de la toxicité de l'hème libre. L'hème libéré à partir des hémoprotéines s'oxyde et devient une source importante de ROS (reactive oxygen species). Ces ROS induisent la peroxydation des lipides (Letarte et al., 1993 ; Balla et al., 2000 ; Gutteridge et Smith, 1988), la diminution du contenu cellulaire en glutathion (Nath et al., 1995) et causent des dégâts à différentes protéines et à l'ADN. Ces effets ont pour conséquence l'entrée en apoptose des cellules préalablement exposées au TNF (Figure 18). L'effet des ROS peut être contré par des molécules antioxydantes.

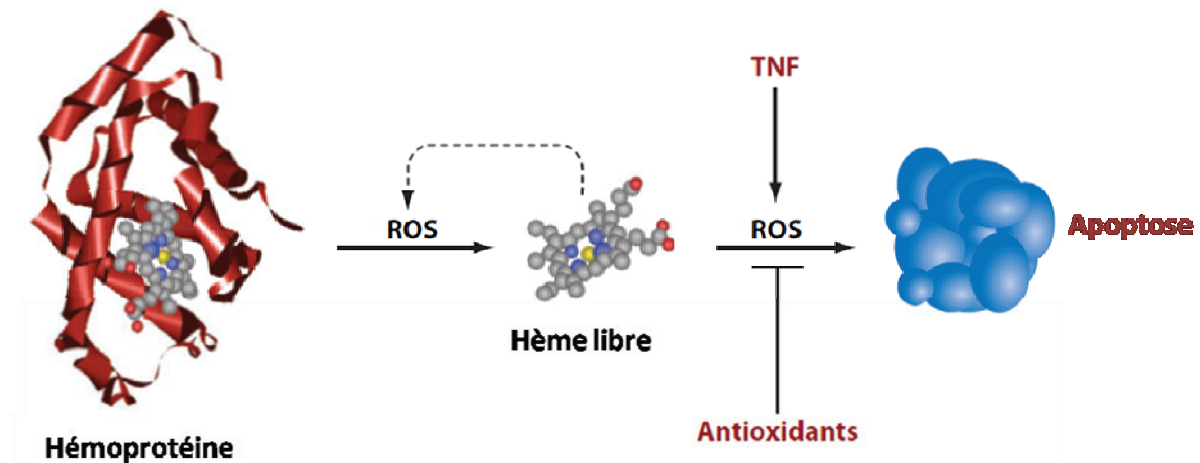


Figure 18- Effet délétère de l'hème libre *via* la production de ROS (d'après Gozzelino et al., 2010)

- *L'effet hémolytique* : Il est exercé par l'hémine au niveau des érythrocytes. L'hémolyse se déroule en deux phases. Au cours de la première phase, on observe une perte massive du potassium intracellulaire, puis une déplétion en glutathion et en ATP. La deuxième phase consiste en une perte drastique d'hémoglobine (Chou et Fitch, 1981). Ce phénomène se retrouve dans certaines pathologies comme les thalassémies. Il participe également au cycle de vie normal des érythrocytes. Les érythrocytes les plus âgés ayant accumulé plus d'hémine, ils sont éliminés par hémolyse.
- *L'inflammation* : On perçoit de nouveau ici le paradoxe de l'hème. A faible concentration, il est anti-inflammatoire en favorisant l'augmentation de l'HO-1 et en induisant par ce biais la formation de biliverdine et CO, composés cytoprotecteurs (Hayashi et al., 1999). En revanche, en quantité plus importante, l'hème a une action pro-inflammatoire, en stimulant l'expression de molécules d'adhésion et la génération de ROS (Shono et al., 1996, Nath et al., 2001). Les molécules d'adhésion recrutent ensuite des leucocytes, procédé caractéristique de l'inflammation. L'hémine est également pro-inflammatoire, par activation des réponses neutrophiles.

Afin de se protéger des effets toxiques de l'hème libre, la cellule dispose de plusieurs systèmes de détoxification. Le système le plus important est l'hème oxygénase (HO), à la fois dans les conditions physiologiques et pathologiques. Il conduit à l'obtention de composés cytoprotecteurs, facilement éliminables (cf. plus haut). D'autres mécanismes de détoxification de l'hème existent chez les mammifères, qui conduisent à sa dégradation ou à la formation de

complexes non toxiques (Figure 19). La prise en charge spécifique de l'hème par l'hémopexine et l'albumine sera détaillée plus loin.

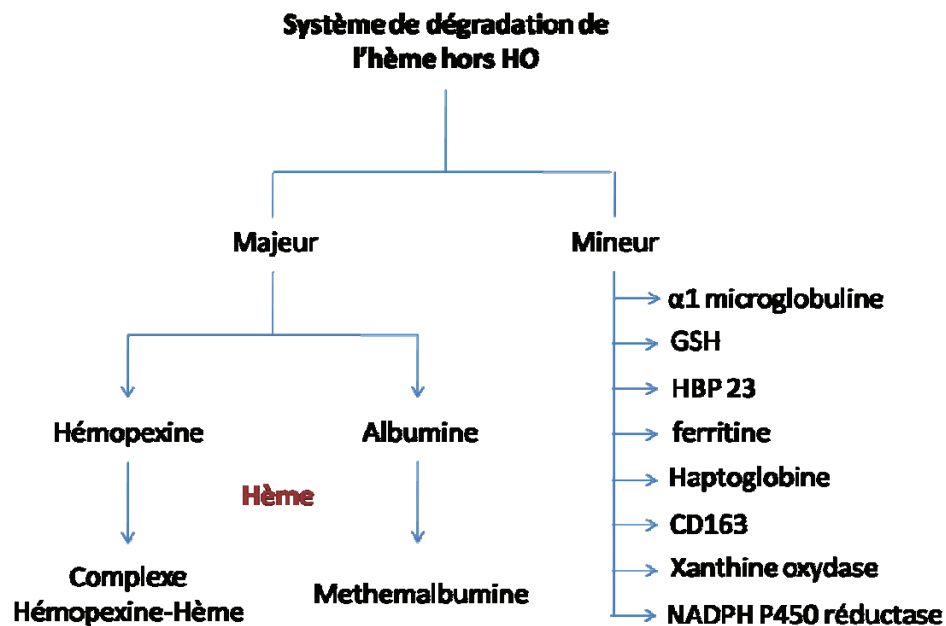


Figure 19 - Systèmes de dégradation de l'hème hors hème-oxygénase (d'après Kumar et Bandyopadhyay, 2005)

#### b) Trafic intracellulaire et export de porphyrines libres

Comme nous l'avons vu, les porphyrines sont des molécules indispensables mais aussi très toxiques lorsqu'elles sont libres. Leur implication dans la signalisation, l'activation de gène, la différenciation et la prolifération cellulaires en font des composés dont l'homéostasie est primordiale. Elle est assurée par une balance entre biosynthèse de l'hème, utilisation par les hémoprotéines, catabolisme et flux constants de porphyrines entre les différents compartiments cellulaires, dans les deux sens, auxquels de nombreux transporteurs participent (Figure 20). Au sein du cytoplasme, les porphyrines sont prises en charge par des protéines spécifiques, telles p22HBP, SOUL ou ligandin (Taketani et al., 1998 ; Sato et al., 2004) et ne sont libres qu'au moment du changement de compartiment (Ryter et Tyrrell, 2000). Le transfert des porphyrines entre le cytoplasme et la mitochondrie, ainsi qu'entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire paraissent particulièrement importants, puisqu'ils sont respectivement responsables de la biosynthèse de l'hème et du maintien des taux intracellulaires de porphyrines. L'implication de plusieurs transporteurs présents à ces interfaces ainsi que le cas particulier des cellules souches érythropoïétiques seront abordés ici.

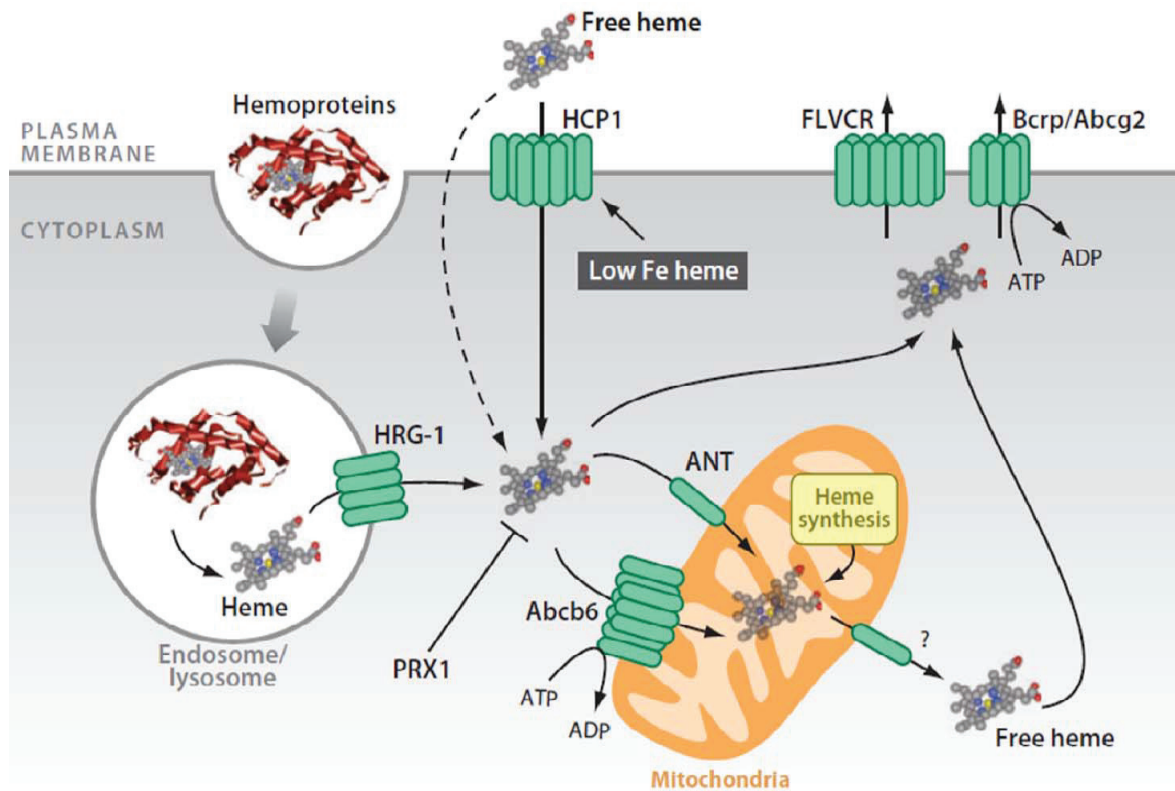


Figure 20 - Transport cellulaire de l'hème libre (d'après Gozzelino et al., 2010)

L'hème libre peut accéder à l'espace intracellulaire *via* différents mécanismes, dont l'endocytose des hémoprotéines liée à l'import d'hème par HRG1 (heme-responsive gene-1). Le transporteur membranaire HCP1 (heme carrier protein-1) importe également de l'hème libre extracellulaire. Les cellules sont aussi capables d'excréter l'hème *via* les transporteurs membranaires FLVCR (Feline Leukemic Virus Receptor) et ABCG2. Le trafic intracellulaire entre le cytoplasme et la mitochondrie est assuré par les transporteurs mitochondriaux ABCB6 et ANT (Adenine nucleotide translocator). Le transporteur impliqué dans la sortie de l'hème hors de la mitochondrie n'a pas encore été mis en évidence. PRX1 cytoplasmique neutralise l'action pro-oxydante de l'hème.

i) Au niveau mitochondrial

La biosynthèse de l'hème est réalisée en partie dans le cytoplasme et en partie dans la mitochondrie, ce qui implique des flux de porphyrines entre les deux compartiments et impose l'existence de transporteurs spécifiques, puisque ces molécules, malgré leur degré élevé d'hydrophobicité, sont incapables de franchir les membranes passivement (Ricchelli et al., 1995 ; Lavi et al., 2002). De plus, plusieurs auteurs ont montré que la translocation de porphyrines dans la mitochondrie nécessite de l'énergie (Koller et Romslo, 1978 ; Koller, 1979 ; Ricchelli et al., 1995).

Les études menées sur le sujet ont permis de mettre en évidence plusieurs transporteurs. Parmi ceux-ci, on peut noter l'ANT (Adenine Nucleotide Translator), exprimé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, qui possède la capacité de transporter

les précurseurs de l'hème, en particulier la PPIX et le CPIII dans la mitochondrie (Azuma et al., 2008) et PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor), localisé à la membrane mitochondriale externe (Braestrup et al., 1977 ; Lacapere et Papadopoulos, 2003) qui fixe des porphyrines, mais dont la capacité de transport reste incertaine (Wendler et al., 2003 ; Taketani et al., 1995 ; Krishnamurthy et al., 2007). D'autres transporteurs mitochondriaux, appartenant à la superfamille des transporteurs ABC, sont impliqués dans la biosynthèse de l'hème. On peut citer ABCB7, qui joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie cellulaire du fer (Csere et al., 1998), ABC-me, dont le rôle n'est pas complètement élucidé, mais qui semble augmenter la biosynthèse de l'hémoglobine (Shirihai et al., 2000), ABCB6 et ABCG2. Ces deux derniers transporteurs nous intéressent particulièrement et sont donc décrits plus en détail ci-dessous.

• *ABCB6*

Le transporteur ABCB6 a été découvert en 1997 et est successivement connu sous les noms de PRP (Furuya et al., 1997), UMAT (Hirsh-Ernst et al., 1998), MTABC3 (Mitsubishi et al., 2000) puis ABCB6. Il est particulièrement exprimé dans le foie fœtal, les cellules érythropoïétiques et les tissus adultes ayant des besoins importants en hème (Krishnamurthy et al., 2006). Initialement décrit comme impliqué dans l'homéostasie du fer (Mitsubishi et al., 2000), sa capacité à transporter des porphyrines a été mise au jour par l'équipe de Krishnamurthy en 2006 (Krishnamurthy et al., 2006). ABCB6 est exprimé au niveau de la membrane mitochondriale externe où il participe à la biosynthèse et à l'homéostasie des porphyrines. En effet, ABCB6 est capable de transporter des porphyrines (notamment le CPIII du cytoplasme vers la mitochondrie), et son expression active l'expression de gènes importants pour la biosynthèse de porphyrines *de novo*, ce qui se traduit par une augmentation de la concentration cytoplasmique de l'hème. De plus, l'expression d'ABCB6 augmente en présence de quantité importante de protoporphyrine IX dans de nombreux tissus, y compris les cellules hématopoïétiques (Krishnamurthy et al., 2006). Cette augmentation est corrélée avec la prolifération cellulaire (Furuya et al., 1997), ce qui laisse penser que le transporteur jouerait un rôle dans ce phénomène. Enfin, une étude publiée en 2009 montre que la capacité d'ABCB6 à élever la concentration d'hème dans le cytoplasme produit des changements phénotypiques au niveau des hémoprotéines (augmentation de leur taux et de leur activité), protégeant ainsi les cellules contre certains stress (Lynch et al., 2009) (Figure 21).

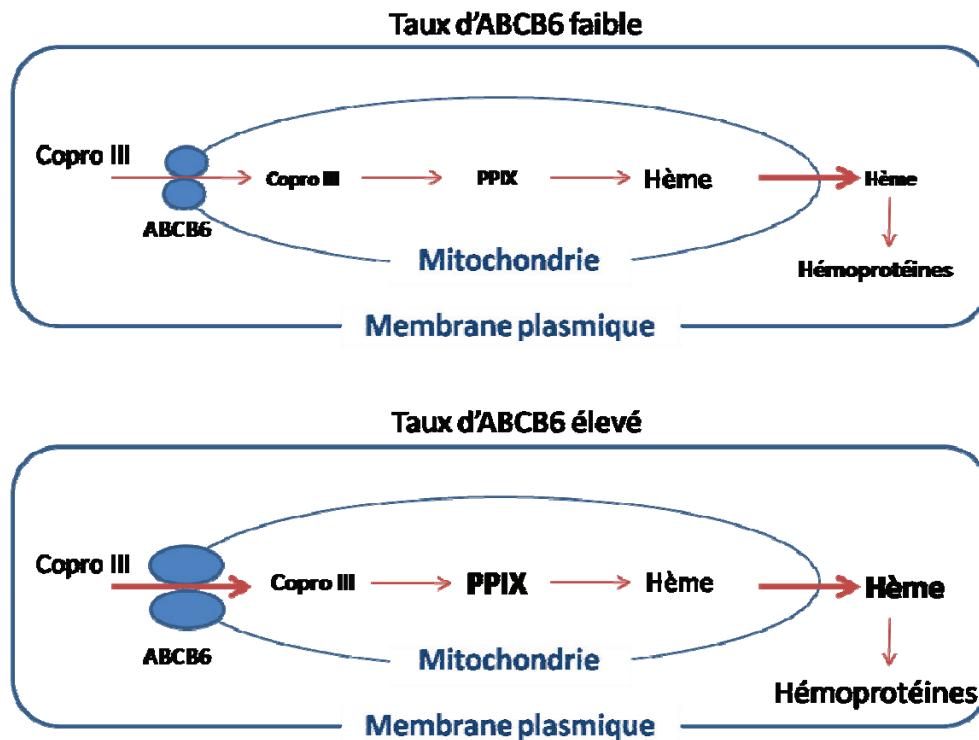


Figure 21- Modèle décrivant l'effet de la quantité d'ABCB6 sur l'hème et les hémoprotéines (d'après Lynch et al., 2009)

La taille de l'écriture indique la concentration relative. La largeur des flèches indique le taux relatif de mouvement.

• *ABCG2*

Une étude a récemment mis en évidence la présence du transporteur ABCG2 dans la membrane interne de la mitochondrie de plusieurs types cellulaires (Solazzo et al., 2009). De plus, les auteurs observent une plus faible accumulation de mitoxantrone, substrat connu d'ABCG2, dans les fractions mitochondriales exprimant le transporteur par rapport aux mêmes fractions incubées en présence de FTC, inhibiteur spécifique d'ABCG2. Ceci suggère que le transporteur serait fonctionnel dans ces conditions. Au regard de son expression au niveau de la membrane interne, Solazzo et son équipe proposent une implication d'ABCG2 dans le maintien du gradient électrochimique entre la matrice et l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Solazzo et al., 2009). Or, la mitochondrie est le siège de la synthèse d'hème et ABCG2 est capable de transporter des porphyrines (Jonker et al, 2002 ; Krishnamurthy et al., 2004). On peut donc se demander dans quelle mesure ABCG2 pourrait jouer un rôle dans ce contexte et s'il participe à l'export d'hème de la mitochondrie vers le cytoplasme, mécanisme encore non élucidé. Une telle hypothèse nécessite d'être explorée plus en détail et fera l'objet d'un chapitre de cette thèse.

ii) Au niveau de la membrane plasmique des cellules

De nombreux transporteurs sont localisés à la membrane plasmique et participent à la balance entre influx et efflux d'hème dans la cellule et donc à la régulation du taux intracellulaire de porphyrines et à leur homéostasie (Figure 22).

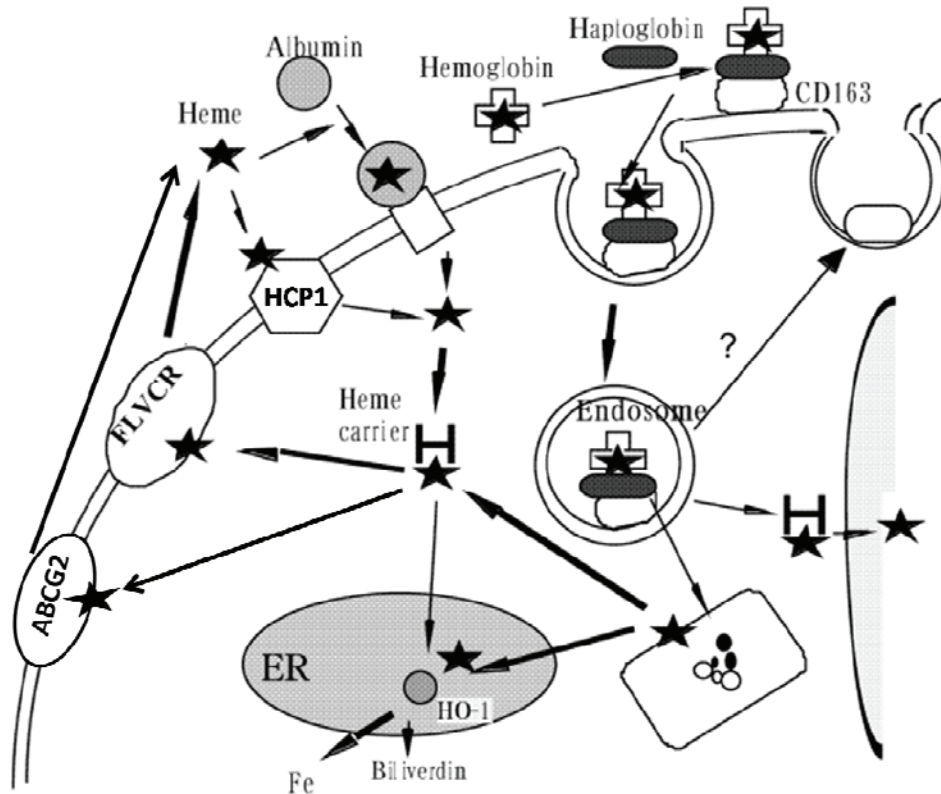


Figure 22 - Transporteurs présents à la membrane et devenir de l'hème (d'après Taketani, 2005)

L'entrée de l'hème dans les cellules n'est pas passive et nécessite la présence d'un transporteur (Worthington et al, 2001). Plusieurs importateurs d'hème ont été identifiés jusqu'ici. Le premier, HCP1, a été mis en évidence dans des cellules du duodénum et permet d'importer l'hème contenu dans les aliments, *a priori* dans le but d'en récupérer le fer (Shayeghi et al., 2005). Cette hypothèse est confortée par le mécanisme de régulation de la protéine, qui permet son internalisation lorsque le taux intracellulaire en fer est suffisant (Shayeghi et al., 2005). Les autres protéines identifiées appartiennent à la famille des HRG-1. Une étude réalisée sur *C. elegans* démontre qu'elles sont indispensables à l'homéostasie de l'hème et au développement normal chez les helminthes et les vertébrés (Rajagopal et al., 2008).

Lors de la biosynthèse de l'hème, plusieurs précurseurs porphyriniques peuvent s'accumuler dans le cytoplasme et engendrer des dégâts, notamment par la peroxydation des lipides. Pour lutter contre ce type de dommage, certains transporteurs permettent leur efflux.

C'est le cas d'ABCB6, dont l'expression à la membrane a été découverte après son rôle dans la mitochondrie. Dans ce contexte, ABCB6 pourrait protéger les cellules contre les effets toxiques du phéophorbide a (Paterson et al., 2007). Les deux autres protéines les plus impliquées dans ce mécanisme sont FLVCR et ABCG2, détaillées ci-dessous.

### •FLVCR

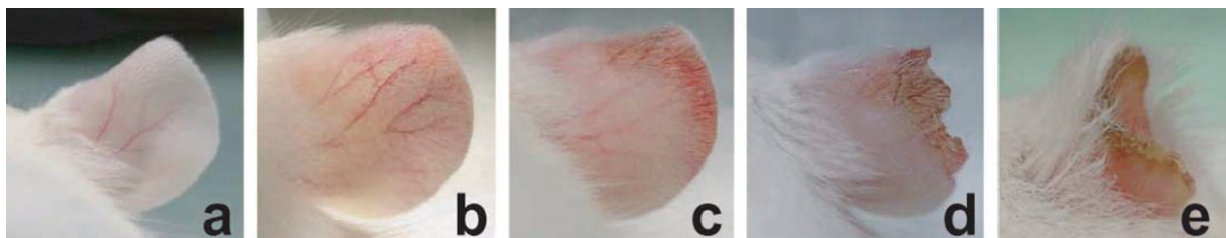
A l'origine, FLVCR (Feline leukaemic virus receptor) a été identifié comme le récepteur de surface cellulaire du virus de la leucémie chez le chat (Tailor et al., 1999 ; Quigley et al., 2000). La protéine est exprimée principalement au niveau des érythrocytes, ou globules rouges, et dans une moindre mesure dans les hépatocytes et les cellules intestinales. L'infection par ce virus induit chez le chat l'apparition d'une aplasie anémique ne touchant que les érythrocytes. Dans ce type d'anémie, les progéniteurs érythroïdes (BFU-E et CFU-E) ne parviennent pas à se différencier et l'érythropoïèse s'arrête. Ces symptômes s'expliquent par le rôle de FLVCR dans l'érythropoïèse, découvert en 2004 (Quigley et al., 2004). Ces auteurs ont montré dans des cellules K562 (progéniteurs érythropoïétiques) que FLVCR a la capacité d'exporter l'hème et que son expression varie en fonction du degré de différenciation cellulaire. En effet, FLVCR est très exprimé au cours des stades précoces de maturation (CFU-E) lorsque la synthèse d'hème est très importante et diminue avec la différenciation et la production de globine par les cellules pour l'hémoglobinisation. FLVCR protégerait les cellules peu matures, plus fragiles, de l'effet toxique de l'hème et son expression se réduirait lorsque son action n'est plus nécessaire (Quigley et al., 2004). En revanche, sa capacité à transporter d'autres composés porphyriques comme la PPIX ou le CPIII n'a pas été démontrée. L'importance primordiale du transporteur FLVCR dans l'érythropoïèse est confortée par l'étude menée en 2008 par Keel et ses collaborateurs, dans laquelle ils observent que les souris *Knock Out* (KO) pour FLVCR meurent en milieu de gestation (Keel et al., 2008).

### •ABCG2

L'importance du transporteur ABCG2 dans l'homéostasie de l'hème a été démontrée en 2002, par l'étude de souris KO pour le gène d'ABCG2 (Jonker et al., 2002). En effet, les auteurs ont découvert que ces souris, à première vue sans phénotype particulier (Zhou et al., 2001), développent une phototoxicité dépendante de la lumière lorsque leur alimentation est riche en chlorophylle (Figure 23). Cette hypersensibilité à la lumière est due à l'accumulation dans les tissus d'un catabolite porphyrique de la chlorophylle, le phéophorbide a. Ce composé



est connu pour être toxique également chez l'homme dans certaines conditions. Ainsi, une phototoxicité induite par le phéophorbide a a été retrouvée après ingestion de tablettes de chlorophylle provenant d'une préparation d'algues (Jitsukawa et al., 1984). Ces observations laissent penser qu'ABCG2 protège les cellules de la toxicité du phéophorbide a en l'effluant vers l'extérieur, hypothèse confirmée par la suite sur des cellules humaines (Robey et al., 2005). Outre cette photosensibilité, les souris *abcg2*<sup>-/-</sup> présentent un type de porphyrie non connu jusqu'alors (Jonker et al., 2002). Contrairement aux autres porphyries décrites, comme la porphyrie érythropoïétique causée par un déficit en ferrochelatase (Thunell, 2000), celle-ci n'est pas due à un déficit en une enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème, mais à une accumulation de PPIX dans les érythrocytes. En effet, le taux de porphyrines et notamment de PPIX est 10 fois supérieur à la normale dans ces cellules (Jonker et al., 2002).



**Figure 23- Phototoxicité dépendante du phéophorbide a (d'après Jonker et al., 2002)**

A : Oreille normale ; B à E : Progression des lésions phototoxiques sur une période de 3 à 5 jours chez les souris *abcg2*<sup>-/-</sup>.

D'autres études importantes pour la compréhension du rôle d'ABCG2 dans le transport des porphyrines ont été réalisées, dont celle de Jonker et de son équipe sur la glande de Harder chez la souris (Jonker et al., 2007). Cette glande exocrine, située à l'arrière de l'œil chez certains vertébrés, est connue pour la production et la sécrétion de grandes quantités de porphyrines, bien que son importance physiologique soit encore mal connue. L'expression d'ABCG2 y a été retrouvée, ce qui en fait un bon modèle pour l'étude du transport des porphyrines *in vivo* chez les souris *abcg2*<sup>-/-</sup>. Cette étude a permis de mettre en évidence d'une part l'aptitude d'ABCG2 à transporter des dérivés conjugués de la PPIX, et d'autre part sa capacité à les éliminer par voie hépatique. De plus, il a été montré que les cellules surexprimant ABCG2 possèdent des taux intracellulaires de PPIX plus faibles que les cellules témoins (Zhou et al., 2005) et qu'ABCG2 a la capacité de fixer de l'hème (Krishnamurthy et al., 2004). Enfin, une étude récente suggère qu'ABCG2 protège les cellules neuronales contre le stress oxydatif et l'inflammation en limitant l'entrée de l'hème dans ces cellules, induisant

une diminution de la génération de ROS (Shen et al., 2010). Cette diminution serait due à une inhibition de la voie NF-κB.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'ABCG2 participe à l'homéostasie de l'hème via le transport de PPIX, dans un contexte de détoxification cellulaire. Il apparaît néanmoins qu'ABCG2 n'est pas indispensable à la survie, puisque le génotype *abcg2*<sup>-/-</sup> n'est pas létal (zhou et al., 2001) et donc que le manque d'ABCG2 peut être compensé, probablement par FLVCR.

D'un point de vue clinique, le rôle d'ABCG2 dans le transport de porphyrines peut avoir des conséquences sur les traitements administrés au cours de certaines thérapies. En effet, les inhibiteurs du transporteur, comme l'imatinib, peuvent être à l'origine de l'apparition d'une réaction de photosensibilité chez les patients (Rousselot et al, 2003 ; Brazzelli et al, 2007 ; An et al, 2009). De même, les personnes présentant des tumeurs surexprimant ABCG2 peuvent être résistantes à la thérapie photodynamique, technique qui utilise un photosensibilisant comme le phéophorbide a avant l'irradiation des cellules ciblées (Usuda et al., 2009, Morgan et al., 2010). A l'inverse, certains polymorphismes induisant peu ou pas d'expression de la protéine pourraient provoquer une photosensibilité plus élevée chez les personnes concernées (Tamura et al, 2006), comme présenté dans le Tableau 2 ci-dessous.

Potential Risk	Amino Acid	Transport		Allele Frequency	cDNA Position	Located on Exon	Allele		Data Source <sup>a</sup>
		Hemato	MTX				Wild-Type	Allele	
				%					
★★	V12M	++	++	2.0–90.0	34	2	G	A	1, 2, 4, 5, 7, 8
	Q126stop	–	–	0.0–1.7	376	4	C	T	1, 3, 5, 7
	Q141K	++	++	0.0–35.5	421	5	C	A	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8
	T153M	++	++	3.3	458	5	C	T	5
	R160Q	N.D.	N.D.	0.5	479	5	G	A	8
	Q166E	++	++	N.D.	496	5	C	G	NCBI dbSNP rs1061017
	I206L	++	++	10.0	616	6	A	C	2
★★	F208S	–	–	N.D.	623	6	T	C	NCBI dbSNP rs1061018
★★	S248P	–	–	N.D.	742	7	T	C	NCBI dbSNP rs3116448
★★	E334stop	–	–	N.D.	1000	9	G	T	NCBI dbSNP rs3201997
	F431L	++	–	0.8	1291	11	T	C	3
★★	S441N	–	–	0.5	1322	11	G	A	7
★	F489L	+	–	0.5–0.8	1465	12	T	C	3, 7
	F571L	++	++	0.5	1711	14	T	A	NCBI dbSNP rs9282571
(★★)	R575stop	N.D.	N.D.	0.5	1723	14	C	T	8
	N590Y	++	++	0.0–1.0	1768	15	A	T	2, 5
	D620N	++	++	0.5	1858	16	G	A	8

**Tableau 2 - Transport de porphyrines et SNP d'ABCG2 (d'après Tamura et al., 2006)**

Le transport d'hématoporphyrine et de mitoxantrone est indiqué par + (positif) ou – (négatif). Les fréquences des allèles sont récapitulées à partir de publications antérieures. Il existe des différences dans les fréquences des allèles entre les différents groupes ethniques.

ND : non déterminé ; ■ : risque de porphyrie ; ( ■ ) : risque potentiel dû à une protéine tronquée.

1 : Imai et al. (2002) ; 2 : Zamber et al. (2003) ; 3 : Itoda et al. (2003) ; 4 : Backstrom et al. (2003) ; 5 : Mizuarai et al. (2004) ; 6 : De Jong et al. (2004) ; 7 : Kobayashi et al. (2005) ; 8 : Bosch et al. (2005).

## iii) Cas particulier : rôle d'ABCG2 dans les cellules souches

**Marqueur des cellules souches**

Certaines cellules souches, notamment les cellules souches hématopoïétiques (Hematopoietic Stem Cell, HSC), se caractérisent par une faible fluorescence après incubation avec des composés fluorescents comme la rhodamine 123 et le Hoechst 33342 (Sprangrude et Johnson, 1990 ; Wolf et al., 1993) et par leur capacité à survivre en condition d'hypoxie (Cipolleschi, 1993). Ce phénotype est désigné sous le sigle SP, pour Side Population (Zhou et al., 2002) et représente un faible pourcentage des cellules de la moelle osseuse (0,05 à 0,1% des cellules viables de la moelle osseuse chez la souris). On retrouve aussi ce phénotype pour des cellules issues de tissus non-hématopoïétiques, comme le muscle squelettique (Gussoni et al., 1999 ; Jackson et al., 1999), le cerveau (Hulspas et Quesenberry, 2000) et les cellules souches embryonnaires (Zhou et al, 2001 ; Sarkadi et al., 2010).

L'aptitude des cellules souches SP à effluer les composés fluorescents laisse penser à une implication de pompes d'efflux. En effet, les transporteurs ABC P-gp et ABCG2 sont tous deux exprimés dans les cellules souches de la moelle osseuse (Chaudhary et al., 1991). En revanche, seule la présence d'ABCG2 est nécessaire au phénotype de side population (Zhou et al, 2001 ; Zhou et al, 2002). En effet, les souris KO *abcg2* <sup>-/-</sup> ont un nombre de cellules SP plus faible dans la moelle osseuse et les muscles squelettiques, alors que la non-expression de P-gp est sans effet (Zhou et al., 2002). L'ARN d'ABCG2 est retrouvé en grande quantité dans les HSC (cellules primitive) et diminue dans les cellules en différenciation, ce qui en fait un marqueur important des cellules souches (Scharenberg et al., 2002). Seule la lignée érythroïde exprime encore ABCG2 dans les cellules en cours de maturation (Zhou et al., 2005), ce qui explique qu'ABCG2 est fortement exprimé dans les érythrocytes, sous forme homodimérique (Leimanis et al., 2007). La régulation de son expression est réalisée par l'utilisation alternative de multiples exons et promoteurs (Zong et al., 2006).

**Protection des cellules souches**

ABCG2 transporte un large spectre de molécules, et son expression dans de nombreux tissus de l'organisme protège contre des composés endo- et exogènes (cf. plus haut). Dans les cellules souches, il a été montré qu'ABCG2 protège contre la toxicité de la mitoxantrone. En effet, les souris KO pour la protéine sont plus sensibles à cette molécule chimiothérapeutique (Zhou et al., 2002). Par ailleurs, la forte expression d'ABCG2 dans les cellules érythroïdes en maturation coïncide avec une diminution du taux intracellulaire de PPIX, suggérant une modulation de ce taux par le transporteur (Zhou et al., 2005). Plusieurs études réalisées *in*

*in vitro* à partir de cellules issues de souris *abcg2*<sup>-/-</sup> ont permis de mettre en évidence le rôle d'ABCG2 dans l'homéostasie des porphyrines dans les cellules souches (Krishnamurthy et al., 2004 ; Zhou et al., 2005 ; Susanto et al., 2008). En effet, il a été montré que les progéniteurs issus de ces souris présentent une capacité réduite à former des colonies dans des conditions d'hypoxie, et que le blocage de la synthèse de l'hème reverse ce phénomène. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique d'ABCG2 (KO143) dans des cellules exprimant le transporteur réduit de façon drastique la survie cellulaire dans les mêmes conditions (Krishnamurthy et al., 2004). Il apparaît donc que les porphyrines sont toxiques pour les cellules souches en condition d'hypoxie (condition retrouvée dans la moelle osseuse, lieu d'une biosynthèse importante de porphyrines par les HSC) et qu'ABCG2 confère un fort avantage de survie cellulaire en permettant leur efflux. Cet avantage est encore renforcé par l'augmentation de l'expression d'ABCG2 *via* une régulation positive par HIF-1 (hypoxia-inducible transcription factor). De plus, la surexpression du transporteur conduit également à l'augmentation de facteurs cytoprotecteurs impliqués dans la réponse au stress oxydatif et, par ce biais, promeut la viabilité cellulaire (Martin et al., 2008).

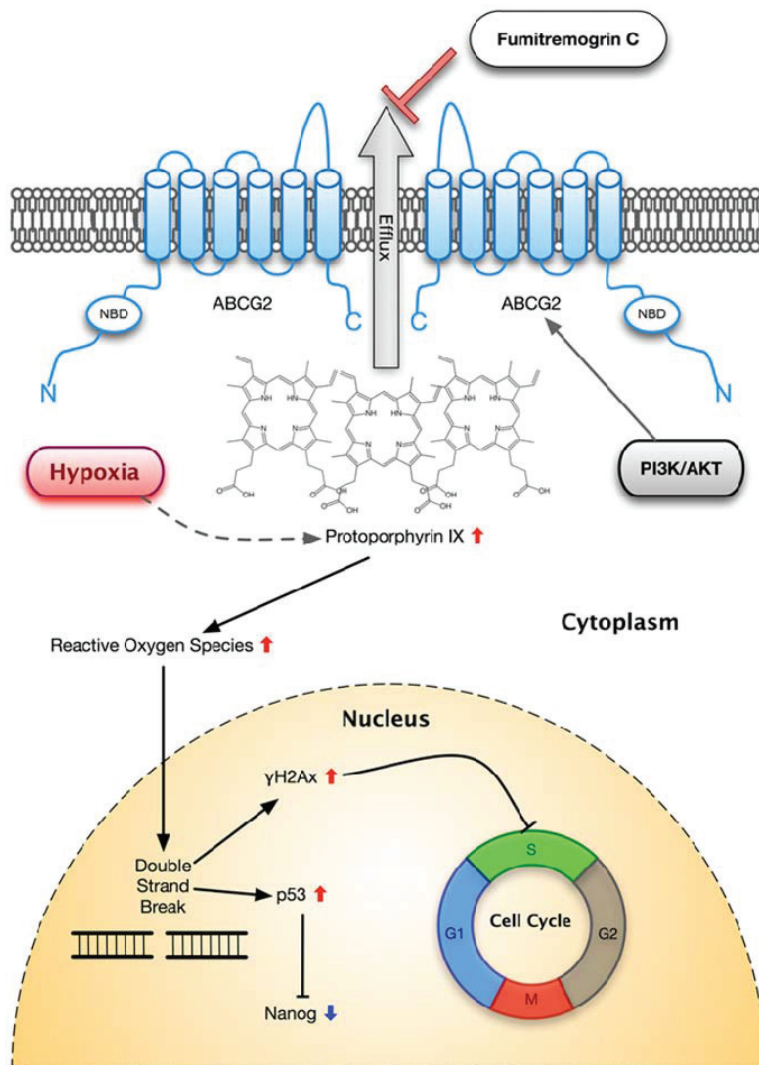
Il faut toutefois noter qu'ABCG2 n'est pas indispensable au développement hématopoïétique normal (Zhou et al., 2003).

### **Régulation du développement des cellules souches**

Depuis quelques années, plusieurs études ont mis en avant un rôle d'ABCG2 dans le maintien du phénotype indifférencié des cellules souches (Zhou et al., 2001 ; Bhattacharya et al., 2007 ; Susanto et al., 2008). Il semblerait en effet qu'ABCG2 bloque la différenciation cellulaire (Zhou et al., 2001). Une étude menée en 2007 sur des cellules souches neuronales montre que la surexpression du transporteur prévient l'engagement de ces cellules dans une lignée de différenciation, tandis que sa diminution permet de retrouver une différenciation normale (Bhattacharya et al., 2007). Les auteurs proposent que ce phénomène serait dû au fait qu'ABCG2 est une cible de la voie de signalisation de Notch, connu pour son rôle dans le maintien de la non-différenciation de différents types cellulaires (Ahmad et al., 2004 ; Austin et al., 1995 ; Jadhav et al., 2006).

D'autres études montrent qu'ABCG2 est impliqué dans le phénomène de croissance des cellules souches. La première est celle d'Ahmed et de ses collaborateurs, qui observent qu'ABCG2 augmente le potentiel de croissance des progéniteurs hématopoïétiques primaires chez l'homme et favorise les progéniteurs les plus primitifs (Ahmed et al., 2008). La deuxième est celle de Shen et son équipe, qui mettent en évidence que le maintien de

l'homéostasie des porphyrines par ABCG2 régule le renouvellement des cellules souches embryonnaires (Susanto et al., 2008). En effet, le blocage d'ABCG2 avec un ARN d'interférence ou un inhibiteur augmente le taux de PPIX intracellulaire et surtout arrête le cycle cellulaire et diminue l'expression du gène *Nanog*, codant une protéine dédiée au maintien de la pluripotence, par augmentation de l'expression de p53 et de  $\gamma$ H2Ax. La Figure 24 récapitule les rôles d'ABCG2 dans ces cellules souches embryonnaires.



**Figure 24 - Rôle proposé d'ABCG2 dans les cellules souches embryonnaires de souris (d'après Susanto et al., 2008)**

Schéma illustrant comment l'inhibition d'ABCG2 peut conduire à l'accumulation de PPIX et à l'augmentation du taux de ROS, ce qui cause des dommages à l'ADN et active éventuellement p53 et  $\gamma$ H2Ax. L'activation de p53 conduit à une diminution de Nanog, tandis que  $\gamma$ H2Ax cause l'arrêt du cycle cellulaire. Sont également décrites ici les implications possibles de PI3K/AKT et de l'hypoxie dans ce mécanisme.

c) Liaison des porphyrines aux protéines du plasma

Il est connu depuis les années 1960 que l'hème est transporté dans le plasma, et qu'il peut être délivré aux cellules (Smith et Morgan, 1964 ; Bunn et Jandl, 1968). Deux protéines ont été décrites pour lier et transporter l'hème dans le plasma, l'hémopexine et l'albumine, avec des cinétiques d'interaction similaires malgré leurs structures différentes (Kuzelova et

al., 1997). La liaison à ces protéines permet la formation d'un complexe hème-protéine qui abolit la toxicité de l'hème libre (Morgan, 1976 ; Grinberg et al., 1999). Leur capacité à délivrer l'hème aux cellules en font des acteurs importants de l'homéostasie des porphyrines.

### i) Hemopexine

L'hémopexine est une glycoprotéine de 60 kDa qui fixe l'hème et l'hémine avec une très bonne affinité ( $K_d < 1 \text{ pmol/l}$ ), dans un ratio 1:1 (Delanghe et Langlois, 2001 ; Kumar et Bandyopadhyay, 2005). Elle permet le transport de l'hème libéré des érythrocytes dans la circulation et le délivre aux hépatocytes via des récepteurs spécifiques (Smith et Morgan, 1964 ; Morgan, 1976) pour dégradation par le réticulum endoplasmique (Muller-Eberhard et Fraig, 1993). Ce processus requiert du  $\text{Ca}^{2+}$ , une température minimum et de l'énergie (Smith et Morgan, 1981) et permet de limiter la toxicité de l'hème, notamment la peroxydation des lipides (Gutteridge et Smith, 1988 ; Grinberg et al., 1999). Au niveau structural, un site de fixation d'hème de haute affinité a pu être identifié grâce à l'obtention de cristaux 3D. Il apparaît que la molécule d'hème est liée à deux résidus histidine dans une poche riche en groupement aromatiques et basiques (Paoli et al., 1999).

### ii) Albumine

L'albumine, qui représente 52 à 60% des protéines totales du plasma humain, soit environ 40 mg/ml (Silva et al., 2004), lie l'hème dans des conditions physiologiques et forme alors un complexe appelé méthémalbumine (Rosenfeld et Surgenor, 1952). La capacité de l'HSA (Human Serum Albumin) à lier aussi bien l'hème et l'hémine que la CoPPIX ou la SnPPIX démontre que la présence de l'atome fer n'est pas critique dans cette fixation (Beaven et al., 1974 ; Chow et al., 2008). L'albumine fixe l'hème dans un ratio 1:1 et 1:2 (Rosenfeld et Surgenor, 1952) avec une bonne affinité ( $K_d = 10^{-8}$ , Muller-Eberhard et Fraig, 1993) et prévient ses effets toxiques (Grinberg et al., 1999), ainsi que ceux d'autres porphyrines (Chow et al., 2008). Une étude structurale menée en 1999 met en évidence un site principal de fixation de l'hémine sur l'HSA (Human Serum Albumin), ainsi que deux sites secondaires (Dockal et al., 1999). Hormis son rôle de détoxification de l'hème, il a été montré sur des cellules K562 humaines que l'albumine (bovine) favorise la différenciation cellulaire dépendante de l'hémine (Endo et al., 1994).

Au regard de l'ensemble de ces données, il apparaît que le rôle exact d'ABCG2 dans l'homéostasie des porphyrines reste encore à éclaircir. En effet, si son implication dans la protection des cellules hématopoïétiques et des globules rouges contre des composés porphyriniques en excès est clairement décrite (Zhou et al., 2002 ; Krishnamurthy et al., 2004 ; Ahmed et al., 2008), le mécanisme complet de détoxification reste non résolu. Le devenir de l'hème ou de la PPIX après transport est un point à élucider, puisque l'hème ne peut rester libre en solution du fait de sa toxicité. Parmi les protéines plasmatiques susceptibles de prendre en charge les porphyrines après leur transport, l'Albumine Sérique Humaine (HSA) semble un bon candidat, puisqu'il a été démontré qu'elle est capable de fixer l'hème, l'hémine, mais également d'autres porphyrines (Chow et al., 2008). Dans ce contexte, il est possible d'envisager un partenariat entre ABCG2 et la HSA après le transport, donc au niveau extracellulaire. Or, ABCG2 possède une boucle extracellulaire particulière, spécifique et de taille compatible avec l'existence d'un domaine fonctionnel, ECL3. Les principaux objectifs de cette thèse seront donc de déterminer 1°/ dans quelle mesure ECL3 participerait à la prise en charge des porphyrines par ABCG2 et 2°/ si un partenariat avec la HSA existe effectivement. La Figure 25 est une vue schématique du mécanisme potentiel.

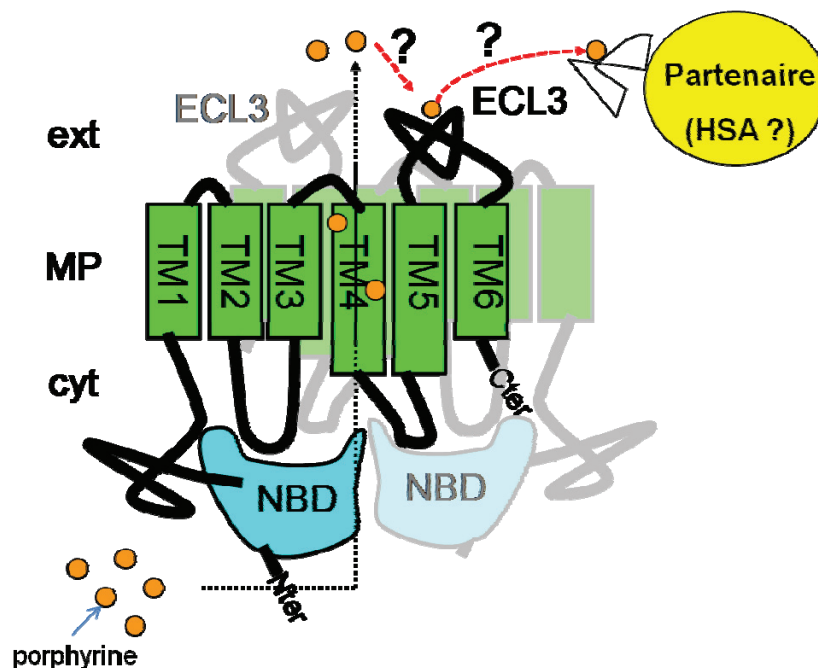


Figure 25 - Schéma du rôle potentiel de la troisième boucle extracellulaire d'ABCG2 dans la prise en charge des porphyrines.

ABCG2 est représentée sous sa forme homodimérique, dont l'un des monomères est en arrière-plan. Les ronds orange représentent les porphyrines. Les flèches représentent leur mouvement potentiel.

D'autre part, l'expression d'ABCG2 a été récemment retrouvée au niveau de la mitochondrie, dans une orientation impliquant un transport de la mitochondrie vers le cytoplasme (Solazzo et al., 2009). La mitochondrie est le siège de la dernière étape de synthèse de l'hème et le transporteur permettant sa translocation vers le cytoplasme n'est pas connu. On peut formuler l'hypothèse qu'ABCG2 serait ce transporteur et permettrait l'efflux d'hème hors de la mitochondrie, participant ainsi à son homéostasie cellulaire. Cette piste sera testée dans un chapitre de cette thèse.



# **MATERIELS ET METHODES**



## I Techniques de biologie moléculaire

### 1. Souches bactériennes et de cellules d'insectes et de mammifère

#### a) Souche bactérienne

Les souches utilisées sont des *E. coli* :

- Top 10 pour les étapes d'amplification d'ADN
- BL21(DE3) : F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3) pour l'expression et la production de protéines
- DH10 Bac (Invitrogen) pour la production du baculovirus.

Les bactéries sont cultivées dans un milieu LB (Luria-Bertani, 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 10 g de NaCl, qsp 1L), additionné d'un ou plusieurs agents de sélection.

Les souches bactériennes sont conservées sous forme de stock glycérol (20% final) à -80°C.

#### b) Cellules d'insectes

Les souches utilisées sont *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) et *Hi-5* (*BTI-Tn 5B1-4*).

##### i) Congélation

Les cellules sont suspendues dans du milieu supplémenté de 50% de sérum de veau fœtal (SVF) et de 10% de DMSO à la densité de  $2 \times 10^6$  cellules/ml. Les cellules sont placées durant 24h dans une boîte de congélation à -80°C puis sont transférées dans l'azote liquide.

##### ii) Décongélation

Les cellules sont décongelées rapidement à 37°C, reprises dans 10 ml de milieu de culture et centrifugées à 200 g. Le culot est suspendu dans 10 ml de milieu de culture et transféré dans une flasque de 75 cm<sup>2</sup>, placée à 27°C.

##### iii) Conditions de culture

Les cellules d'insecte sont cultivées à 27°C dans du milieu SF-900 II SFM (Invitrogen), supplémenté de 10% de SVF ou EXPRESS FIVE SFM (Invitrogen), supplémenté en L-glutamine 180 mM.

#### c) Cellules de mammifère

Deux lignées cellulaires ont été utilisées : les cellules K562 (gracieusement fournies par le Dr Zhou de la Division of Experimental Hematology, St Jude Children's Research Hospital Memphis, USA) et les cellules FlpIn 293 (Invitrogen).

##### i) Congélation

Les cellules sont suspendues dans le milieu de congélation (50% de DMEM, 40% de SVF et 10% de DMSO) et placées durant 24h dans une boîte de congélation à -80°C. Le lendemain, elles sont transférées dans l'azote liquide.

ii) Décongélation

Les cellules sont décongelées rapidement à 37°C, reprises dans 10 ml de milieu de culture et centrifugées à 200 g. Le culot est suspendu dans 10 ml de milieu de culture et transféré dans une flasque de 75 cm<sup>2</sup>, placée à 37°C.

iii) Conditions de culture

Les conditions de cultures sont identiques pour les deux lignées. Elles sont cultivées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu DMEM (PAA), supplémenté de 10% de SVF.

## 2. Vecteurs plasmidiques et conception des clonages

### a) Clonage dans les souches bactériennes

i) Pour la production d'ECL3 en fusion avec la MBP

Les plasmides pMal p2G et pMal c2g (Figure 26) permettent de cloner des ADN en aval et en phase avec le gène codant pour la MBP. Ils font partie du kit de purification « *pMAL Protein Fusion and Purification System* » commercialisé par la société New England Biolabs. Le gène de résistance à l'ampicilline (*bla*) qu'ils intègrent permet la sélection des bactéries ayant acquis le plasmide. Le plasmide pmal-p2G, composé de 6721 paires de bases, inclut une séquence signal permettant l'adressage de la MBP au périplasme, notée par la suite MBPp. Le plasmide pmal-c2G a 6646 paires de bases et ne contient pas cette séquence signal, et dans ce cas la MBP reste cytoplasmique, notée MBPc. Les sites de restriction uniques utilisés pour le clonage sont indiqués dans la figure.

Les amorces utilisées pour le clonage d'ECL3 en version longue et courte dans ces plasmides sont les suivants :

ECL3-ML1     5' -AGAGAATT**C**GAGAAT**C**TTTATTTT**C**AGGG**C**AATCTCACAACCATTGCATCT  
 ECL3-ML2     5' -TTTTTTTTATTATT**A**AG**C**TT**C**TAGTGATTCTTCCACAAGCCC  
 ECL3-MS1     5' -AGAGAATT**C**GAGAAT**C**TTTATTTT**C**AGGG**C**TCATGGCTTCAGTACTTCA  
 ECL3-MS2     5' -TTATTTTATTATTATT**A**AG**C**TT**C**TATGAGAGATCGATGCCCTGC

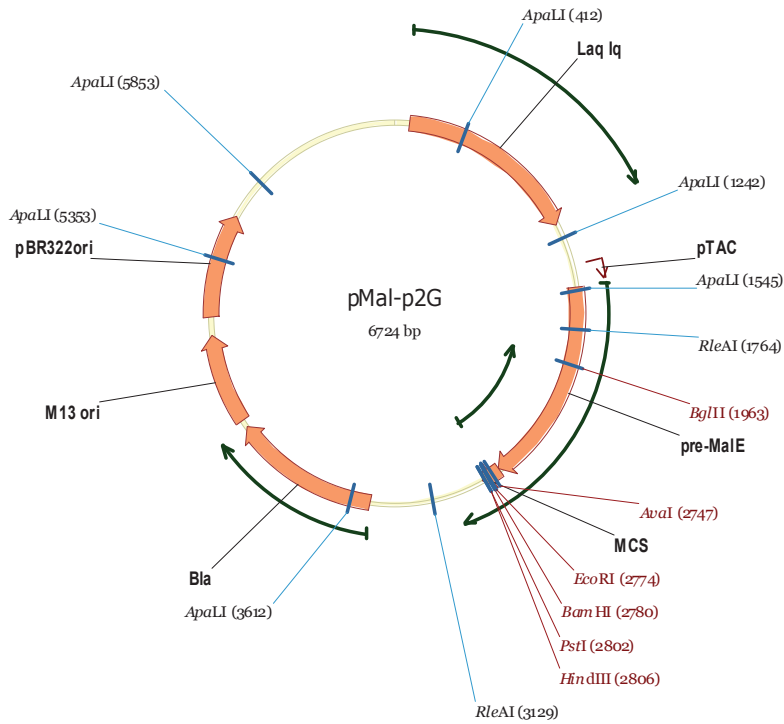


Figure 26 - Le plasmide pMal-p2g.

ii) Pour la production d'ECL3 en fusion avec une étiquette 6 histidines

Le vecteur utilisé pour l'expression d'ECL3 est le pET15b (Figure 27). Le clonage a été réalisé entre les sites de restriction NdeI et BamHI, avec une étiquette 6 Histidines. L'étiquette a été ajoutée par PCR, à partir du plasmide pFastBac Dual-NinaA contenant ABCG2 (réalisé précédemment au laboratoire par Céline Trometer), en utilisant les oligonucléotides suivants :

Pfor 5' AAAAAAAAAACATATGAATCTTTATTTTCAGGGGGCATCTTGGCTGTCATGGC 3'  
 Prev 3' TATTGGATCCTTAGTGATTCTTCCACAAGCCCC 5' .

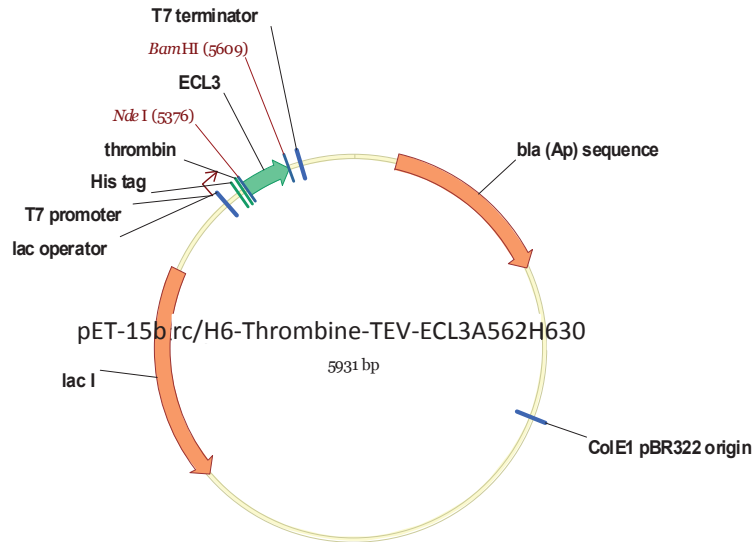


Figure 27 - Le plasmide pET15b.

La protéine résultante contient également un site de clivage par la thrombine afin de pouvoir retirer l'étiquette polyhistidine.

b) Clonage dans les cellules d'insectes

Le clonage dans les cellules d'insectes a été réalisé par Céline Trometer, dans le plasmide pFastBac Dual, comme décrit dans Trometer et Falson, 2010 (Figure 29). La protéine résultante est fusionnée à une étiquette 10 His.

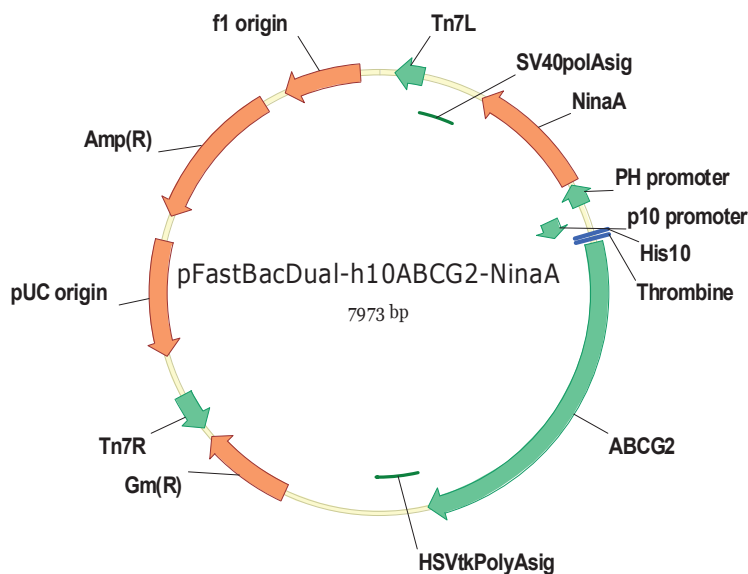


Figure 28 - Vecteur pFastBacDual contenant le gène H<sub>10</sub>ABCG2.

c) Clonage dans les cellules de mammifères

Le clonage d'ABCG2 dans les cellules FlpIn 293 a été réalisé par Ophélie Arnaud (IBCP). Les cellules K562 exprimant ou non ABCG2 ont été aimablement fournies par le Dr Zhou.

### 3. Amplification d'ADN en chaîne

Ici n'est détaillée que l'obtention du produit de PCR pour le clonage d'ECL3 dans pET15b, les expériences de mutagenèse dirigée étant décrites plus loin. Dans le milieu réactionnel sont ajoutés :

- 1 ng de matrice d'ADN
- 10 µl de tampon de la polymérase choisie, 5X colorless Go Taq buffer (Promega)
- 1 µM de sonde oligonucléotide côté 3' terminal Pfor (Sigma Aldrich)
- 1 µM de sonde oligonucléotide côté 5' terminal Prev (Sigma Aldrich)
- 0.2 mM de chaque dNTP,
- 1 U de Go Taq polymérase,
- Eau milliQ, q.s.p. 50 µl

Le milieu réactionnel est homogénéisé et placé dans un *DNA Thermal Cycler*, (PHC-3/OSI). Après une dénaturation initiale des brins d'ADN matriciel à 98°C pendant 2 minutes, la réaction se déroule par cycles successifs de trois étapes 1/ dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, 2/ hybridation spécifique des amorces oligonucléotidiques avec la matrice à 50°C pendant 30 secondes et 3/ élongation à 72°C pendant 1 minute avec la polymérase. Le nombre de copie d'ADN augmente alors de façon exponentielle. Ces trois étapes sont répétées 26 fois. Lors du dernier cycle, le temps d'élongation est augmenté à 10 minutes. A la fin de la réaction, le fragment d'ADN considéré a été multiplié par un facteur  $10^5$  à  $10^6$ .

Les produits de PCR ainsi obtenus sont purifiés des sels, des amorces, des nucléotides non incorporés et de la polymérase avec un kit « *High Pure PCR Product Purification Kit* » (Roche molecular Biochemicals).

### 4. Préparation des plasmides

#### a) Préparation analytique

La préparation des plasmides, qu'elle soit analytique ou quantitative, se déroule invariablement en trois phases : une phase de culture bactérienne, une phase de lyse et une phase de purification des plasmides.

Les bactéries contenant le plasmide à purifier sont cultivées pendant une nuit à 37°C, sous agitation, dans 5 ml de LB additionné, dans le cas de pET15b, de 100 µg/ml d'ampicilline. Le lendemain, la culture est centrifugée à 10 000 g pendant 5 minutes. La lyse et la purification sont réalisées grâce au kit « *NucleoSpin Plasmid* » (Macherey-Nagel). L'éluat additionné d'isopropanol est centrifugé à 15 000 g pendant 30 minutes. Le culot est

ensuite remis en suspension et lavé par de l'éthanol 70%. Une nouvelle étape de centrifugation permet l'obtention d'un culot d'ADN ultra-pur, reconstitué dans quelques  $\mu$ l d'eau stérile désionisée.

b) Préparation quantitative

Le principe est le même que pour une préparation analytique, avec ici comme objectif l'obtention de plasmide en grande quantité, gardé en stock à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour pouvoir ensuite réaliser les clonages.

Le mode opératoire est également identique au précédent, cette fois-ci à partir d'une culture plus importante de 250 ml et du kit « *NucleoBond Xtra maxi* » (Macherey-Nagel). Les volumes des solutions sont adaptés au volume de la culture.

## 5. Electrophorèse des acides nucléiques sur gel d'agarose

L'agarose est utilisé à des concentrations variables de 0,3 à 2% (poids/volume), selon la taille des fragments à séparer. Pour un gel à 1,1% en agarose, 0,66 g d'agarose (Sigma Aldrich) sont mélangés à 60 ml de tampon TBE (50 mM Tris borate pH 8,0, 1 mM EDTA) puis chauffés jusqu'à ébullition pour dissoudre l'agarose. La solution est ensuite refroidie à  $50^{\circ}\text{C}$  environ puis le gel est coulé en présence de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Gelred (Interchim) sur un support horizontal et laissé à solidifier à température ambiante.

Les échantillons sont additionnés d'une solution de dépôt concentrée à 6X (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol, 30% de glycérol, eau qsp) afin d'obtenir la concentration finale en solution de dépôt 1X. La migration s'effectue sous un voltage de 80 à 120 V à température ambiante jusqu'à ce que le front de migration atteigne environ les 3/5 du gel. Les bandes d'ADN colorées par le GelRed sont visualisées sous UV à 315 nm et photographiées. Le marqueur de masse moléculaire utilisé est le *MassRuler DNA Ladder* (Fermentas), constitué de 20 fragments, allant de 80 à 10 000 pb.

## 6. Clonage du gène d'intérêt dans un plasmide

a) Restriction du fragment d'ADN et du plasmide

Les enzymes de restriction utilisées pour le clonage de H<sub>6</sub>ECL3 dans pET15b sont NdeI et BamHI (NEB). Les sites de restriction de ces enzymes sont présents dans le plasmide au niveau du site multiple de clonage et dans l'insert, un site à chaque extrémité. Les digestions avec les deux enzymes sont réalisées en même temps.

Dans un tube Eppendorf, on introduit :

- 50  $\mu$ l de produits de PCR purifiés ou 2  $\mu$ g de plasmide



- 10 µl de tampon 2 (NEB)
- 10 U de NdeI
- 10 U de BamHI
- Eau milliQ qsp 100µl.

La réaction se déroule pendant 2h à 37°C. Le tube est ensuite transféré dans la glace.

b) Ligature par T<sub>4</sub> DNA ligase

Le plasmide et le fragment d'ADN à insérer sont mis en contact dans un rapport molaire 1/3 en présence de la ligase dans son tampon pendant une nuit à 16°C. Une partie des plasmides va se refermer en intégrant l'insert, tandis que l'autre va reformer le plasmide d'origine.

## 7. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est réalisée par PCR. Les oligonucléotides sont conçus de manière à contenir la mutation désirée au milieu de la séquence, bordée de 10 à 15 bases de part et d'autre. Par ailleurs, la température de fusion des amorces doit au moins être égale à 78°C. On peut estimer la température de fusion T<sub>m</sub> à l'aide de la formule empirique :

$$T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ GC}) - 675/N$$

Où N est le nombre de bases du plasmide.

Les amorces utilisées pour la mutagenèse de H<sub>6</sub>ECL3 sont récapitulées dans le Tableau 3 ci-dessous.

Nom de l'amorce	Séquence 5' - 3'
<b>H583A<sub>For</sub></b>	ggatttacggcctttgcaggccaatgaatTTTTGGGACAAAacttctgc
<b>H583A<sub>Rev</sub></b>	gcagaagttttgtcccaaaaattcattggcctgcaaagccgtaaattcc
<b>C603A<sub>For</sub></b>	gcaacaggaacaatcctgccaaactatgcaacatgtactggcgaa
<b>C603A<sub>Rev</sub></b>	ttcgccagttacatggttgcatagttggcaggattgTTTTcctgTTgc
<b>Y605A<sub>For</sub></b>	gcaacaggaacaatccttgtaacgccgcaacatgtactggc
<b>Y605A<sub>Rev</sub></b>	gccagttacatgTTtgcggcgTTacaaggattgTTTTcctgTTgc

Tableau 3 - Séquences des amorces pour la mutagenèse de H<sub>6</sub>ECL3.

Le principe de la PCR est le même que précédemment. La PCR est effectuée à l'aide du kit « QuickChange Site-Directed Mutagenesis » (Stratagene). On introduit dans un tube Eppendorf :

- 50 ng de matrice d'ADN
- 5 µl de tampon de la réaction 10X (100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 200 mM Tris HCl pH 8,8, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA)
- 125 ng de sonde oligonucléotide côté 3' terminal
- 125 ng de sonde oligonucléotide côté 5' terminal
- 1 µl du mélange de dNTP,
- 1 µl d'ADN polymérase Pfu ultra (haute fidélité),
- Eau milliQ, q.s.p. 50 µl

Le milieu réactionnel est placé à 95°C afin de déshybrider les deux brins d'ADN, puis 12 cycles de trois étapes sont réalisés 1/ dénaturation 30 secondes à 95°C, 2/ hybridation 1 minute à 55°C, 3/élongation à 68°C, 1 minute par kb.

A l'issue de la PCR, l'ADN matriciel (obtenu à partir d'une culture bactérienne, donc méthylé) est détruit par l'action de l'enzyme DpnI (1µl) au niveau des sites de méthylation, tandis que l'ADN nouvellement synthétisé est préservé.

## 8. Transformation des bactéries

### a) Préparation des cellules compétentes

On ensemence 100 ml de milieu LB par 1 ml d'une préculture bactérienne réalisée la nuit précédente. La culture est placée à 37°C jusqu'à obtention d'une absorbance de 0,4 à 600 nm, puis répartie dans deux tubes de 50 ml et disposée dans la glace pendant 10 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés une première fois, pendant 7 minutes à 1600 g à 4°C. Les culots obtenus sont suspendus dans 10 ml de tampon de compétence froid (60 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glycérol, 10 mM PIPES, PH 7,0, autoclavé), puis re-centrifugés pendant 5 minutes à 1600 g. Ils sont alors à nouveau suspendus dans le même tampon, laissés 30 minutes dans la glace et centrifugés comme précédemment. Les culots sont enfin repris dans 2 ml de tampon de compétence, aliquotés par fractions de 200 µl et congelés à -80°C.

### b) Transformation des bactéries compétentes

Dans un tube, 2 µl du milieu de ligation contenant 50 ng d'ADN, ou 2 µl de la PCR de mutagenèse sont mis en contact avec 50 µl de bactéries compétentes. Après 20 minutes dans la glace, un choc thermique de 2 minutes à 42°C est réalisé, puis les tubes sont à nouveau

placés dans la glace pendant 2 minutes. Chaque tube est alors additionné de 950 µl de milieu LB et mis à incuber 1h à 37°C, sous agitation lente (200 rpm). Les bactéries sont centrifugées à 10 000 rpm pendant 1 minute et le culot est repris dans 100 µl de LB. Les bactéries sont étalées sur LB solidifié avec 1,5% d'Agar et additionné d'agent de sélection. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

c) Analyse des clones ayant crû sur milieu sélectif

Après une nuit à 37°C, plusieurs clones ont poussé. Dans le cas de la mutagenèse, les clones sont remis en culture dans 5 ml sur la nuit, et une préparation d'ADN plasmidique est réalisée le lendemain. L'ADN est ensuite envoyé pour séquençage pour vérifier la présence de la mutation. En ce qui concerne le clonage d'H<sub>6</sub>ECL3 dans pET15b, plusieurs clones sont prélevés et placés dans 100 µl d'eau stérile. Un volume de 10 µl est prélevé et déposé sur une boîte repérée, qui sera ensuite placée à 37°C la nuit suivante. Une réaction de PCR est réalisée à partir d'1 µl du volume restant afin d'amplifier notre insert. Un gel d'agarose permet ensuite de vérifier la présence ou non de l'insert dans les échantillons. De plus, les plasmides sont purifiés par préparation analytique et une partie est digérée puis mise à migrer sur gel d'agarose pour vérifier que la taille de l'insert corresponde bien à celle attendue.

## 9. Production de bacmides recombinants

a) Principe

La production du bacmide recombinant puis de baculovirus est réalisée avec le système Bac to Bac d'Invitrogen. Des bactéries DH10Bac (Invitrogen) contenant un bacmide sont transformées avec un plasmide particulier, possédant deux zones de recombinaison de part et d'autre du gène d'intérêt, compatibles avec celles présentes sur le bacmide bactérien. Le bacmide contient, au départ, un gène LacZ qui confère une couleur bleue aux bactéries quand elles poussent sur un milieu riche en IPTG. Lorsqu'elle est effective, la recombinaison induit une interruption de ce gène. Les bactéries possédant un bacmide recombinant forment donc des colonies blanches. Ces colonies sont ensuite mises en culture et leur bacmide est extrait puis analysé. La Figure 29 expose le système conçu par Invitrogen.

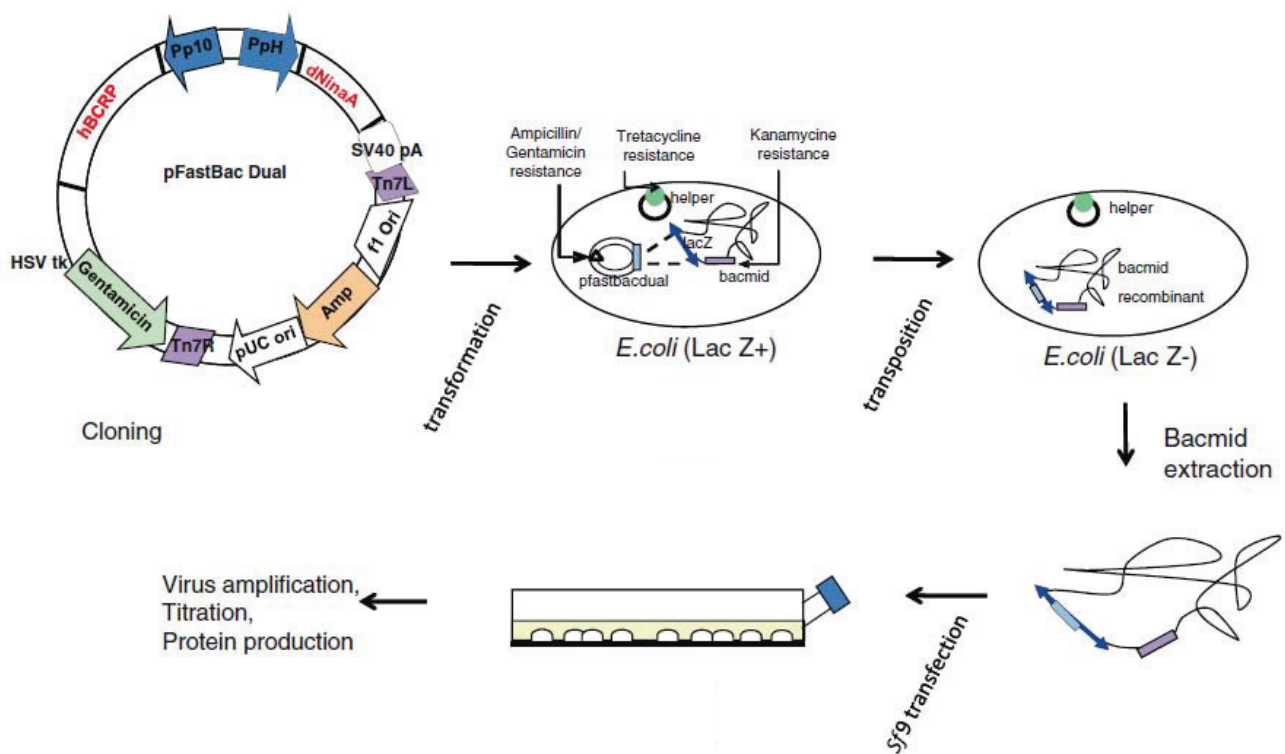


Figure 29 - Schéma de l'expression protéique avec le système Bac to Bac (Invitrogen)

## b) Mode opératoire

La transformation de 100  $\mu$ l de bactéries DH10Bac par 1 ng de plasmide pFastBacDual-H<sub>10</sub>ABCG2 est réalisée comme décrit plus haut dans « Transformation des bactéries ». En revanche, les bactéries sont incubées 4h au lieu d'une, afin de permettre la recombinaison. Elles sont ensuite étalées sur un milieu LB solidifié par 1,5% d'Agar, additionné de 50  $\mu$ g/ml de kanamycine, 7  $\mu$ g/ml de gentamicine, 10  $\mu$ g/ml de tétracycline, 100  $\mu$ g/ml de X-Gal et 40  $\mu$ g/ml d'IPTG, et laissées 48 h à 37°C. Une colonie blanche est remise en culture dans 200 ml sur la nuit à 37°C, et le bacmide est extrait à l'aide du kit « S.N.A.P MidiPrep Kit » (Invitrogen).

## II Préparation et analyse des protéines

### 1. Surproduction de MBP-ECL3 en système bactérien

#### a) Culture et induction

100 à 200 ml de 2TY additionné de 1% de glucose (afin de réprimer les gènes chromosomiques du maltose des bactéries, l'un de ces gènes étant une amylase qui pourrait

dégrader l'amylose de la résine de chromatographie) et de 50 µg/ml d'ampicilline sont ensemencés à une absorbance de 0,1 à 600 nm à partir d'une préculture de bactéries transformées par le plasmide recombiné. Lorsque la culture atteint une absorbance de 0,6, la surproduction est induite par 0,5 mM d'isopropylthiogalactoside (IPTG). Après 3 heures d'induction à 30°C sous agitation, les bactéries sont centrifugées à 5000 g pendant 15 minutes à 4°C.

- Cas des protéines excrétées dans le périplasme : le culot est stocké sec toute la nuit, dans la glace à 4°C. Le lendemain, les bactéries sont lysées par choc osmotique : le culot est repris par 25 à 50 ml de tampon 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 20% sucrose, 1 mM EDTA et incubé à température ambiante pendant 20 minutes sous agitation. La suspension est centrifugée à 8000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot repris par 25 à 50 ml de tampon 5 mM MgSO<sub>4</sub> froid. Après ajout d'antiprotéases (Roche), la suspension est agitée 10 minutes dans un bain froid, puis centrifugée à nouveau, comme précédemment. Le surnageant résultant est additionné de 20 mM Tris-HCl pH 7,4 puis soumis à l'étape de chromatographie d'affinité.
- Cas des protéines restant dans le cytoplasme : le culot de bactéries est suspendu dans 10 ml de tampon (30 mM tris HCl pH 8,0, 20% sucrose) par 250 ml de culture, puis stocké si besoin à -80°C. Après décongélation éventuelle, 20 ml de bactéries sont éclatés par surpression/dépression avec une presse de French. La suspension bactérienne obtenue est ensuite centrifugée à 9000 g pendant 30 minutes. Le surnageant, dilué au 1/5<sup>ème</sup>, est alors soumis à une étape de chromatographie d'affinité.

#### b) Purification

La résine d'amylose est d'abord débarrassée de sa solution de conservation contenant 50% d'éthanol par lavage avec 10 volumes d'eau milliQ, puis équilibrée avec 8 volumes de tampon de colonne (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA). Le surnageant obtenu après éclatement des bactéries est déposé sur 1 à 2 ml de résine, dont la capacité de fixation est d'environ 10 mg de protéine par ml. La colonne est ensuite lavée par 10 volumes de tampon de colonne. L'élution est enfin réalisée par 10 volumes de tampon d'élution (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 10 mM maltose). L'éluat est récupéré par fraction de 500 à 1000 µl. L'élution de la protéine d'intérêt est suivie à 280 nm et électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

## 2. Surproduction de H<sub>6</sub>ECL3 en système bactérien

## a) Culture et induction

Une colonie de bactéries BL21(DE3) transformées avec le plasmide pET15bH<sub>6</sub>ECL3 codant pour H6ECL3, muté ou non, est mise en préculture une nuit à 37 °C sous agitation dans 30 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline. Le lendemain, 1 à 5 L de milieu LB contenant la même concentration en ampicilline sontensemencés à une DO<sub>600</sub> de 0,05 et placés à 37°C sous agitation 220 rpm. Lorsque la DO<sub>600</sub> atteint 0,6, on ajoute au milieu 0,5 mM d'IPTG et on laisse dans les mêmes conditions pendant 3h pour permettre l'induction de l'expression de la protéine.

## b) Purification

Après l'expression, les bactéries sont récoltées par centrifugation à 10 000 g pendant 15 minutes. Le culot est repris dans un tampon (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0, 100 mM NaCl), à raison de 10 ml par litre de culture. Les bactéries sont lysées en utilisant une presse de French, puis 2M de NaCl sont ajoutés et la solution est agitée 20 minutes à température ambiante. Elle est ensuite centrifugée 20 minutes à 10 000 g à 4°C, et le culot est repris dans le tampon de solubilisation (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM DTT, 1% FC12) et incubé 1h à température ambiante sous agitation faible. La solution est enfin centrifugée 1h à 100 000 g à 4°C.

Le surnageant récolté est chargé sur une colonne Nickel Hi-Trap Chelating HP de 1 ml (GE Healthcare), préalablement équilibrée avec 10 volumes de tampon A (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,1 mM DTT, 0,5% FC12). La colonne est lavée en deux temps, tout d'abord avec 10 volumes de tampon A puis avec 4 volumes de tampon B (même composition que le tampon A, avec seulement 0,1% FC12). La protéine est ensuite éluée par 5 volumes de tampon B, avec un gradient linéaire d'imidazole de 0 à 0,5 M. Les fractions protéiques sont concentrées sur un Amicon 3kDa (Millipore) et chargées soit sur une colonne de gel filtration Superdex 200 10/300 (GE Healthcare), équilibrée avec le tampon S200 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% FC12, pH 7,0). Les fractions protéiques sont rassemblées et la protéine est conservée à 4°C toute une nuit pour permettre la formation des ponts disulfure puis dosée.

## c) Retrait de l'étiquette poly-histidine

On ajoute 10 Unités de thrombine/mg de H6ECL3 et on laisse incuber à température ambiante sous agitation pendant 5h. L'efficacité de clivage est vérifiée sur SDS-PAGE. L'étiquette est ensuite retirée du milieu par passage sur colonne Nickel Hi-Trap Chelating HP de 1 ml (tampon B sans DTT) et gel filtration (idem plus haut).

3. Surproduction d'ABCG2 en cellules d'insecte *Sf9* et *Hi-5*

L'infection des cellules d'insectes, la préparation de membranes et la purification d'ABCG2 ont été réalisés par Lorena Martinez (IBCP, LPRAC), à partir des cellules *Hi-5*.

a) Infection des cellules par le baculovirus

La production du baculovirus et son amplification ont été réalisés selon le protocole Bac to Bac (Invitrogen) dans les cellules de *Sf9*. Le virus obtenu a ensuite été titré.

Les cellules *Hi-5* sont infectées à une MOI (Multiplicity Of Infection) de 0,1 par le baculovirus et laissées 72 h à 27°C sous agitation dans des « spinner ». Les cellules sont ensuite récupérées et centrifugées une première fois à 5 000 g pendant 10 minutes à 4°C, puis lavées avec du PBS et centrifugées à nouveau.

b) Préparation des membranes

Les étapes qui suivent sont réalisées à 4°C. Le culot cellulaire est suspendu dans un tampon (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM NaCl, 200 µM DTT, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, inhibiteurs de protéases (pastilles Roche)) à raison de 25 ml/l de culture et incubé une heure. Les cellules sont cassées en utilisant un appareil « Dounce » puis centrifugées à 15 000 g pendant une heure. Le culot est repris (500 µl/l de culture) dans 10 mM HEPES pH 8,0, 50 mM NaCl, 20% glycérol, 100 µM DTT, 1 mM EDTA et inhibiteurs de protéases et conservé dans l'azote liquide. La concentration protéique est estimée par dosage BCA.

c) Purification de la protéine

La solution de membrane est diluée jusqu'à 10 mg/ml dans un tampon 50 mM HEPES, pH 8,0, 2 M NaCl, 15% glycérol, 2 mM DTT et inhibiteurs de protéases (étape de pré-solubilisation). Après une incubation d'une heure à 4°C, elle est centrifugée 1h à 15 000 g et 4°C. Le culot obtenu est repris dans un tampon de solubilisation (50 mM HEPES, pH 8,0, 250 mM NaCl, 15% glycérol, 0,2 mM DTT, 40 mM DDM, 20 mM imidazole, inhibiteurs de protéases), incubé 2h à 4°C puis centrifugé à 100 000 g pendant 1h. Le surnageant est chargé sur une colonne Nickel Hi-Trap Chelating HP de 1 ml équilibrée dans 50 mM HEPES, pH 8,0, 250 mM NaCl, 15% glycérol, 10 mM DDM, 20 mM imidazole, inhibiteurs de protéases. La résine est lavée avec 16 volumes du même tampon puis ABCG2 est éluée dans le même tampon, avec un gradient de 0,02 à 1 M d'imidazole. La protéine est ensuite concentrée sur un Amicon 50 kDa.

#### 4. Analyse des protéines par électrophorèse et immunorévélation

a) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

i) Préparation des échantillons

La solution protéique contenant de 5 à 20 µg de protéines est diluée une fois avec le tampon de dépôt concentré 2X (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 4% SDS, 20% glycérol, 1,44 M β-mercaptoéthanol, 5 mM EDTA, 4 M urée et 0,002% bleu de bromophénol). Ce tampon est préparé sous forme de stocks conservés à -20°C. Les solutions sont incubées à température ambiante pendant 15 minutes. Dans le cas des échantillons bactériens, les solutions sont au préalable soniquées trois fois 10 secondes dans la glace avec la microsonde réglée à 20% de sa puissance maximale afin de libérer leur contenu protéique.

ii) Préparation des gels de 0,75 mm d'épaisseur

*Gel de séparation* : 10 ou 16% d'une solution acrylamide-bisacrylamide (en proportion 37,5 pour 1), 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfate ammonium. La polymérisation s'effectue en ajoutant extemporanément 0,3 µg/ml de *N,N,N',N'*-tétraméthyl-éthylène-diamine (TEMED).

*Gel de concentration* : 5% d'une solution acrylamide-bisacrylamide (en proportion 37,5 pour 1), 0,375 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% persulfate ammonium. La polymérisation s'effectue en ajoutant extemporanément 0,78 µg/ml de TEMED.

iii) Migration

Les échantillons sont déposés sous un volume maximal de 20 µl. La migration est effectuée à 120 V et 25 mA par gel dans le tampon de migration (25 mM Tris-HCl pH 8,8, 192 mM glycine et 0,1% SDS).

iv) Coloration et décoloration

Les protéines sont colorées pendant 30 minutes à 1h dans une solution de coloration au Coomassie puis décolorées par une solution de décoloration contenant 10% d'acide acétique, 10% d'éthanol et 1% de glycérol.

b) Immunorévélation par Western-blot

Une membrane de PVDF, mouillée au méthanol, est incubée 5 minutes dans le tampon de transfert « CAPS » (100 ml de méthanol, 0,4 g de NaOH, 2,21 g de CAPS, 900 ml d'eau milliQ, pH 11,0) froid, de même que le gel d'acrylamide. Le gel est placé sur une feuille de papier Whatman 3M imbibée de tampon CAPS. La membrane est placée sur le gel et les bulles d'air sont éliminées à l'aide d'une pince. Le tout est recouvert d'une deuxième feuille de papier et l'ensemble est déposé entre deux pièces de mousse imbibées de tampon CAPS et bloqué entre deux plaques de plexiglas perforées. Le montage est placé dans le bac de migration, la cuve est remplie de tampon CAPS et un réservoir de glace et un barreau aimanté sont ajoutés. La migration se fait sous 100 V et 250 mA (constant) pendant une heure sous



agitation. Une fois la migration terminée, la membrane est lavée dans du tampon TBST (1 mM Tris-HCl pH 8,3, 15 mM NaCl, 0,1% Tween 20) puis saturée dans un mélange de lait et TBST. La membrane est à nouveau lavée puis incubée une heure minimum avec un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt. Après lavage, une deuxième incubation d'une heure avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase est réalisée. La révélation a lieu après incubation quelques secondes dans une solution contenant le substrat de la peroxydase, dans un ChemiDoc Universal Hood III (BioRad).

### III Analyses biochimiques et biophysiques

#### 1. Dosage des thiols libres

Le dosage des thiols libres d'ECL3 est réalisé en parallèle d'une gamme de GSH de 0 à 5  $\mu$ M qui sert de référence. Le DTNB est préparé en dissolvant 20 mg de DTNB dans 10 ml de tampon A (100 mM Tris HCl pH 7,0, 0,1 mM EDTA) puis dilution dans tampon B (10 mM Tris HCl pH 7,0, 0,1 mM EDTA). La gamme étalon ainsi que les échantillons sont déposés dans une plaque 96 puits, en présence du tampon A et de la solution diluée de DTNB. Le mélange est incubé 30 min à température ambiante et l'absorbance de la plaque est lue à 410 nm.

#### 2. Test d'oxydation en présence de Cu(Phe)<sub>3</sub>

Le Cu(Phe)<sub>3</sub> est préparé comme suit : 18 mg de phénanthroline sont pesés et mis en présence de 120  $\mu$ l de CuSO<sub>4</sub>. On ajoute ensuite 10 ml de tampon 10 mM Tris et 0,1 % de FC12, pH 8. La protéine ECL3 (17  $\mu$ g) est incubée 1h à température ambiante avec différentes concentrations (1, 1/10<sup>ème</sup>, 1/100<sup>ème</sup>) de Cu(Phe)<sub>3</sub> puis déposée sur SDS-PAGE dans un tampon de dépôt contenant ou pas du  $\beta$ -mercaptoéthanol.

#### 3. Dichroïsme circulaire

##### a) Principe

Le dichroïsme circulaire (CD) est reconnu comme une bonne technique pour examiner la structure des protéines en solution. L'origine de l'effet observé en CD provient de la différence d'absorption entre les polarisations circulaires droite (R) et gauche (L) d'une onde lumineuse. Après passage à travers un échantillon, la radiation des composants R et L peut avoir une polarisation radiale ou elliptique. Un signal de CD est observé lorsque un chromophore est chiral parce que 1/ il est naturellement chiral, comme les ponts disulfure par exemple, 2/ il est lié à un centre chiral ou 3/ il est placé dans un environnement asymétrique

en fonction de la structure tridimensionnelle de la molécule. Concernant les protéines, la technique de CD peut notamment permettre de déterminer la composition de la structure secondaire (% hélices, feuillet  $\beta$ ...), ainsi que la qualité du repliement.

### b) Mode opératoire

Les spectres de CD de H<sub>6</sub>ECL3 purifiée ont été réalisés sur un Chirascan (Applied Photophysics), à température ambiante et dans une cuvette de longueur optique 1 mm, entre 250 et 190 nm. Ils ont été enregistrés avec un pas de 0,2 nm, une bande passante de 0,5 nm et un temps d'intégration de 1 seconde. La protéine H<sub>6</sub>ECL3 a été utilisée à 10  $\mu$ M en tampon phosphate 10 mM, pH 7,0, en présence de concentrations variable d'urée (0 à 5 M) Les spectres ont été corrigés de la ligne de base et lissés par le logiciel du Chirascan sur la base de l'algorithme de Savitzky-Golay. Les pourcentages des structures secondaires ont été calculés par déconvolution des données *via* le site DichroWeb.

## 4. Spectrométrie de masse

On utilise ici la technique LC/MS/MS, sur une solution de H<sub>6</sub>ECL3 purifiée, oxydée ou réduite. L'expérience a été réalisée par le plateau technique de spectrométrie de masse de l'IBCP, dirigée par le Dr Michel Becchi. Brièvement, les cystéines réduites de la protéine sont alkylées par l'iodoacétamide, puis on procède à une trypsinolyse. Les peptides résultants sont analysés par couplage chromatographie liquide/spectrométrie de masse. La chromatographie est une NanoLC, sur un appareil Dionex, avec une colonne nano C18 de 0,75x150 mm. La spectrométrie de masse est réalisée sur un Q-Star XL de AB Sciex, par ionisation nanospray.

## 5. Spectrophotométrie d'absorbance

Une solution d'hémine saturée est préparée en solubilisant environ 10 mg d'hémine dans 50  $\mu$ l de 0,1 M KOH, suivi d'une dilution dans 950  $\mu$ l de tampon (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2, 100 mM NaCl). La solution est centrifugée à 11 000 g pendant 3 minutes et la concentration d'hémine est déterminée à 385 nm, en prenant 58 400 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> comme coefficient d'extinction molaire. Pour les essais spectrophotométriques UV-Visible sur DU 640 (Beckman) ou V-630 Bio (Jasco), ECL3 est placée à une concentration de 10  $\mu$ M dans une cuve en quartz de trajet optique 1 cm, en utilisant le tampon S200 comme blanc (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% FC12, pH 7,0). Les spectres sont enregistrés entre 240 et 700 nm, en présence

de concentration variable d'hémine (0-50  $\mu\text{M}$ ) et/ou de HSA (0-10 $\mu\text{M}$ ). Les spectres sont corrigés du tampon et normalisés à 280 nm.

## 6. Spectrofluorimétrie

Les expériences sont réalisées à température ambiante, sur un spectrofluorimètre Photon Technology International Quanta Master I. Les mesures sont enregistrées dans des cuvettes en quartz de 500  $\mu\text{l}$ , de trajet optique 0,5 cm (Hellma). Les expériences sont réalisées sur ECL3 (3  $\mu\text{M}$ ) dans un tampon 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,1% FC12, pH 7,0, 20% glycérol, sur ABCG2 (0,1  $\mu\text{M}$ ), dans un tampon 50 mM HEPES, pH 8,0, 250 mM NaCl, 15% glycérol, 10 mM DDM, 1,6 mM CHAPS, ou sur BmrA, dans un tampon 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,3% FC12, 0,02 mM EDTA, 0,1 mM DTT et anti-protéases. Les données sont ensuite traitées à l'aide du logiciel Sigma Plot, version 11 (Sytat Software Inc.), et les courbes fittées selon différentes équations.

### a) Fluorescence intrinsèque

On utilise les propriétés fluorescentes de certains résidus protéiques, en particulier les tryptophanes. Ils sont excités à 295 nm et la fluorescence émise est enregistrée entre 310 et 370 nm, en présence de concentrations variables (le plus souvent 0-15  $\mu\text{M}$ ) du ligand à tester. Les spectres obtenus sont corrigés du tampon et de l'effet de filtre interne (diminution non spécifique de la fluorescence de la protéine en réponse à une excitation moins importante du fait de l'absorption d'une partie de la lumière excitatrice par le ligand à tester) par l'utilisation du N-acétyl-tryptophan-amide (solution de tryptophanes libres, NATA). Une interaction entre le ligand et la protéine induit des changements conformationnels et, par ce biais, de l'environnement des tryptophanes. On assiste alors à une diminution de la fluorescence de la protéine (quenching). La courbe de saturation obtenue à partir des pourcentages de quenching de fluorescence est ajustée à l'aide du logiciel SigmaPlot, version 11. Les équations utilisées sont les suivantes : Equation 1 :  $f = B_{\text{max}} * \text{abs}(x) / (K_d + \text{abs}(x)) + N_s * x$ , où  $N_s$  représente la fixation non spécifique, équation 2 :  $f = F_{\text{min}} + ((F_{\text{max}} - F_{\text{min}}) * ((E + x + K_d) - \text{SQRT}((E + x + K_d)^2 - 4 * E * x))) / (2 * E)$ , qui prend en compte la concentration résiduelle en enzyme (Falson et al., 1993), équation 3 :  $f = A + (D - A) / (1 + 10^{((x - \log C) * B)})$ , où  $\log C$  représente le  $K_d$ .

### b) Cinétique

La protéine est excitée à 295 nm et sa fluorescence émise est lue à une longueur d'onde (maximum du pic de fluorescence, soit 336 nm pour ECL3 et 328 nm pour ABCG2), en fonction du temps. Après avoir enregistré la fluorescence basale de la protéine pendant un temps donné (environ 100 secondes), on ajoute de l'hémine dans la cuve (2 à 6  $\mu\text{M}$ ). La nouvelle fluorescence est enregistrée, pendant 100 à 200 secondes. Enfin, on ajoute de la HSA (3 à 8  $\mu\text{M}$ ) et on enregistre la nouvelle fluorescence. Les valeurs obtenues pour la protéine sont corrigées de celles du tampon.

## 7. Billes magnétiques

L'expérience est réalisée à l'aide d'un robot Biosprint 15 (Qiagen), au sein du laboratoire de Production et Analyse des Protéines, avec l'aide du Dr Annie Chaboud. Les billes magnétiques sont les Ni-NTA Magnetic Agarose Beads (Qiagen), qui capturent les protéines possédant une étiquette poly-histidine. A chaque essai, on utilise 50  $\mu\text{l}$  de billes, soigneusement lavées au préalable dans le tampon souhaité (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0, 150 mM NaCl, 0,1% FC12), puis mises en contact avec 100  $\mu\text{l}$  de la solution contenant H<sub>6</sub>ECL3 (200  $\mu\text{g}$ , soit 20 nmol/100  $\mu\text{l}$ ), pendant 30 minutes, à 4°C sous agitation lente, ce qui permet la fixation de la protéine. Les billes sont retirées à l'aide d'un barreau aimanté puis lavées 3 fois dans 600  $\mu\text{l}$  de tampon. La protéine est dosée dans les différentes fractions (solution initiale et lavages) afin de déterminer la quantité de protéine fixée sur les billes. Elles sont ensuite placées dans le robot au niveau de la première cupule contenant 500  $\mu\text{l}$  de la solution de l'interactant potentiel. Le programme choisi comprend une étape de mélange intensif de 20 minutes, suivi de trois lavages dans un tampon 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0, 300 mM NaCl, 0,1% FC12, et enfin d'une élution dans 50 à 500  $\mu\text{l}$  de tampon E (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0, 300 mM NaCl, 0,1% FC12 et 300 mM imidazole). L'éluât est ensuite analysé par SDS-PAGE ou spectrophotométrie.

## 8. « Pull down » sur résine d'hémine-agarose

Les expériences sont réalisées à partir de cellules K562 exprimant ou non ABCG2. Les cellules sont lysées dans un tampon stabilisant les membranes (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM Tris-HCl, pH 7,5 et 1 mM EDTA) et 50  $\mu\text{g}$  de protéines totales sont incubées 15 minutes à température ambiante avec 500 nM d'hémine-agarose, en présence de concentrations variables de l'anticorps 5D3 (0-2 ng/ $\mu\text{l}$ ). Après l'incubation, la résine est centrifugée et le matériel non fixé est enlevé. La résine est lavée deux fois avec un tampon de lavage (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl et 10 mg/ml de triton X-100), puis repris

dans 20  $\mu$ l de tampon de dépôt pour SDS-PAGE et centrifugé à nouveau à 10 000 g pendant 2 minutes à 4°C. Le matériel fixé et non fixé est analysé sur un SDS-PAGE 10%, puis transféré sur membrane de PVDF et révélé par un anticorps monoclonal spécifique d'ABCG2, BXP-21 (1/500<sup>ème</sup>, Millipore).

## 9. Dosage d'hème cellulaire et mitochondrial par HPLC

### a) Préparation de lysat cellulaire total

Cinq millions de cellules K562 exprimant ou non ABCG2 sontensemencées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> et stimulées pendant 21 h à 37°C en présence de 1 mM d'acide  $\delta$ -aminolévulinique (ALA) et/ou de 1  $\mu$ M de KO143. Les cellules sont ensuite récoltées et soigneusement lavées au PBS, puis centrifugées 5 minutes à 200 g. 50  $\mu$ l de DMEM et 20  $\mu$ l de DMSO sont ajoutés et le mélange est vortexé vivement pendant 5 minutes. 200  $\mu$ l d'un mélange 60% éthanol, 40% 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> monobasique sont additionnés, puis la solution est vortexée à nouveau pendant 5 minutes. Enfin, une centrifugation à 13 000 g pendant 15 minutes est effectuée, et le surnageant est récupéré pour être soumis à analyse HPLC.

### b) Préparation de mitochondries par centrifugation différentielle

Cinq millions de cellules K562 exprimant ou non ABCG2, stimulées comme précédemment, sont lavées au PBS puis reprises dans un tampon 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 10 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM EDTA et lysées après 30 passages à travers une aiguille de 25G, 16 mm, seringue de 1 ml. La solution est centrifugée à 2 000 g pendant 5 minutes à 4°C puis le surnageant est re-centrifugé à 13 000 g pendant 10 minutes, à 4°C. Le culot résultant est lavé plusieurs fois avec le même tampon et centrifugé à nouveau comme précédemment avant d'être remis en suspension dans 200  $\mu$ l du mélange 60% éthanol et 40% 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> monobasique.

### c) Dosage de l'hème par HPLC

Les expérimentations ont été menées par le Dr Damien Ficheux (IBCP). La colonne utilisée est une C18 5 $\mu$ m, 300 Å, 4,6x250 mm, équilibrée dans un mélange 80% de tampon A (H<sub>2</sub>O, 0,1% d'acide trifluoroacétique) et 20% de tampon B (95% acétonitrile, 5% H<sub>2</sub>O, 0,08 TFA). L'injection de 50  $\mu$ l d'échantillon déclenche le gradient isocratique de tampon B 20-100%, sur 10 minutes, puis 100% pendant 6 minutes. Le détecteur est calibré pour la lecture de l'absorbance à 400 nm au cours du temps. Les temps de rétention et l'amplitude des pics des composés renseignent sur leur identité et leur concentration. L'injection de référence

permet de déterminer les temps de rétention de l'hémine et de la PPIX, respectivement observés à 13 et 16 minutes.

## 10. Formulation d'ECL3 en polylactates

ECL3 est diluée dans le tampon S200 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% FC12, pH 7,0) jusqu'à la concentration de 50 µg/ml. La protéine est mise en contact avec un même volume de nanoparticules poly(D,L-lactic acid) (ou PLA, aimablement fournis par le Dr Bernard Verrier de l'IBCP) à 0,5%, sans surfactant, et le mélange est laissé 2 h à température ambiante sous agitation afin de laisser le temps à la protéine de s'adsorber sur les PLA. A la fin de l'incubation, le mélange est centrifugé plusieurs fois à 1 000 g pendant 10 minutes jusqu'à clarification du surnageant. Le culot est repris dans du PBS stérile afin d'obtenir une concentration finale d'ECL3 à 0,2 mg/ml. Le rendement d'adsorption est calculé après dosage des protéines du surnageant.

La taille des complexes PLA-ECL3 ainsi que leur dispersion à 25°C est contrôlée par la méthode de diffusion inélastique de la lumière sur un Zetasizer Nano S (Malvern Instruments).

## 11. Cytométrie de flux

### a) Principe

La cytométrie de flux s'applique à la caractérisation qualitative et quantitative de tous types de cellules. Elle permet l'étude précise de cellules isolées entraînées dans un flux de liquide. Les cellules, alignées et séparées d'au moins 1 µm, défilent à grande vitesse (30 µm/s) devant une source lumineuse (laser ou lampe). Chaque cellule marquée produit un flash de fluorescence variant avec les propriétés biologiques particulières de la cellule analysée. La lumière émise est collectée et dirigée vers des détecteurs. Les logiciels transforment ces données en histogrammes mono- ou multiparamétriques et délivrent la fluorescence moyenne de la population cellulaire étudiée dans différentes conditions.

### b) Mode opératoire

Les expériences sont réalisées avec des cellules HEK 293 et K562 exprimant ou non ABCG2. On ensemence 100 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits et ces dernières sont conservées à 37°C, dans les conditions habituelles de culture. Le lendemain, les cellules sont traitées comme suit :

- *Phase d'accumulation de substrat* : 200 µl d'une solution de 20 µM de mitoxantrone ou 10 µM de ZnMP (zinc-mésoporphyrine, analogue de l'hème) (substrat fluorescent) est mise au contact des cellules en présence de 2 ou 10 µM d'homopeptide (inhibiteur à tester), de GF 120918 ou de KO 143, inhibiteurs de référence, pendant 30 minutes à 37°C. Pendant cette phase, la mitoxantrone s'accumule dans les cellules.
- *Phase d'efflux du substrat* : les cellules sont lavées au PBS et incubées pendant 1h à 37°C en présence de l'agent inhibiteur (homopeptide, GF 120918 ou KO 143) et en absence du substrat fluorescent. Cette étape permet l'efflux du substrat hors des cellules.
- *Récolte des cellules et analyse* : les cellules sont lavées puis trypsinées, remises en suspension dans 300 µl de PBS et conservées dans la glace. L'analyse est réalisée sur un FACScan et le substrat (mitoxantrone ou ZnMP) est excité à 488 nm.

Les valeurs de fluorescence obtenues sont corrigées du bruit de fond (fluorescence des cellules n'exprimant pas ABCG2, en absence de substrat mais en présence de l'inhibiteur) et l'efficacité d'inhibition des composés testés est calculée selon la formule :

$$[(\text{essai} - \text{maximum d'efflux}) / (\text{maximum d'accumulation} - \text{maximum d'efflux})] * 100$$

Où

Essai = fluorescence des cellules exprimant ABCG2, en présence de substrat et de l'inhibiteur testé

Maximum d'efflux = fluorescence des cellules exprimant ABCG2 en présence de substrat seulement

Maximum d'accumulation = cellules n'exprimant pas ABCG2, en présence de substrat.



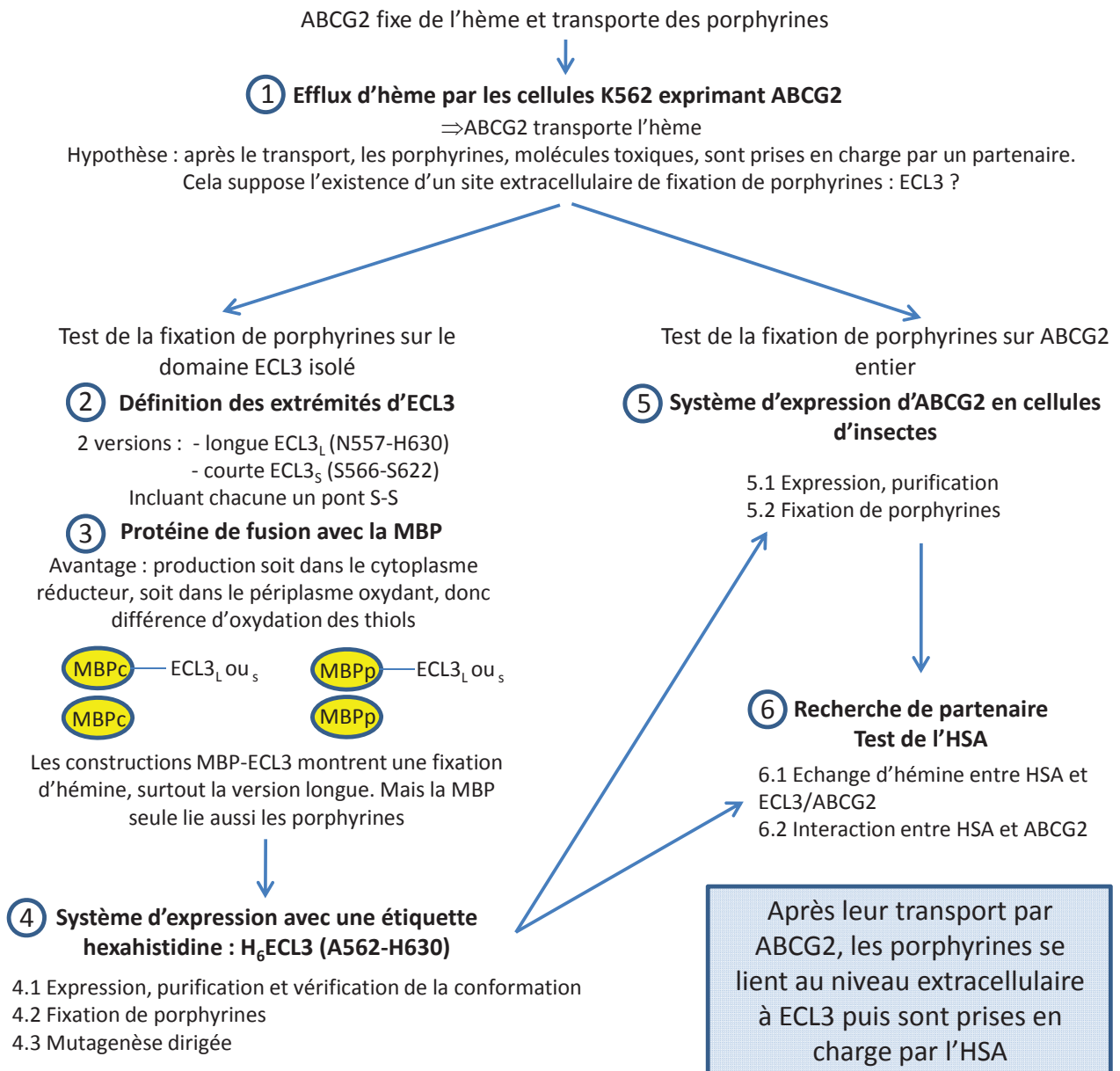


# RESULTATS



## Synopsis des travaux

### I- Rôle d'ECL3 dans la fixation et le relargage de porphyrines



### II- ABCG2 efflue-t-il l'hème hors des mitochondries ?

- II.1 Préparation de fractions mitochondriales
- II.2 Expression d'ABCG2 retrouvée dans ces fractions
- II.3 Pas de transport mis en évidence

### III- Travaux divers

Test d'homopeptides potentiellement inhibiteurs, Formulation d'ECL3 et test de la fixation de BmrA solubilisée en Stabicalix.

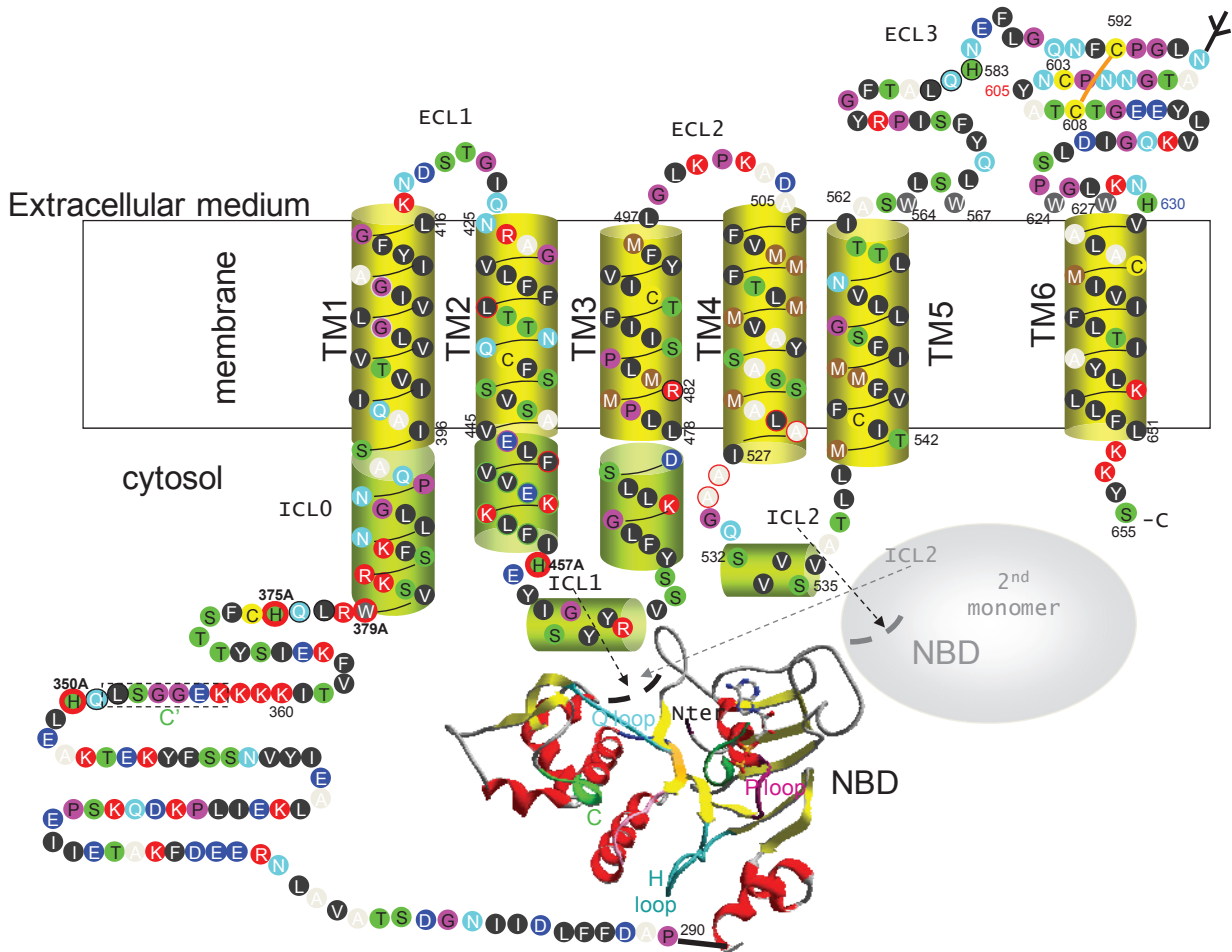


Figure 30 – Topologie d'ABCG2, d'après P. Falson, non publié.

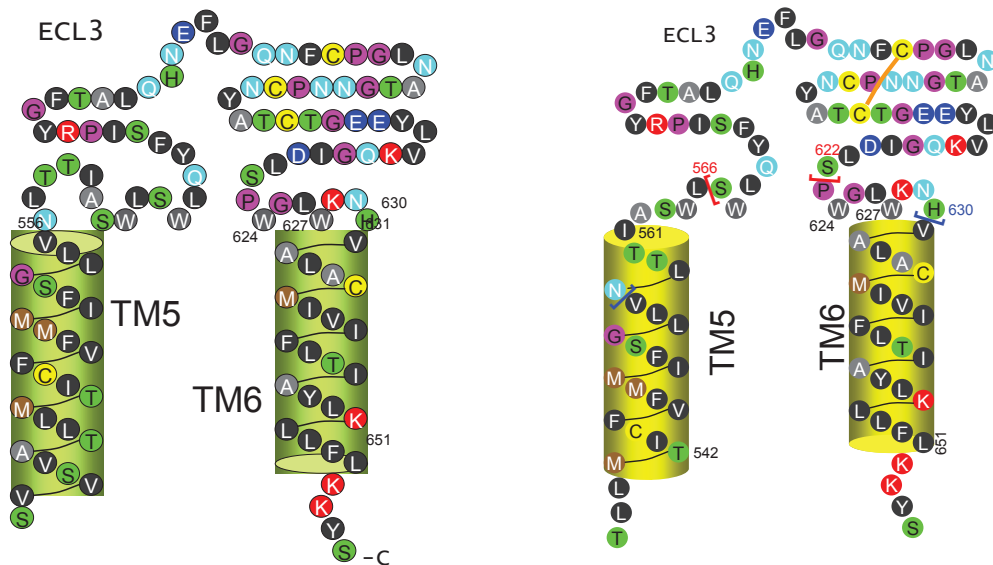


Figure 31 - Topologie d'ECL3.

Détail de modèles topologiques d'ABCG2 montrant deux limites possibles de la boucle extracellulaire ECL3, N557-H630 dans le modèle de gauche, et A562-H630 dans le modèle de droite. Les limites des versions courte et longue du domaine potentiel de liaison d'hème sont figurées en rouge et bleu respectivement. Le modèle de droite montre aussi le pont disulfure intramoléculaire proposé dans la littérature.

## **I Mise en évidence de la fixation de porphyrines par le domaine ECL3**

Le transport des porphyrines par ABCG2 participe à l'homéostasie de ces composés potentiellement très toxiques. Néanmoins, le mécanisme exact de leur prise en charge après transport reste inconnu. Nous formulons l'hypothèse que la troisième boucle extracellulaire d'ABCG2, ECL3, interviendrait dans cette prise en charge, ce qui impliquerait une capacité de cette région à lier les porphyrines. La mise en évidence de cette aptitude de liaison par ECL3 a été réalisée à la fois sur la protéine entière et sur le domaine isolé.

### **1. Transport d'hème par ABCG2**

Dans des articles publiés en 2004 puis 2007, Krishnamurthy et ses collaborateurs ont montré la capacité d'ABCG2 à fixer l'hème et à transporter des porphyrines. En revanche, bien qu'ils en déduisent qu'ABCG2 a également la capacité de transporter l'hème, ceci n'a jamais été montré expérimentalement. C'est pourquoi nous avons voulu tester cette hypothèse, afin de la valider de façon certaine.

#### **a) Topologie d'ABCG2**

La topologie d'ABCG2 est présentée ci-contre dans la Figure 30. La région d'intérêt ECL3 est la troisième boucle extracellulaire qui se situe entre les TM5 et 6.

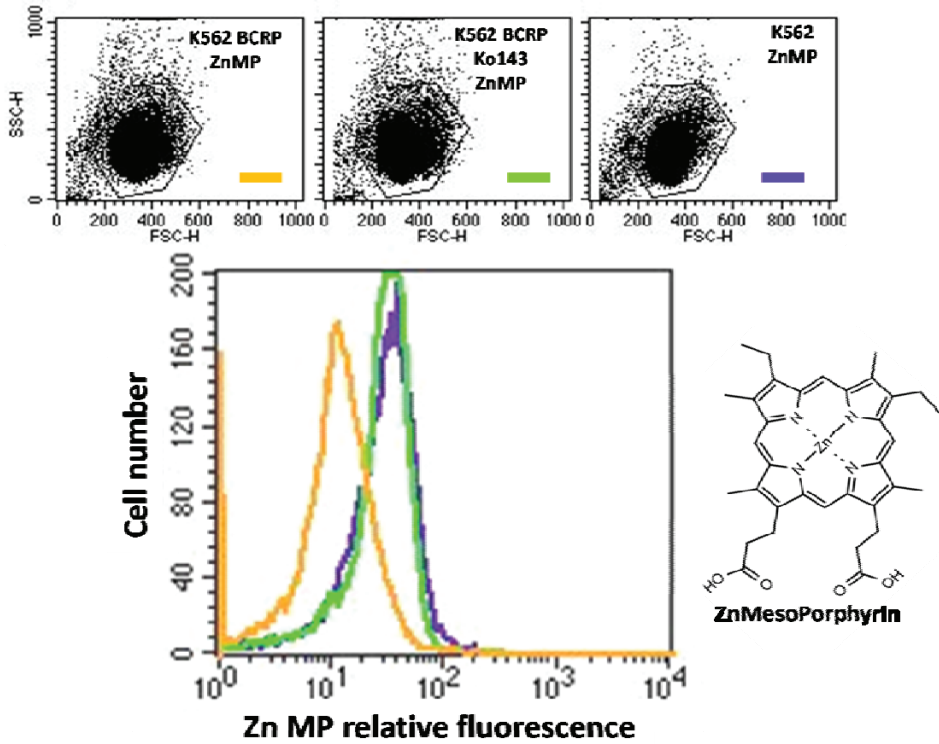


Figure 32 - Les cellules K562 exprimant ABCG2 effluent la ZnMP, un analogue de l'hème. Les cellules K562 exprimant ABCG2 effluent la ZnMP (orange), en comparaison des cellules contrôle (vert). L'ajout de 1  $\mu$ M de KO 143 (inhibiteur spécifique) bloque cet efflux (violet) et restaure le niveau de fluorescence initial. La structure de la ZnMP est représentée.

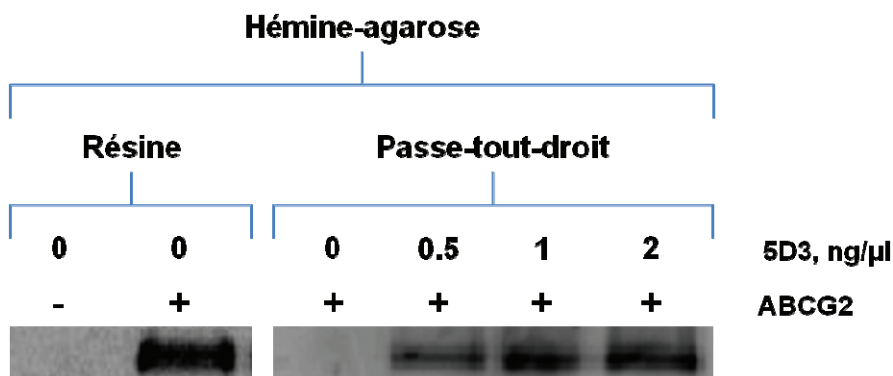


Figure 33 - La présence de 5D3 dont l'épitope se trouve sur ECL3 réduit la fixation d'ABCG2 sur résine d'hémime-agarose. Des lysats cellulaires de cellules K562 exprimant ou non ABCG2 sont soumis à un « pull down » en présence de résine d'hémime-agarose, en absence ou en présence de concentrations croissantes d'anticorps conformationnel 5D3.

## b) Transport d'hème par ABCG2

En premier lieu, nous avons testé la capacité d'ABCG2 à transporter l'hème. En effet, il a été montré qu'ABCG2 est capable de transporter des porphyrines (phéophorbide a et protoporphyrine IX), mais le transport d'hème reste non documenté dans la littérature. Nous avons utilisé la zinc-mésoporphyrine (ZnMP, voir Figure 32), un composé très semblable à l'hème, mais possédant un atome de zinc à la place du fer. Bien que les coordinances du zinc et du fer soient différentes avec les résidus protéiques comme les histidines, la zinc-mésoporphyrine est reconnue comme un analogue de l'hème (Worthington et al., 2001). Ophélie Arnaud, en thèse dans le laboratoire, a réalisé ces expériences. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 32.

L'expérience a été réalisée avec des cellules K562 qui nous ont aimablement été fournies par les Dr. Sheng Zhou et Albert Sorrentino. Cette lignée est dérivée des cellules d'un patient atteint d'une leucémie myéloïde aigüe en crise blastique. Ce sont donc des progéniteurs hématopoïétiques. On observe que les cellules K562 n'exprimant pas ABCG2 (en vert) présentent une fluorescence plus importante que celles qui l'expriment (en orange). De plus, l'ajout de 1  $\mu$ M d'un inhibiteur d'ABCG2 (KO143) restaure le niveau de la fluorescence dans les cellules exprimant ABCG2 (en violet), équivalent à celui des cellules qui n'expriment pas le transporteur, suggérant une accumulation de ZnMP dans ces cellules. Ces résultats montrent qu'ABCG2 transporte l'analogue de l'hème, et donc très probablement l'hème.

## c) Modulation de la fixation d'ABCG2 sur hémimine-agarose par le 5D3

5D3 est un anticorps conformationnel d'ABCG2, connu pour reconnaître le domaine ECL3 de la protéine. Nous supposons qu'il aurait la capacité d'interférer dans une liaison entre le domaine et un substrat. Il a été montré qu'ABCG2 est capable de se fixer à une résine d'hémimine-agarose (Krishnamurthy et al., 2004). Afin de déterminer si cette fixation a lieu au moins en partie par le biais d'ECL3, nous avons testé la capacité du 5D3 à déplacer cette liaison. Les résultats sont présentés en Figure 33. On observe qu'en absence de 5D3, la protéine ABCG2 se fixe sur la résine. En effet, on retrouve toute la protéine dans le culot alors qu'elle est absente dans le passe-tout-droit. Lorsque l'on ajoute des concentrations croissantes de 5D3, on assiste à un déplacement de la protéine de la résine vers le passe-tout-droit, ce qui suggère que l'anticorps gêne l'interaction entre l'hémimine et ABCG2, de façon concentration-dépendante. Ceci est compatible avec une implication d'ECL3 dans la fixation d'hémimine par ABCG2.

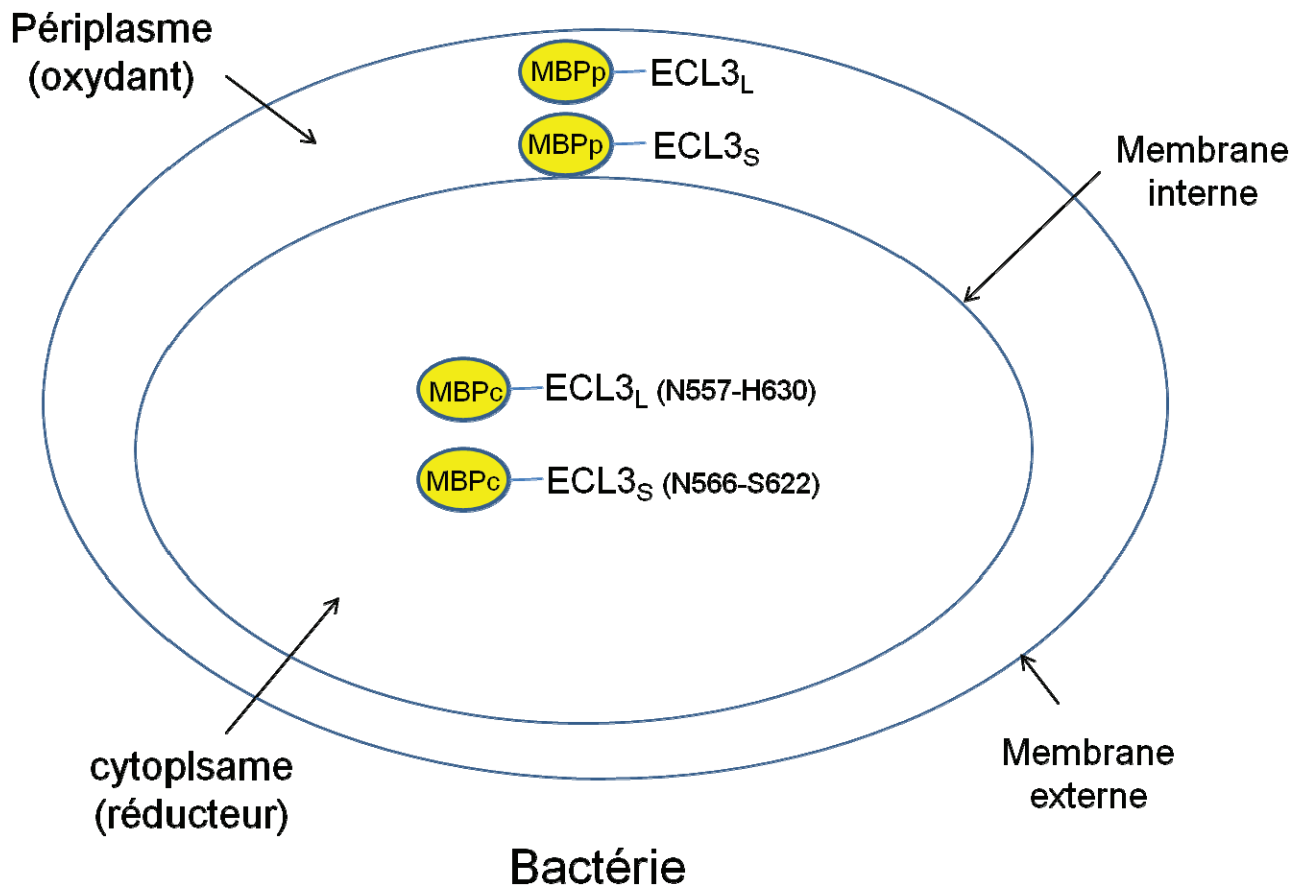


Figure 34 - Localisation des protéines produites en fusion avec la MBP.

ECL3L :

<sup>557</sup>NLTTIASWLSWLQYFSIPRYGFTALQHNEFLGQNFPCPLNATGNNPCNYATCTGEEYLVKQGIDLSPWGLWKNH<sub>630</sub>

ECL3S :

<sup>566</sup>SWLQYFSIPRYGFTALQHNEFLGQNFPCPLNATGNNPCNYATCTGEEYLVKQGIDLS<sub>62</sub>



## 2. Fixation sur ECL3 en fusion avec la Maltose Binding Protein d'*E. coli*.

ABCG2 est une protéine membranaire complexe, peu exprimée malgré le système d'expression en cellules d'insectes. La très faible quantité de protéine produite (100 µg/250 ml de culture) rend la purification très difficile et limite fortement le nombre d'expériences réalisables. Il a donc été décidé d'étudier en détail la fixation de porphyrines sur le domaine ECL3 isolé, produit en bactéries. Le système bactérien ne pose *a priori* pas de problème, puisque la glycosylation d'ABCG2 observée au niveau d'ECL3 sur l'Asn 596 n'est pas indispensable à la fonctionnalité de la protéine, et que la taille d'ECL3 (60 à 70 résidus) est suffisamment importante pour s'organiser en domaine. Le système bactérien permet la production du domaine en grande quantité, ce qui le rend plus facile à purifier et permet un grand nombre d'essais à chaque purification. De plus, travailler à partir du domaine isolé permet de s'affranchir des différents autres sites de fixations de substrats présents sur ABCG2. Les expériences seront par la suite réalisées sur ABCG2 entière.

Le domaine ECL3 étant de taille relativement modeste, nous avons décidé dans un premier temps de le produire en fusion avec une protéine de taille plus importante. La Maltose Binding Protein (MBP) est une protéine soluble de 42,5 kDa, fréquemment utilisée en fusion avec d'autres protéines recombinantes pour en augmenter la solubilité. Elle a également été décrite pour agir comme une protéine chaperonne qui améliore le repliement des protéines auxquelles elle est fusionnée (Sachdev et Chirgwin, 2000). Ces deux caractéristiques en font une protéine intéressante pour notre projet.

### a) Versions produites

Les premières expériences ont été réalisées sur ECL3 en fusion avec la MBP. Selon la présence ou l'absence d'une séquence d'adressage, la MBP produite peut être retrouvée soit dans le périplasma (supposé oxydant, MBPp) soit dans le cytoplasme (supposé réducteur, MBPc). Ces deux conformations offrent des zones d'accessibilité différentes aux composés et partenaires éventuels, nous avons donc testé la fixation des porphyrines sur ECL3 en conditions oxydante et réductrice. La topologie d'ECL3 est détaillée en Figure 31. Deux versions ont été envisagées, une version courte, constituée d'une soixantaine de résidus, et une version longue, étendue de part et d'autre de la version courte (une dizaine de résidus en plus), permettant d'ajouter des éléments potentiels de fixation d'hème (histidine). La version courte correspond aux résidus S566 à S622 et la version longue s'étend de N557 à H630.

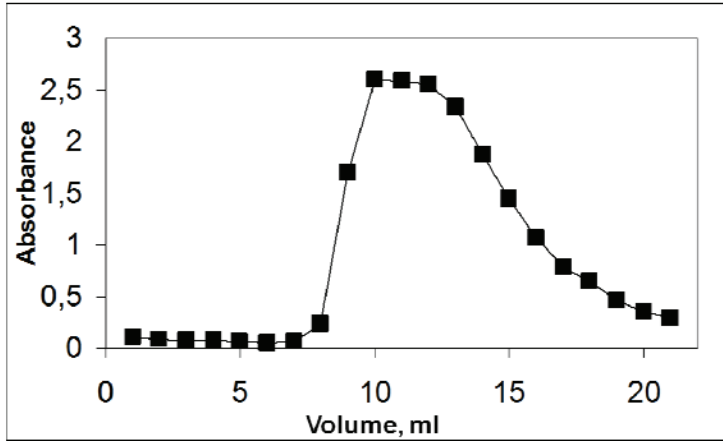


Figure 35 - Profil d'élution de la MBPc-ECL3court.

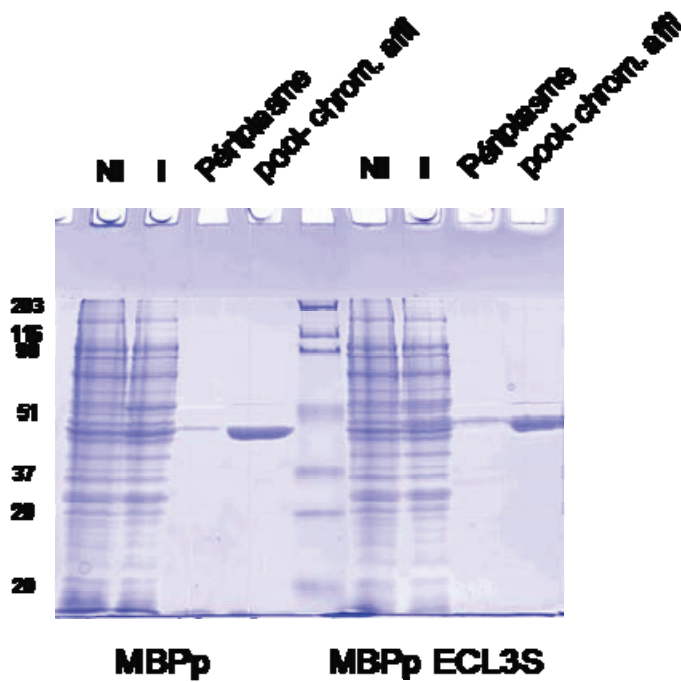


Figure 36 - Migration électrophorétique sur SDS-PAGE 12 % des protéines produites par la bactérie BL21(DE3), vecteur pmal p2G, après induction par l'IPTG, avant et après purification par chromatographie d'affinité amylose-maltose.

NI : protéines totales des bactéries non induites  
 I : protéines totales après induction  
 Périplasma : protéines totales du périplasma  
 Pool chrom. Affi : protéines obtenues après purification

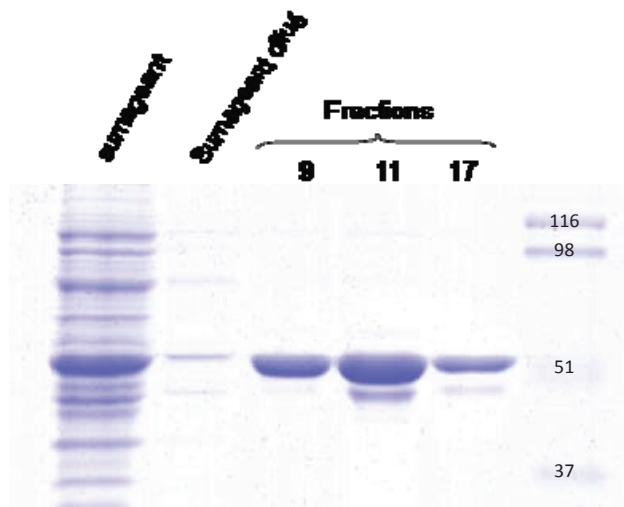


Figure 37 - Migration électrophorétique sur SDS-PAGE 12 % des protéines produites par la bactérie BL21(DE3) transformée avec le vecteur pMalc2G-ECL3court (codant pour la MBPc-ECL3court) après induction par l'IPTG, avant et après purification par chromatographie d'affinité amylose.

b) Expression et purification de MBP-ECL3

Après expression dans les bactéries BL21(DE3), les différentes protéines de fusion adressées au périplasma : MBPp, MBPp-ECL3court, ou accumulées dans le cytosol : MBPc, MBPc-ECL3court, MBPc-ECL3long ont été ensuite purifiées par chromatographie d'affinité sur résine d'amylose avec laquelle la MBP interagit. Un exemple de profil d'éluion obtenu est présenté ci-contre, Figure 35. Ils montrent que la protéine de fusion est éluée après addition du maltose. L'homogénéité de l'éluat obtenu a été vérifiée en déposant différentes fractions sur gel SDS-PAGE, comme illustré dans les Figure 36 et Figure 37.

Celles-ci montrent le faible niveau de contamination des fractions testées et donc la bonne efficacité de la purification, que l'on parte du périplasma (Figure 36) ou du cytoplasme (Figure 37), beaucoup plus riche en protéines. On note que les purifications réalisées à partir du cytoplasme permettent l'obtention d'environ 4 fois plus de protéines par rapport à la purification des protéines du périplasma, suggérant que le transfert des protéines du cytosol vers le périplasma est partiel. Les fractions contenant les protéines d'intérêt ont été réunies et conservées à 4°C, additionnées de 100 µM de DTT pour les versions cytoplasmiques.

c) Test de fixation d'hémine sur les protéines produites

La solution d'hémine stock utilisée est à une concentration de 200 µM. L'hémine est ajoutée progressivement dans les cuves à une concentration finale de 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8, 10 µM. La dilution induite par l'addition d'hémine n'excède pas 5%. Les spectres sont obtenus avec un spectrophotomètre Beckman DU 600. Pour comparer entre eux ces spectres, les valeurs d'absorbance des cuves témoin contenant le tampon et l'hémine sont soustraites de celles des cuves contenant la protéine testée. Les spectres sont ensuite normalisés à 280 nm (pic de protéine) afin de les comparer.

i) Test de la MBP

On suppose que la MBP, qu'elle soit périplasmique ou cytoplasmique, n'a pas de raison de lier l'hémine. Les spectres de cette dernière devraient donc être peu affectés par la présence de la protéine. Les résultats obtenus montrent que ce n'est pas le cas. En effet, nous observons un pic à 418 nm lorsque l'hémine est en présence de MBPc et à 415 nm lorsqu'il est en présence de MBPp, suggérant que celles-ci fixent la molécule (Figure 38).

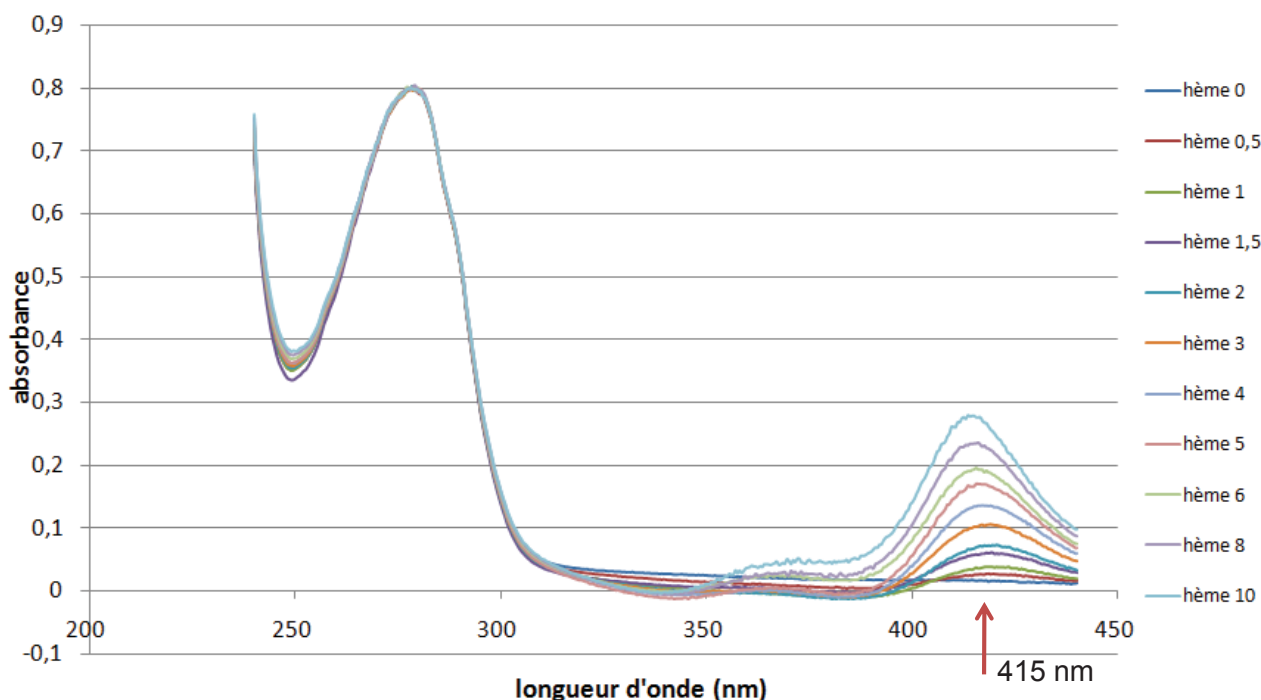


Figure 38 - Spectres normalisés de 10  $\mu\text{M}$  de MBPp en présence d'une concentration croissante d'hémine.

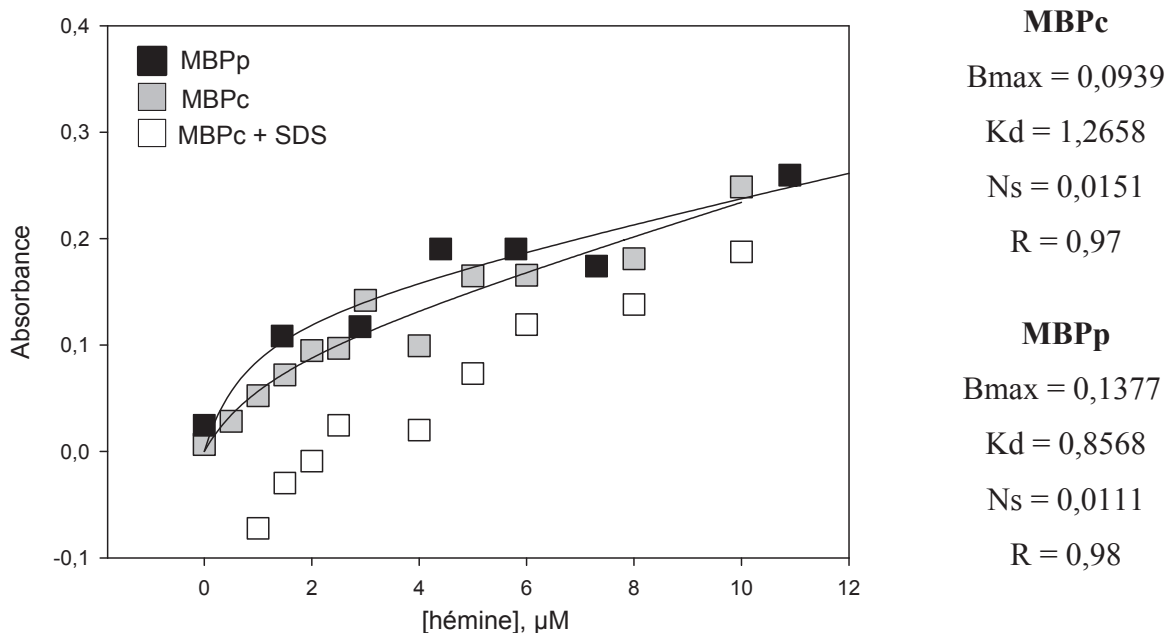


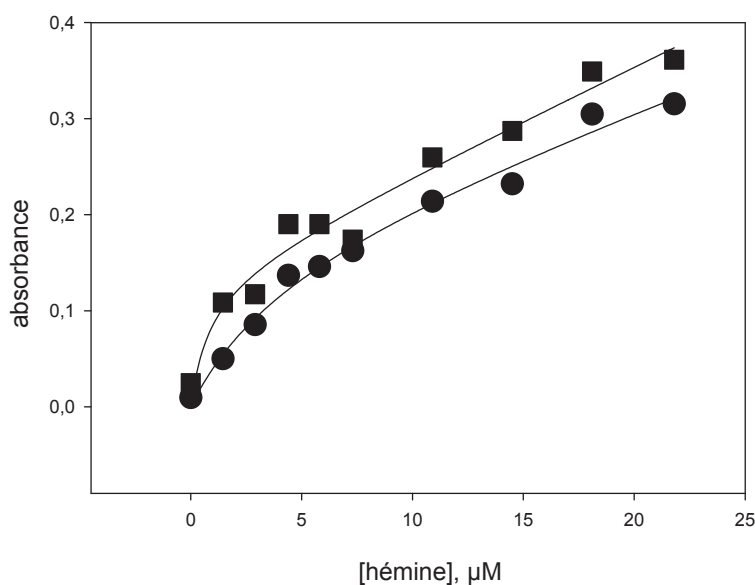
Figure 39 – Courbes de saturation de la fixation d'hémine sur la MBPc et la MBPp.

Courbes de saturation de la fixation d'hémine sur la MBPc à 418 nm (carrés gris) et sur la MBPp (carrés noirs), avec leur fit par SigmaPlot en considérant 1 site et une fixation non spécifique selon l'équation 1. La fixation d'hémine sur la MBPc en présence de SDS est représentée par les carrés blancs. Son absorbance est mesurée à 414 nm.

La représentation de l'absorbance du pic en fonction de la concentration d'hémine (Figure 39) montre une courbe de saturation pour les MBPp et MBPc que l'on peut modéliser avec le logiciel Sigmaplot en considérant 1 site avec une composante de fixation non spécifique. Elle permet d'estimer la constante d'affinité de la MBPc pour l'hémine à  $1,3 \pm 1,7 \mu\text{M}$  et de la MBPp à  $0,86 \pm 1,04 \mu\text{M}$  avec un écart-type très élevé, probablement du fait de la composante de fixation non spécifique. Afin d'estimer la spécificité de cette fixation, la même expérience a été réalisée en utilisant de la MBPc dépliée après pré-incubation en présence de 2% de SDS pendant 4 heures. Les résultats obtenus sont illustrés en Figure 39. On constate que l'affinité de la protéine pour l'hémine est diminuée en présence de SDS et non annulée comme espéré.

ii) Test de la MBP-ECL3 périplasmique

Seule la version courte a été testée ici. On observe pour MBP-ECL3courte périplasmique un déplacement du pic de l'hème à 410 nm, comparable à ce qui a été obtenu avec la MBP périplasmique (non montré). De plus, la MBP-ECL3courte périplasmique montre une amplitude de pic assez limitée, rapidement masquée par l'hème, et une courbe de saturation (Figure 40) proche de celle de la MBPp. Ces résultats nous permettent de conclure qu'elle lie l'hème avec une moins bonne affinité que la MBP périplasmique dépourvue d'ECL3 ( $4,42 \pm 3,39 \mu\text{M}$  contre  $0,85 \pm 1,04 \mu\text{M}$ ), montrant que la boucle intervient peu ou pas dans cette fixation.



**Figure 40 – Courbes de saturation de la fixation d'hémine sur MBPp et MBPp-ECL3c**  
 Courbes de saturation de la fixation d'hème sur la MBPp ECL3court à 415 nm (ronds noirs) et de la MBPp (carrés noirs) avec leur fit par SigmaPlot en considérant l'équation 1.

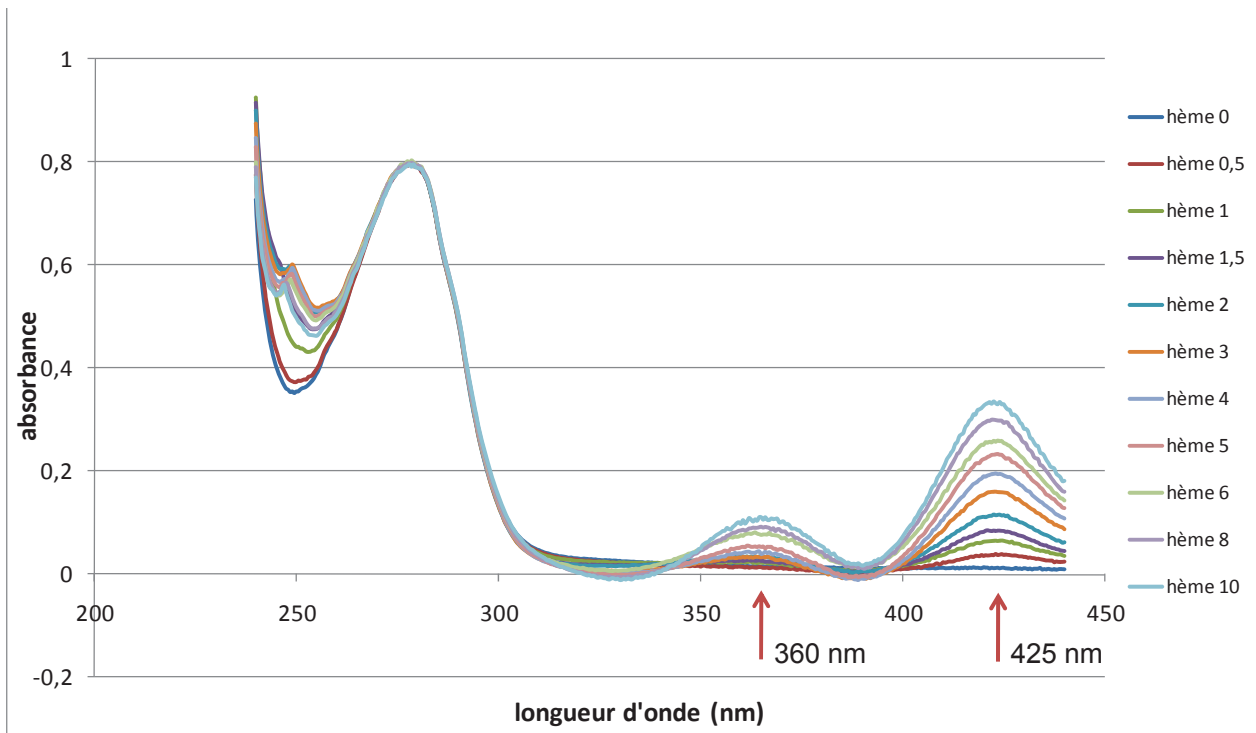


Figure 41 - Spectres corrigés et normalisés de 10 µM MBPc-ECL3court en présence de concentrations d'hémine croissantes.

Les flèches rouges indiquent la longueur d'onde à laquelle le maximum des pics est observé.

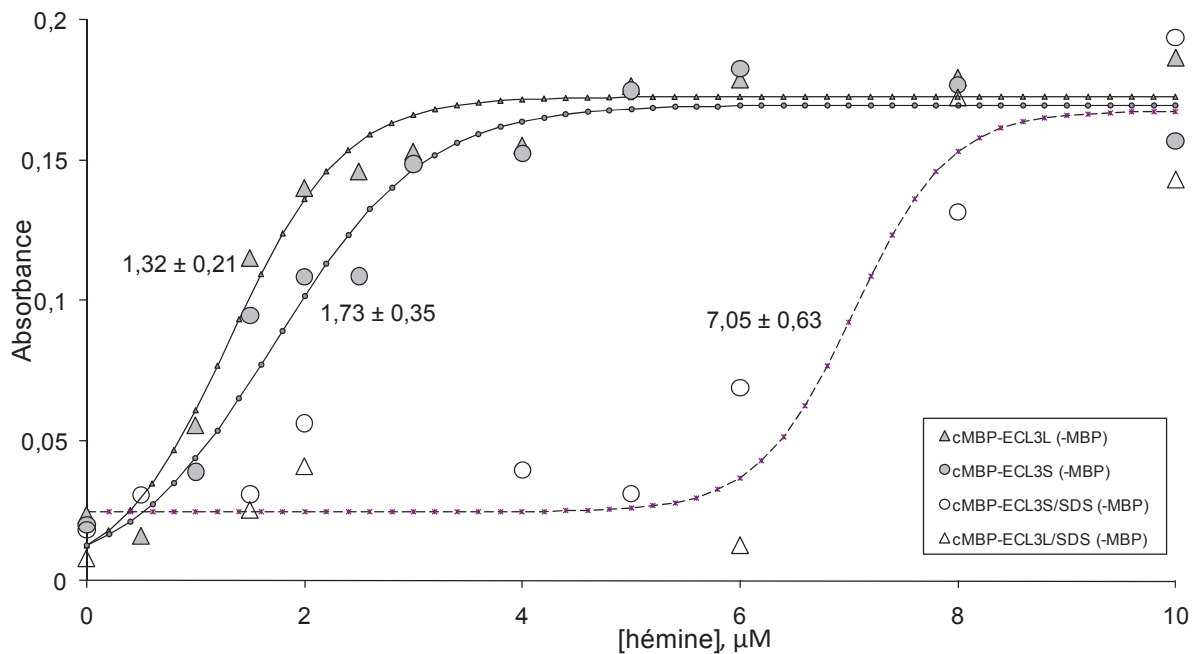


Figure 42 - Courbes de saturation de la fixation d'hémine sur la MBPc-ECL3 long et court.

Courbes de saturation de la fixation d'hémine sur la MBPc ECL3 long à 425 nm (triangles gris), MBPc ECL3 court à 424 nm (ronds gris), corrigées du fit de la MBPc, avec leur fit par SigmaPlot en considérant l'équation 3. Courbe de saturation (ronds et triangles blancs) de la fixation d'hémine sur les protéines MBPc ECL3 en présence de SDS, corrigée du fit de la MBPc dans les mêmes conditions, avec son fit selon l'équation 3.

## iii) Test de la MBP-ECL3 cytoplasmique

MBP-ECL3courte cytoplasmique présente un déplacement du pic de l'hémine au-delà de 420 nm. Deux pics sont observés (Figure 41). Le premier est retrouvé à 360 nm environ. Il correspond à un pic normal du spectre de l'hémine mais est ici accentué, ce qui explique qu'on le retrouve sur un spectre normalisé malgré la correction effectuée sur ces spectres. Le deuxième pic, situé au delà de 420 nm, correspond au pic de l'hémine fixée sur la protéine. De plus, les courbes de saturation, corrigées de celle de la MBPc afin de mettre en évidence l'action d'ECL3, modélisées par SigmaPlot et présentées en Figure 42, montrent une bonne affinité de la MBP ECL3courte cytoplasmique pour l'hème, à  $1,73 \pm 0,35 \mu\text{M}$ .

En ce qui concerne la construction longue, les spectres corrigés et normalisés obtenus avec la protéine native, présentent une forte similarité avec ceux obtenus dans les mêmes conditions avec la version courte d'ECL3 fusionnée à la MBP cytoplasmique (non montré). Le déplacement du maximum du deuxième pic de l'hémine est d'environ 25 nm, et l'amplitude du pic est corrélée à la concentration d'hémine. On note aussi la même corrélation du pic à 360 nm pour laquelle nous n'avons pas d'explication à ce jour. Ces résultats nous permettent de déduire qu'il y a une fixation d'hémine sur MBPc-ECL3long, avec une affinité de  $1,32 \pm 0,21 \mu\text{M}$ , que nous déduisons de ces spectres en représentant la valeur du pic à 425 nm en fonction de la concentration d'hémine (Figure 42). Cette affinité est très proche et même un peu meilleure que celle de la MBPc-ECL3court.

L'expérience a également été réalisée avec la protéine MBPc-ECL3courte dépliée par 2% de SDS de manière à estimer le degré de spécificité de liaison d'hème sur la protéine native, et écarter la possibilité d'une fixation artificielle. Les résultats sont montrés en Figure 42. De la même façon que précédemment, l'affinité est diminuée dans ces conditions, mais pas annulée.

Ces premiers résultats montrent que les fusions MBP présentent des problèmes difficiles à gérer dûs à l'interaction de la porphyrine avec la MBP. En revanche, ils permettent de conclure à une interaction possible de l'hémine avec ECL3 dans l'une et l'autre des versions, la version longue semblant être la plus affine. C'est pourquoi il a été décidé de changer la construction, afin d'obtenir ECL3 (proche de la version longue) en fusion avec une étiquette polyhistidine dont le retrait est possible par l'action d'une protéase.

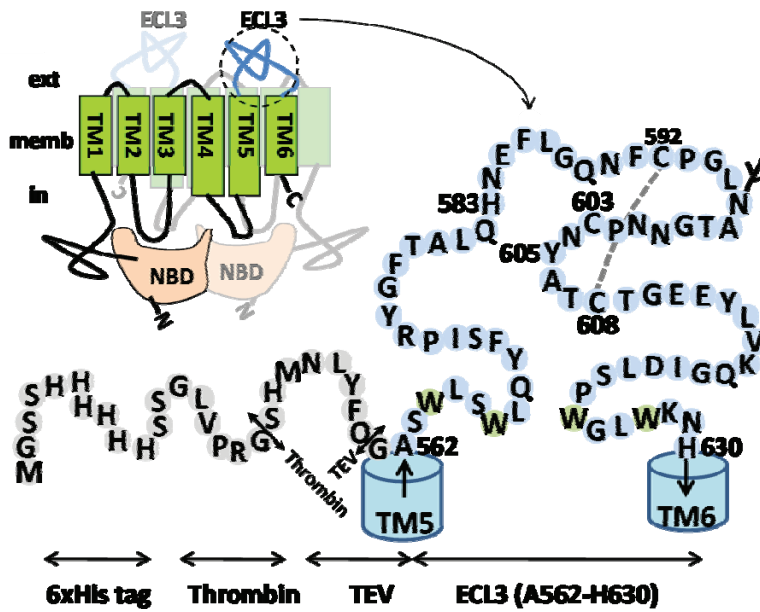


Figure 43 - Construction du domaine ECL3.

ECL3 est localisé entre les TM5 et 6 et s'étend des résidus A562 à H630. Le domaine est fusionné à une étiquette 6His *N*-terminale, séparée d'ECL3 par deux sites de clivage, thrombine et TEV. La protéine résultante a une masse de 10 886 Da. Le site de glycosylation (chez les mammifères) ainsi que le pont disulfure entre les cystéines C592 et C608 sont indiqués.

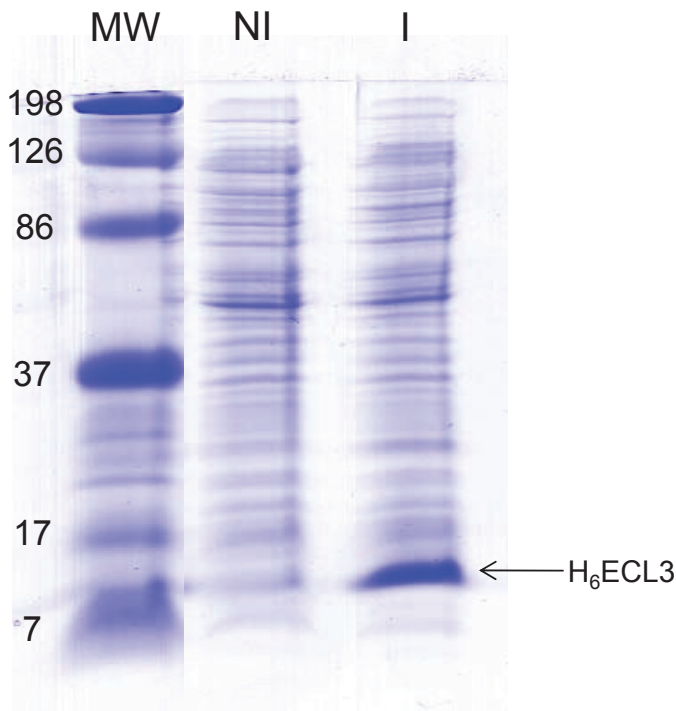


Figure 44 - Test d'expression d'H<sub>6</sub>ECL3 en BL21(DE3).

Migration électrophorétique sur tricine SDS-PAGE (10 %) des protéines produite par les BL21(DE3) avant (NI) et après (I) induction par l'IPTG. La flèche indique la position d'H<sub>6</sub>ECL3



### 3. Fixation sur le domaine ECL3 en fusion avec une étiquette hexahistidine

#### a) « Design » du domaine ECL3

##### i) Détermination des extrémités d'ECL3

La définition des limites possibles de la région ECL3 a été réalisée à l'aide du modèle topologique établi par P. Falson (Figure 30) et confrontée à différents modèles publiés d'ABCG2. Les résidus A562 et H630 ont été choisis comme limites *N* et *C*-terminales. Les deux paires de tryptophanes W564-W567 et W624-W627 ont été intégrées à ECL3, privilégiant l'ancrage du domaine à la membrane, plutôt que participant aux hélices transmembranaires 5 et 6.

##### ii) Clonage dans pET15b

Le clonage d'ECL3 (A562-H630) dans pET15b (cf. Matériels et méthodes) a permis de générer une chimère de 10 886 Da comprenant une étiquette 6 histidines, suivie d'un site de clivage par la thrombine et d'un site de clivage par la TEV (Tobacco Etch Virus) en *N*-terminal qui rendent possible le retrait de l'étiquette hexahistidine. Le plasmide modifié est amplifié en bactéries Top 10 puis extrait et conservé à -20°C.

#### b) Expression en BL21

L'expression du domaine isolé a été testée en BL21(DE3), car ces bactéries permettent généralement une bonne production de protéine (Miroux et Walker, 1996). A la fin de l'induction, les bactéries sont récoltées, éclatées et leur contenu est déposé sur SDS-PAGE. Le résultat est illustré dans la Figure 44. Il montre un bon niveau d'expression d'ECL3 dans les conditions choisies. En revanche, la Figure 46 montre que la protéine n'est pas présente dans la fraction soluble. En effet, une centrifugation à 5 000xg, permet de la retrouver au niveau du culot. On en déduit qu'elle est produite en corps d'inclusions. Cela peut être dû à la présence d'un pont S-S, à la protection des zones hydrophobes ou bien les deux.

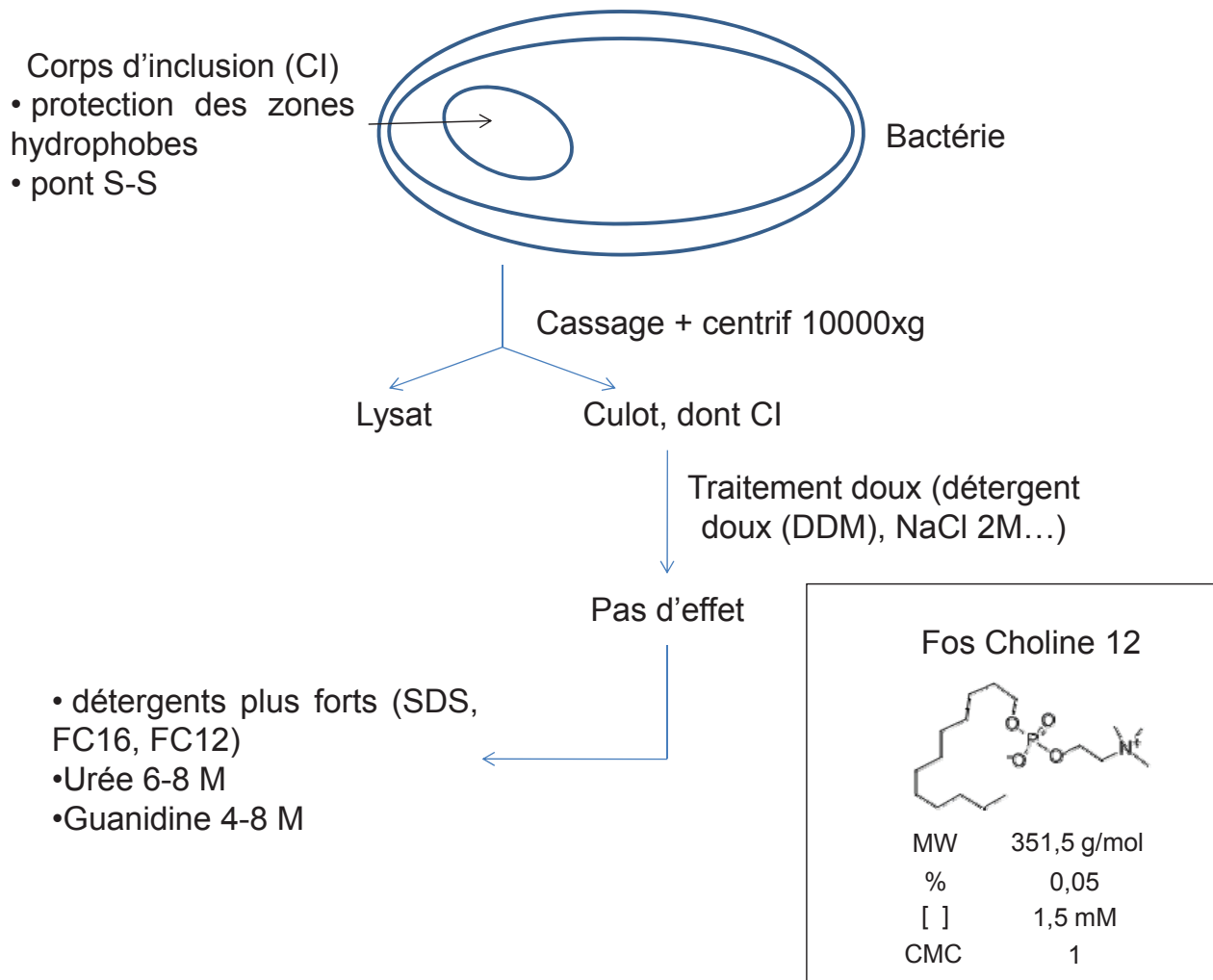
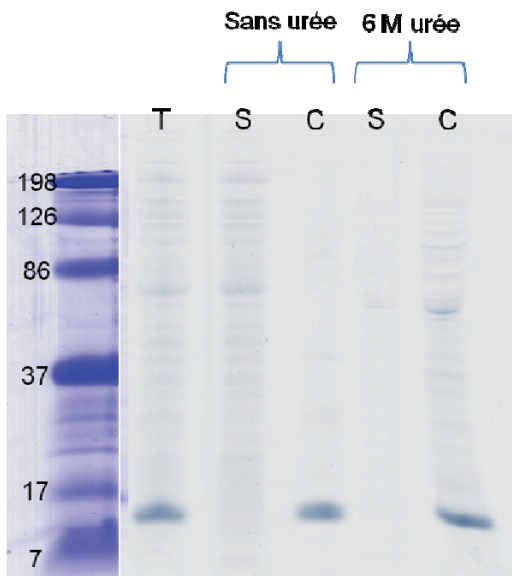


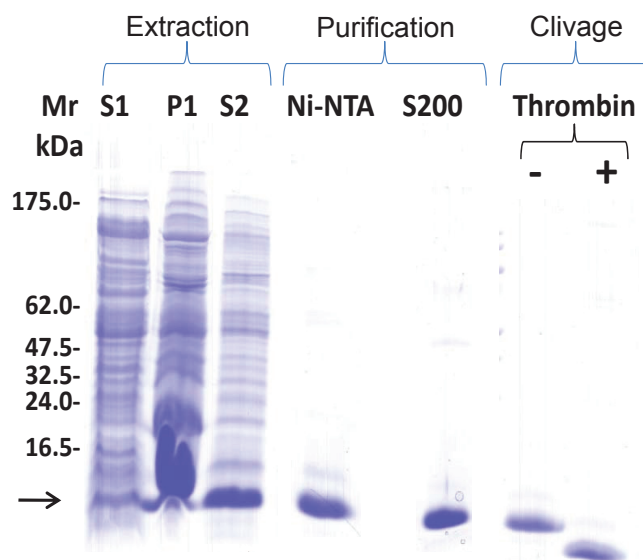
Figure 45 - Traitement des corps d'inclusions et caractéristiques de la FC12.



**Figure 46 - Test de solubilité d'H<sub>6</sub>ECL3.**  
 Migration électrophorétique sur tricine SDS-PAGE (10 %) des protéines produite par les BL21(DE3) après induction par l'IPTG. Les surnageants (S) et culots (C) obtenus après centrifugation à 5 000xg sont déposés séparément. T indique les protéines totales avant centrifugation. Pour les deux pistes de droite, la centrifugation est réalisée après une incubation de 30 minutes à température ambiante avec 6 M urée.

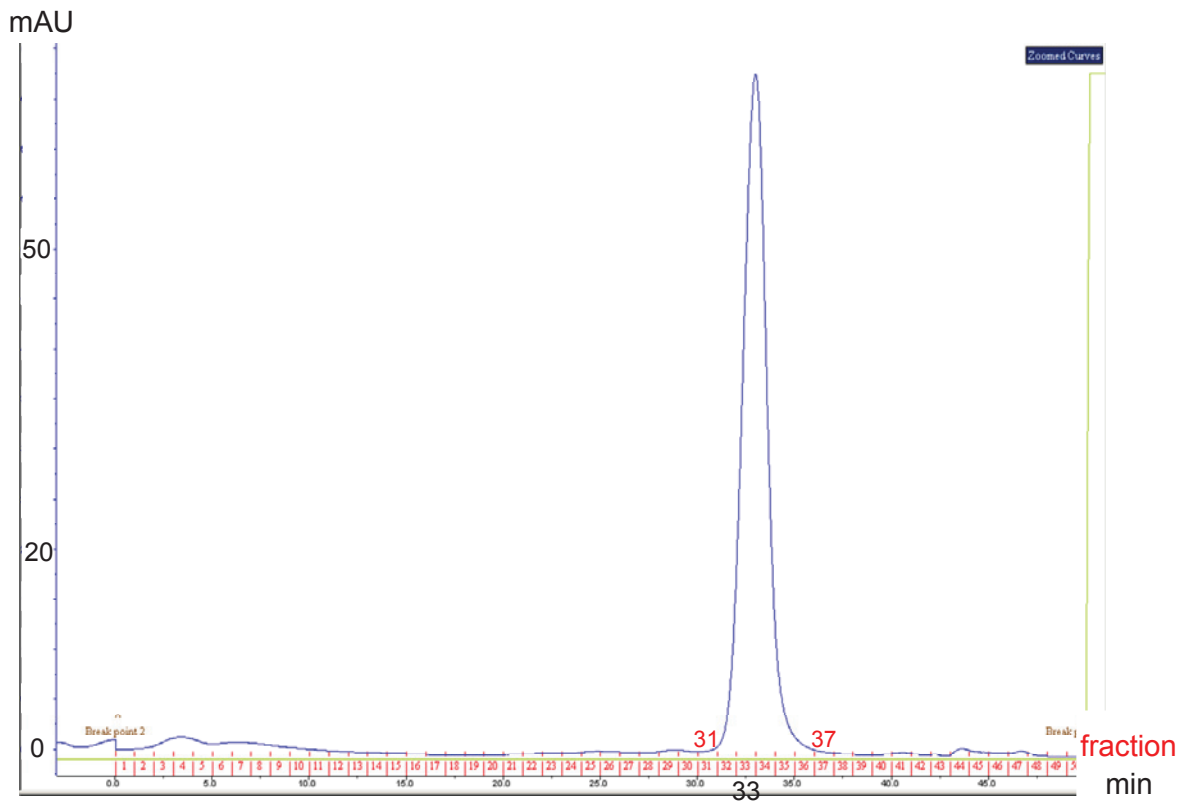
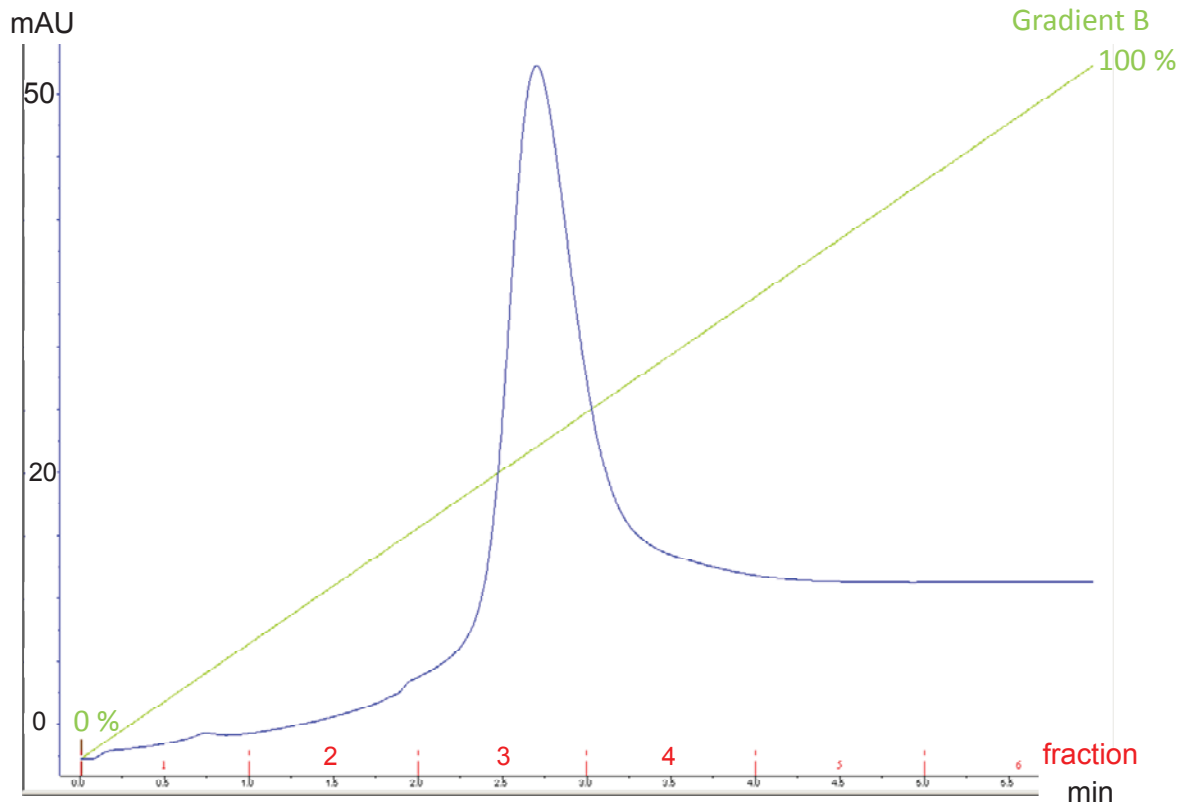
c) Solubilisation et purification d'H<sub>6</sub>ECL3

H<sub>6</sub>ECL3 étant produite en corps d'inclusion, plusieurs conditions de solubilisation ont été testées. L'action de détergents doux, tel le DDM, ne permet pas la solubilisation de la protéine (non montré), de même que l'action de 2 M NaCl (voir P1, Figure 47). Parmi les traitements plus agressifs, l'urée reste sans effet (Figure 46), suggérant que le corps d'inclusion est très compact, ou qu'il intègre des régions hydrophobes. 1 % de Fos Choline 12 (FC12, Figure 45) permet la solubilisation complète du domaine (Figure 47) et le culot solubilisé est ensuite centrifugé à 100 000xg et purifié par chromatographie d'affinité- nickel puis gel filtration, en présence de 0,1 % de FC12, soit environ 2 CMC (Concentration Micellaire Critique). La diminution du détergent en dessous de 2 CMC conduit à l'agrégation de la protéine en raison de la présence des zones hydrophobes, cette concentration est donc maintenue constante dans toutes les étapes de purification et d'analyse d'ECL3. Les profils de purification des deux colonnes sont visibles en Figure 48. On observe dans le deuxième profil que la protéine est éluée à 33 minutes, soit 16,5 ml, ce qui correspond à une masse moléculaire apparente de 23 kDa. Cette valeur est compatible avec la taille d'un monomère d'ECL3 (9 kDa) plus une micelle de détergent (350 g/mol \* 40 molécules = 14 kDa).



**Figure 47 - Purification du domaine H<sub>6</sub>ECL3.**

Tricine SDS-PAGE (10 %) de la purification d'H<sub>6</sub>ECL3, avec S1 = surnageant de la centrifugation à basse vitesse, P1 = culot de la centrifugation à basse vitesse, après action de 2 M NaCl, S2 = surnageant après solubilisation et ultracentrifugation, Ni-NTA = fraction d'éluion après la chromatographie d'affinité, S200 = fraction d'éluion après la colonne de gel filtration. Les deux dernières pistes illustrent la vérification de l'efficacité du clivage par la thrombine.

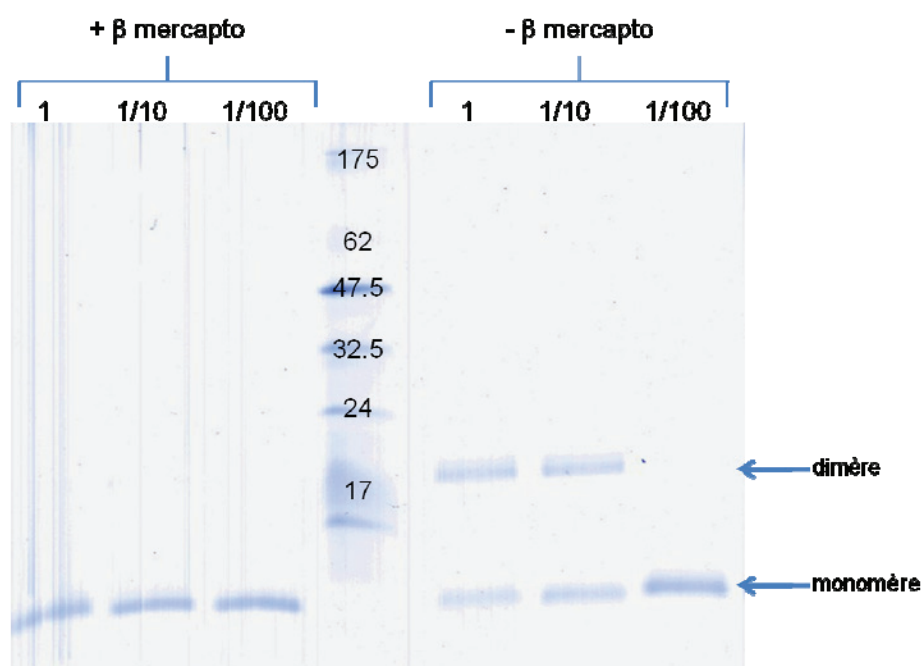


**Figure 48 - Profils obtenus lors de la purification d'ECL3**

Haut : profil de l'élution de la chromatographie d'affinité. La concentration en tampon d'élution est matérialisée en vert. Bas : profil d'élution de la colonne de gel filtration. Dans les deux profils, la protéine est suivie à 280 nm (bleu) et les numéros des fractions sont indiqués en rouge.

L'étiquette polyhistidine est ensuite retirée par clivage par la thrombine (le clivage par la protéase TEV s'est révélé impossible, probablement en raison de la présence de détergent ou d'un manque d'accessibilité) puis répétition des deux colonnes, affinité et gel filtration, résultant en un domaine de 8 945 Da. L'efficacité du clivage est vérifiée sur SDS-PAGE. L'ensemble de ces résultats est visualisé sur SDS-PAGE, en Figure 47

Lors de la dernière colonne de purification, le tampon (cf. Matériels et méthodes) ne contient plus de DTT, pour favoriser la formation du pont disulfure intramoléculaire C592-C608. La protéine est conservée à 4°C toute la nuit pour favoriser cette oxydation. Le lendemain, un dosage des thiols libres permet de vérifier la formation du pont. Il ne reste en effet qu'un seul thiol libre par molécule protéique, contre 3 avant l'oxydation. Le dernier thiol libre peut permettre la formation d'un pont disulfure entre 2 molécules d'ECL3, ce qui conduit à l'obtention d'un dimère. Cependant, ce dimère ne se forme pas dans les conditions normales d'analyse de la protéine, mais seulement quand on oxyde fortement la solution avec du  $\text{Cu}(\text{Phe})_3$ , comme présenté en Figure 49.



**Figure 49 - Test d'oxydation d'ECL3 avec du  $\text{Cu}(\text{Phe})_3$ .**

Migration électrophorétique d'ECL3 sur un tricine SDS-PAGE (10 %), en présence ou en absence d'agent réducteur  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les différentes concentrations en  $\text{Cu}(\text{Phe})_3$  sont indiquées (1, 1/10, 1/100<sup>ème</sup>). Les deux flèches sont à hauteur du monomère (environ 9 kDa) et du dimère (environ 18 kDa).

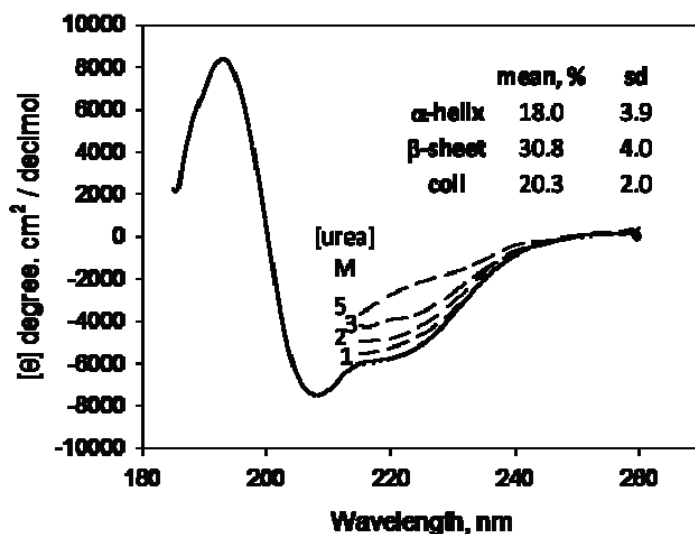


Figure 50 - Spectre de dichroïsme circulaire d'ECL3.

Les spectres sont obtenus entre 185 et 260 nm en absence (trait plein) ou en présence (tirets) d'urée en concentration variable (1 à 5 M). Les moyennes calculées de chaque structure secondaire sont indiquées.

Method	% $\alpha$ -helice	% $\beta$ -sheet	% turns	% unordered
Self Consistent, database 3	15,9	32,2	19,4	27,9
Self Consistent, database 4	14,7	37,5	19,5	26,1
Self Consistent, database 6	15,9	32,2	19,4	27,9
Self Consistent, database 7	16,9	37,3	17	26,1
Provencher & Glockner database 3	19,8	28,1	23,3	28,8
Provencher & Glockner database 4	15,2	31,8	22,3	30,7
Provencher & Glockner database 6	17,6	28,3	20,7	33,4
Provencher & Glockner database 7	20,9	24,4	18,4	36,2
K2d	21	25		55
CDSSTR database 3	28	30	21	30
CDSSTR database 4	15	30	23	31
CDSSTR database 6	18	27	19	35
<b>Moyenne</b>	<b>18</b>	<b>30,8</b>	<b>20,3</b>	

Tableau 4 - Pourcentages estimés des structures secondaires d'ECL3 par différentes méthodes (Cf Matériels et méthodes).

## d) Vérification de la conformation du domaine isolé

ECL3 étant produit à la fois isolé et dans un système bactérien, il est indispensable de vérifier que la conformation qu'il adopte est similaire à celle qu'il a dans la protéine complète. Plusieurs méthodes ont été utilisées pour s'en assurer. Les résultats sont exposés ci-dessous.

## i) Spectre de dichroïsme circulaire

Plusieurs spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés sur ECL3, en présence de différentes concentrations d'urée (Cf. Matériels et méthodes). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 50. Le spectre initial du domaine est compatible avec un spectre typique d'un polypeptide  $\alpha + \beta$ . Les déconvolutions ont été réalisées avec plusieurs méthodes du site DichroWeb, et donnent des résultats similaires, ce qui est en faveur d'une estimation assez juste des pourcentages de chaque structure secondaire (en moyenne, 18 % d'hélice  $\alpha$ , 30,8 % de feuillet  $\beta$  et 20,3 % de pelote aléatoire) (Tableau 4).

Les spectres obtenus en urée voient la vallée à 220 nm diminuer de façon concentration - dépendante, ce qui confirme la perte des structures secondaires en présence de ce composé. Le domaine ECL3 semble donc correctement conformé.

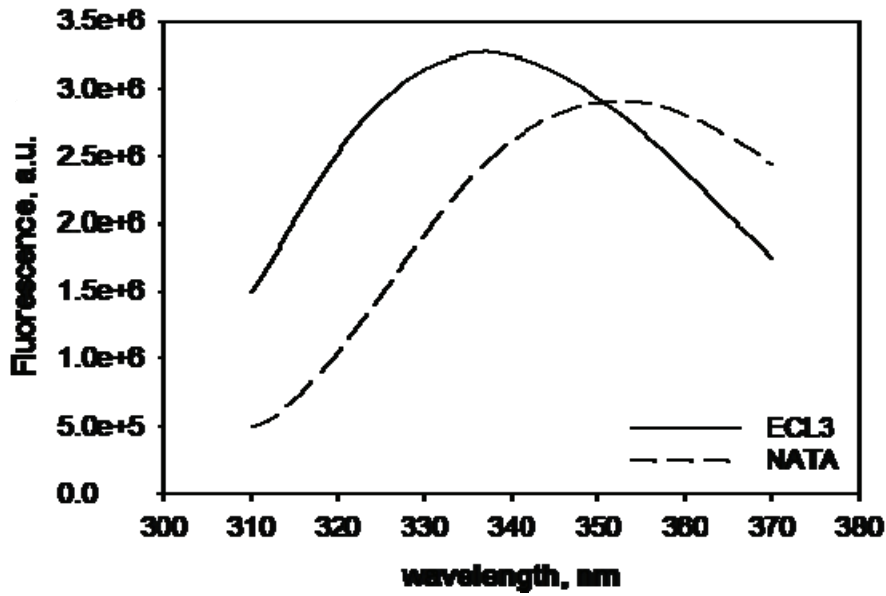


Figure 51 - Spectre de fluorescence d'ECL3 et du NATA.

Les spectres sont obtenus entre 310 et 370 nm après excitation à 295 nm. Le maximum du pic d'ECL3 est observé à 336 nm, contre 354 nm dans le cas du NATA.

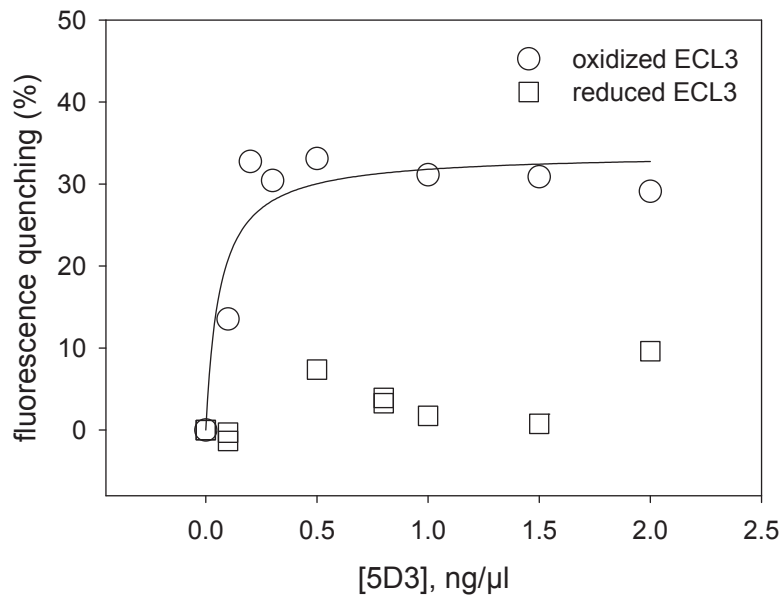


Figure 52 - Courbe de saturation d'ECL3 en présence de l'anticorps conformationnel 5D3.

ECL3 (1,5 μM) oxydée (ronds) ou réduite (carrés) est additionnée de concentrations croissantes de 5D3. La courbe est ajustée à l'aide du logiciel Sigma Plot, en considérant 1 site de fixation, selon l'équation 1.



ii) Spectre de fluorescence

L'allure du spectre de fluorescence donne également une indication du degré de repliement du domaine. En effet, ECL3 contient 4 résidus tryptophanes qui, après excitation à 295 nm, émettent une fluorescence mesurée entre 310 et 370 nm. La Figure 51 illustre le résultat obtenu pour ECL3 et pour le NATA, solution de tryptophanes libres. Il apparaît qu'ECL3 présente un pic de fluorescence intrinsèque à 336 nm, caractéristique de tryptophanes enfouis dans un environnement hydrophobe, en comparaison du NATA, dont le pic de fluorescence est à 354 nm. Ceci est en accord avec l'existence d'un domaine replié.

iii) Reconnaissance par un anticorps conformationnel

Plusieurs anticorps spécifiques d'ABCG2 ont été développés ces dernières années. Parmi eux, le 5D3 est un anticorps conformationnel dont le site de reconnaissance se situe sur ECL3 lorsque la protéine présente le pont disulfure intramoléculaire (Ozvegy-Laczka et al., 2005). Il est donc un bon indicateur de la conformation d'ECL3. Les résultats d'atténuation de fluorescence d'ECL3 en présence du 5D3 (Figure 52) montrent qu'il y a une interaction entre les deux molécules, avec un  $K_d$  de  $0,06 \pm 0,03$  ng/ $\mu$ l, soit  $4 \pm 2$  nM en considérant une masse moléculaire de 150 kDa, typique d'une interaction anticorps-antigène. La même expérience réalisée avec ECL3 réduit par du DTT montre que l'interaction avec l'anticorps ne se produit plus, comme pour la protéine complète. On peut en conclure que le domaine ECL3 produit de façon isolée est replié et présente une conformation représentative de la structure native dans la protéine ABCG2 entière.

iv) Spectrométrie de masse

L'étude en spectrométrie de masse réalisée au sein du plateau technique de Spectrométrie de Masse de l'IBCP met en évidence qu'ECL3 sous sa forme réduite contient bien 3 thiols libres et que la forme oxydée en compte 1 seul. En revanche il apparaît que dans l'échantillon analysé, le pont disulfure ne s'est pas formé entre les cystéines C592 et C608, mais entre les résidus C592 et C603. Néanmoins, la capacité précédemment mise en évidence du 5D3 à reconnaître le domaine ECL3 isolé d'une autre purification laisse penser que le pont disulfure n'est pas toujours mal positionné. Afin de minimiser l'importance de ce paramètre, il faudra donc, pour l'analyse de la fixation de composés sur ECL3, étudier ECL3 à la fois sous sa forme oxydée et sous sa forme réduite.

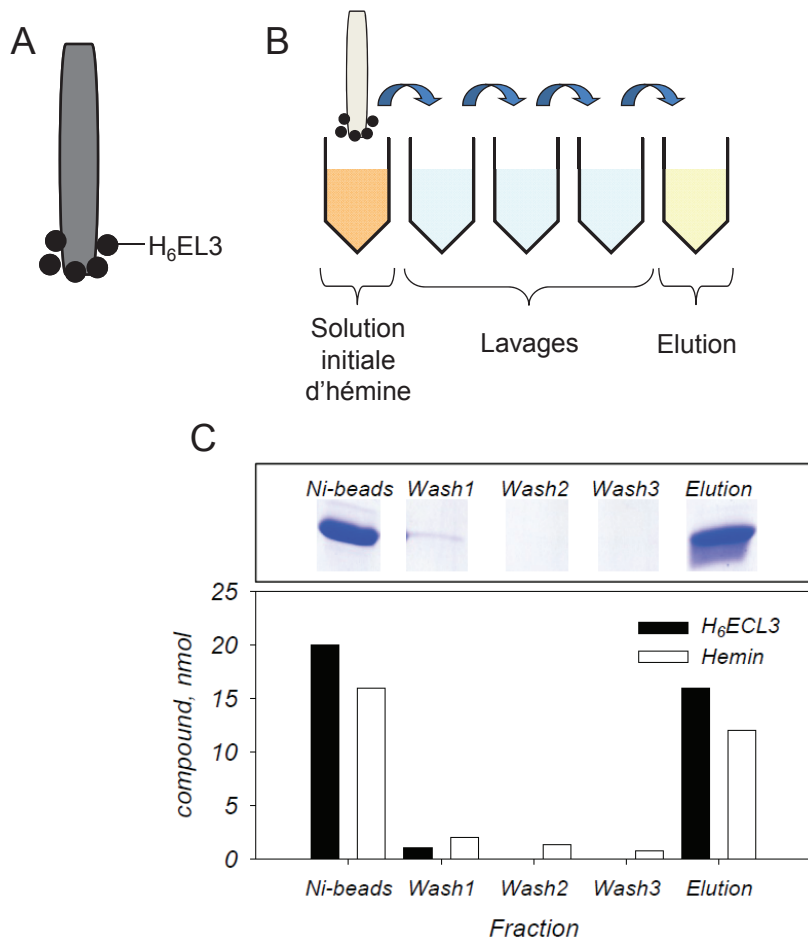


Figure 53 - Test de fixation d'hémine sur H6ECL3 greffée à des billes magnétiques.

A : Schéma de la fixation de H6ECL3 sur les billes magnétiques adhérant à un barreau aimanté. B : les flèches indiquent l'avancée du barreau aimanté. C : quantités d'hémine et de H<sub>6</sub>ECL3 dosées dans chaque compartiment (en nmole). Le gel de coomassie permet de visualiser la protéine.

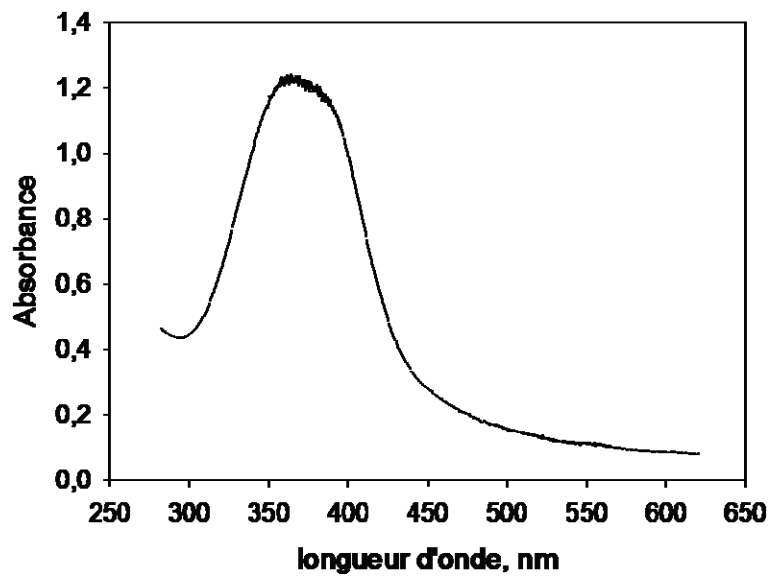


Figure 54 - Spectre de l'hémine.

Le spectre de l'hémine (10  $\mu$ M) est enregistré entre 280 et 620 nm. On observe un maximum d'absorbance (pic de Soret) à 385 nm.

## d) Mise en évidence de la fixation d'hémine par ECL3

Trois techniques différentes ont été utilisées pour démontrer la capacité d'ECL3 à fixer l'hémine. Les résultats sont présentés plus bas.

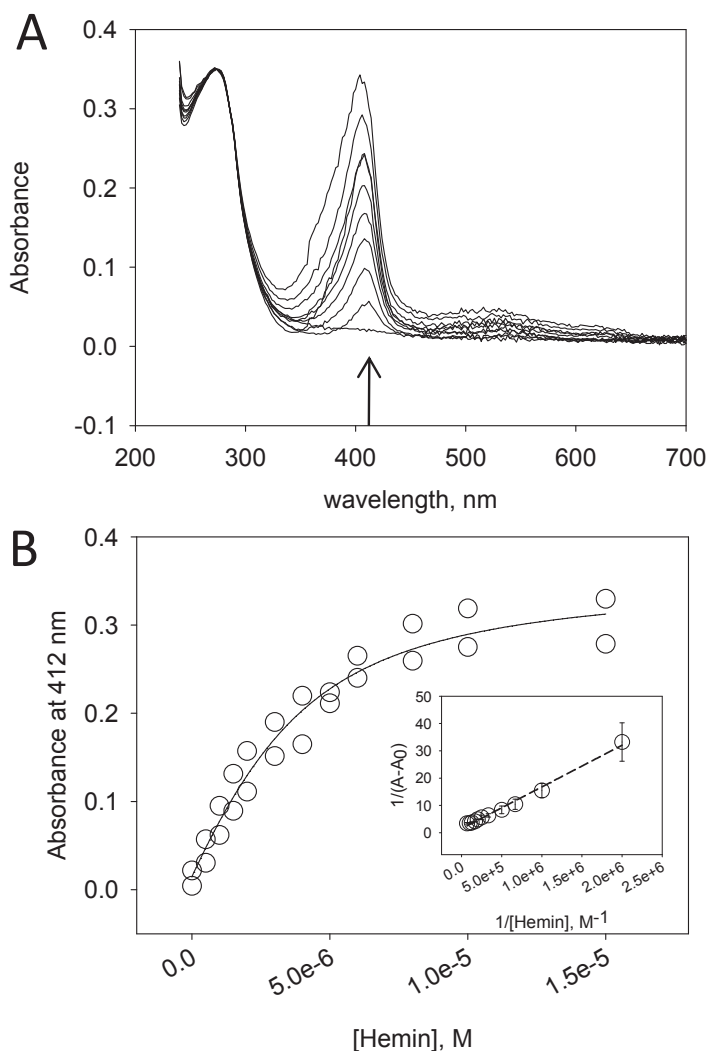
## i) Par l'intermédiaire de billes magnétiques

Ces expériences ont été réalisées au laboratoire de Purification et Analyse de Protéines de l'IBCP, avec les conseils d'Annie Chaboud. La protéine H<sub>6</sub>ECL3 (non clivée) est incubée avec des billes magnétiques Ni-NTA sur lesquelles elle se fixe puis, à l'aide d'un programme du robot Biosprit 15, les billes sont mises en contact avec une solution d'hémine, lavées plusieurs fois et enfin la protéine est éluée dans un tampon contenant 300 mM d'imidazole. L'hémine contenue dans les différentes fractions (solution initiale, lavages et élution) est dosée par spectrophotométrie. La Figure 53 décrit le procédé ainsi que les résultats obtenus. La différence de concentrations en hémine dans la solution initiale avant et après l'incubation avec H<sub>6</sub>ECL3 greffée sur les billes montre que l'hémine s'est bien fixée au domaine (16 nmoles d'hémine pour 20 nmoles de H<sub>6</sub>ECL3, suggérant une stoechiométrie 1:1). De plus, peu d'hémine est perdue pendant les étapes de lavage, ce qui suggère une fixation assez stable du composé.

## ii) Par spectrophotométrie

L'hémine est une molécule présentant un spectre d'absorption UV-visible dont la bande de Soret se situe classiquement à 385 nm (Figure 54). La formation d'un complexe entre l'hémine et une protéine induit généralement un déplacement de cette bande au-delà de 400 nm (Cordova et al., 2005).

Ici, un suivi spectrophotométrique entre 250 et 700 nm est réalisé sur une solution de 3  $\mu$ M d'ECL3, additionnée de concentrations croissantes d'hémine (0-15  $\mu$ M). Les spectres obtenus sont corrigés du tampon et normalisés à 280 nm. Dans la Figure 55A, on observe que la bande de Soret est déplacée de 385 à 412 nm et que l'amplitude du pic augmente avec la concentration d'hémine, ce qui suggère une interaction entre l'hémine et ECL3. La représentation de l'absorbance au pic en fonction de la concentration en hémine montre une courbe de saturation que l'on peut modéliser avec le logiciel Sigma Plot, sur la base de 1 site par domaine (Figure 55B). Elle permet de calculer un K<sub>d</sub> de  $1,33 \pm 0,72 \mu$ M. Toutefois, la stoechiométrie de fixation de l'hémine sur le domaine ECL3 peut être estimée graphiquement, en représentant la double inverse 1/Abs vs 1/[hémine] (Figure 55B, encart).

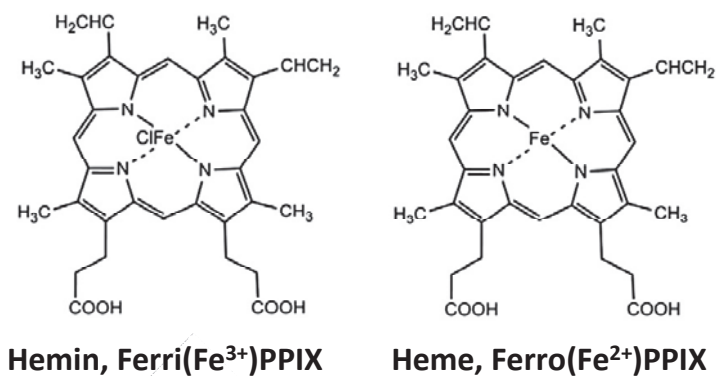


**Figure 55 - Fixation de l'hémine sur ECL3 visualisée par spectrophotométrie.**

A. Spectres UV-visible, corrigés et normalisés, de 0-15  $\mu$ M hémine en présence de 3  $\mu$ M d'ECL3. La flèche indique 412 nm.

B. Courbe de saturation de la fixation d'hémine sur ECL3 à 412 nm ajustée avec SigmaPlot en considérant 1 site selon l'équation 2.

L'encart comporte la représentation en double inverse,  $1/Abs$  vs  $1/[hémine]$ .

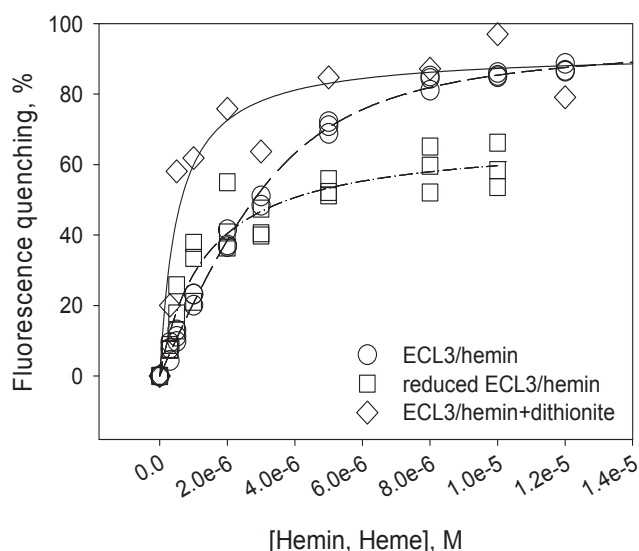


**Figure 56 - Structure de l'hémine et de l'hème.**

Les points obtenus se distribuent sur une droite, ce qui permet de déduire que la stoechiométrie est 1:1, soit une molécule d'hémine par protéine.

iii) Par spectrofluorimétrie

L'évolution de la fluorescence intrinsèque d'ECL3 en présence de concentrations croissantes d'hémine ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est suivie entre 310 et 370 nm, après excitation à 295 nm. Afin de déterminer l'importance du pont disulfure intramoléculaire, on teste les formes oxydée et réduite du domaine. De plus, la même expérience est réalisée avec de l'hème ( $\text{Fe}^{2+}$ ), généré par réduction de l'hémine par la dithionite (Figure 56), sur ECL3 oxydé. Les données obtenues sont corrigées du tampon et l'effet de filtre interne est pris en compte par l'utilisation de NATA. Les résultats sont présentés sous forme de courbes de saturation en Figure 57. L'interaction entre l'hémine et ECL3 oxydé donne un résultat comparable à celui obtenu en spectrophotométrie, exposé plus haut, à savoir un  $K_d$  de  $0,88 \pm 0,18 \mu\text{M}$ . On observe également que l'hème se fixe mieux que l'hémine sur ECL3, puisque le  $K_d$  obtenu est de  $0,47 \pm 0,4 \mu\text{M}$ , deux fois plus faible que celui de l'hémine. Ces deux composés induisent une atténuation de fluorescence très importante de 90 %. Enfin, on observe que l'hémine provoque une atténuation de fluorescence d'ECL3 réduit de 60% et que le  $K_d$  est de  $1,03 \pm 0,69 \mu\text{M}$ , proche de celui du domaine sous forme oxydée. Cela suggère que le pont disulfure entre les cystéines C592 et C608 n'est pas requis pour le repliement du domaine et qu'il n'est pas indispensable à la fixation de ce composé, qu'il l'influence peu.



**Figure 57- Courbes de saturation de la fixation d'hémine et d'hème sur ECL3 réduit ou oxydé.** Atténuation (quenching) de fluorescence de  $3 \mu\text{M}$  d'ECL3 oxydé (ronds et losanges) ou réduit (carrés) en présence de 0 à  $14 \mu\text{M}$  d'hémine (ronds et carrés) ou d'hème (losanges). La courbe est ajustée à l'aide de SigmaPlot selon 1 site de fixation avec l'équation 2.

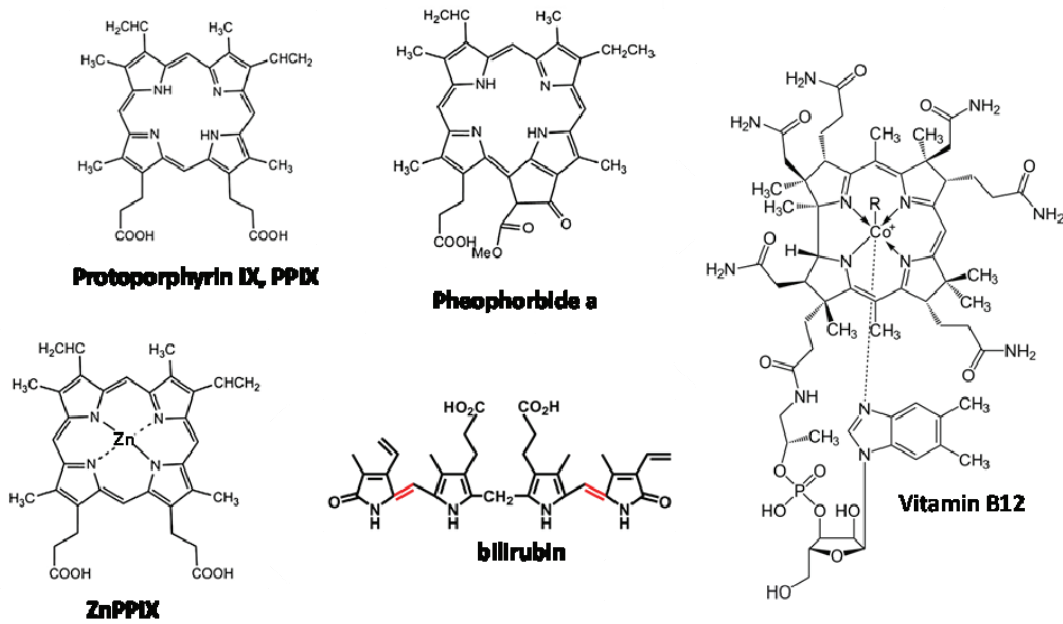


Figure 58 - Structure de quelques composés porphyriques testés dans cette étude. La molécule de CoPPIX n'est pas représentée. Elle correspond à la ZnPPIX avec un atome de cobalt à la place du zinc.

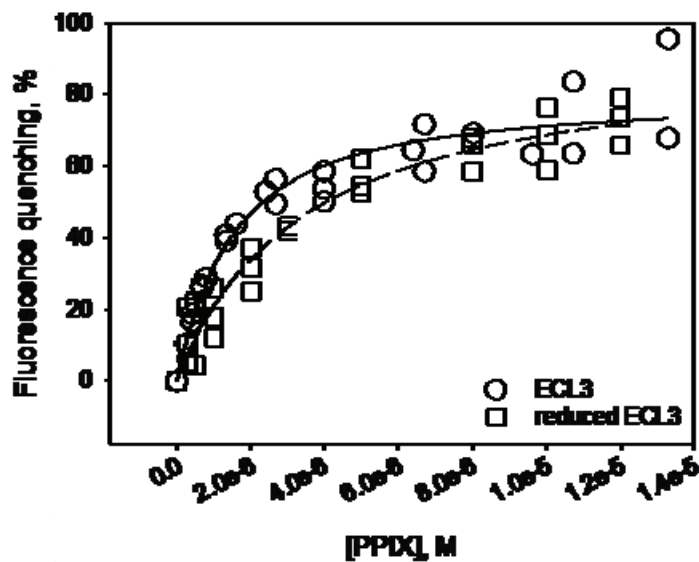


Figure 59 - Courbe de saturation de la fixation de PPIX sur ECL3. Atténuation de fluorescence de 3  $\mu\text{M}$  d'ECL3 oxydé (ronds) ou réduit (carrés) en présence de 0 à 14  $\mu\text{M}$  de PPIX. La courbe est ajustée à l'aide de Sigma Plot, selon 1 site de fixation, avec l'équation 2.

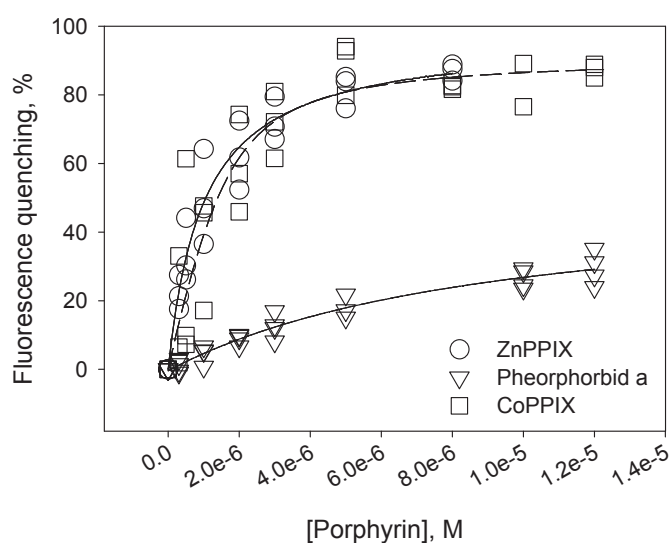
e) Test de fixation d'autres composés par ECL3

ABCG2 transporte un large spectre de molécules, qui sont donc susceptibles de se fixer au niveau extracellulaire sur ECL3. L'objectif des expériences développées ci-dessous est de déterminer quels sont, parmi les molécules structurellement apparentées à l'hémine ainsi que parmi les substrats et inhibiteurs d'ABCG2, ceux qui peuvent se fixer sur ECL3.

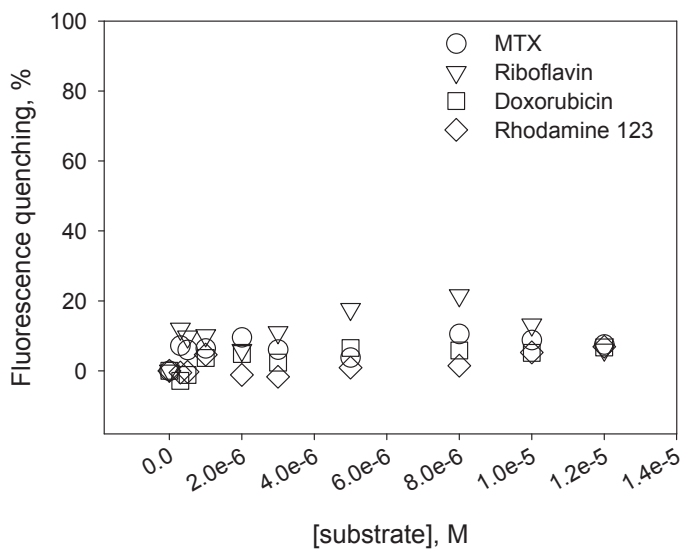
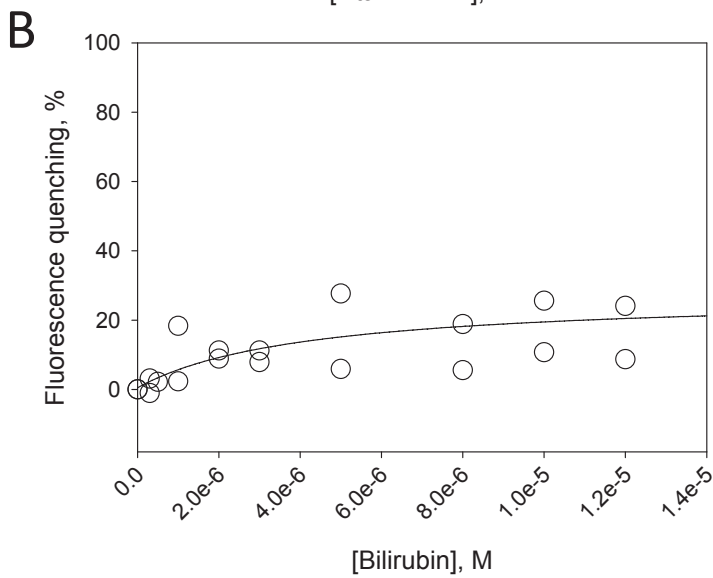
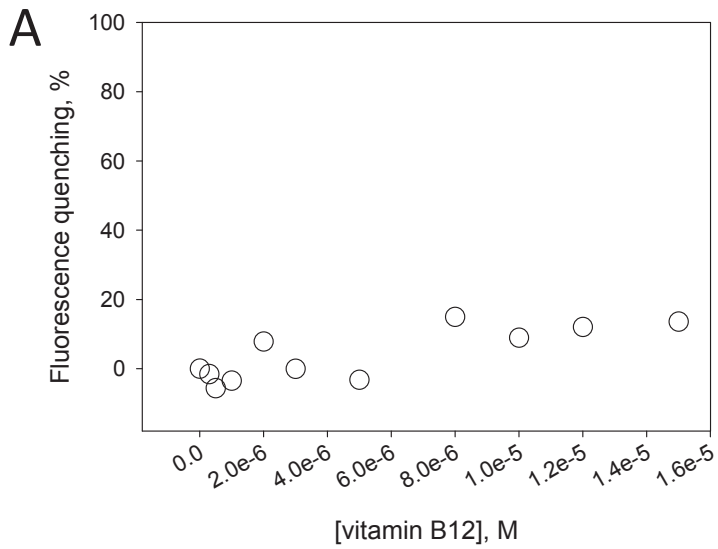
i) Composés porphyriques

Dans un premier temps, plusieurs composés porphyriques sont testés, dont certains possèdent des ions métalliques en leur centre. La Figure 58 détaille leurs structures.

Les expériences de fluorescence intrinsèque sont conduites comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». La Figure 59 montre que la fixation de la protoporphyrine IX sur ECL3 oxydé ou réduit induit une atténuation de fluorescence d'environ 80%. Les courbes de saturation que l'on en déduit donnent des Kds de  $1,21 \pm 0,71$  et  $3,40 \pm 0,1$   $\mu\text{M}$  respectivement. On constate dans la Figure 60 que la ZnPPIX et la CoPPIX se fixent également sur ECL3 avec une bonne affinité, puisque les Kds calculés sont de  $0,80 \pm 0,01$   $\mu\text{M}$  et  $0,71 \pm 0,38$   $\mu\text{M}$  respectivement. Ces deux composés sont peu présents physiologiquement dans l'organisme mais leur taux peut augmenter en cas de carence martiale (carence en fer). Dans de telles conditions, un atome de zinc ou de cobalt peut être introduit dans la PPIX à la place du fer par la ferrochélatase lors de la synthèse de l'hème. La Figure 60 permet également de constater que le phéophorbide a, métabolite de la chlorophylle et substrat connu d'ABCG2, se fixe relativement mal sur le domaine, avec un Kd de  $3,42 \pm 0,5$   $\mu\text{M}$ .



**Figure 60 - Courbes de saturation de la fixation de ZnPPIX, CoPPIX et phéophorbide a sur ECL3.** Atténuation de fluorescence de 3  $\mu\text{M}$  d'ECL3 en présence de 0 à 14  $\mu\text{M}$  de ZnPPIX (ronds), CoPPIX (carrés) et phéophorbide a (triangles). Les courbes sont ajustées à l'aide de SigmaPlot, selon 1 site de fixation, avec l'équation 2.



**Figure 61 - Courbes de fixation de l'interaction entre la vitamine B12 ou la bilirubine et ECL3.**

A. Atténuation de la fluorescence de 3  $\mu\text{M}$  d'ECL3 par 0 à 15  $\mu\text{M}$  de vitamine B12.

B. Atténuation de la fluorescence de 3  $\mu\text{M}$  d'ECL3 par 0 à 15  $\mu\text{M}$  de bilirubine. Le fit obtenu ne permet pas de calculer un  $K_d$ .

**Figure 62 - Courbe de saturation de différents composés non porphyriques avec ECL3.**

Atténuation de fluorescence de 3  $\mu\text{M}$  d'ECL3 en présence de 0 à 12  $\mu\text{M}$  de mitoxantrone (ronds), riboflavine (triangles), doxorubicine (carrés) et rhodamine 123 (losanges).



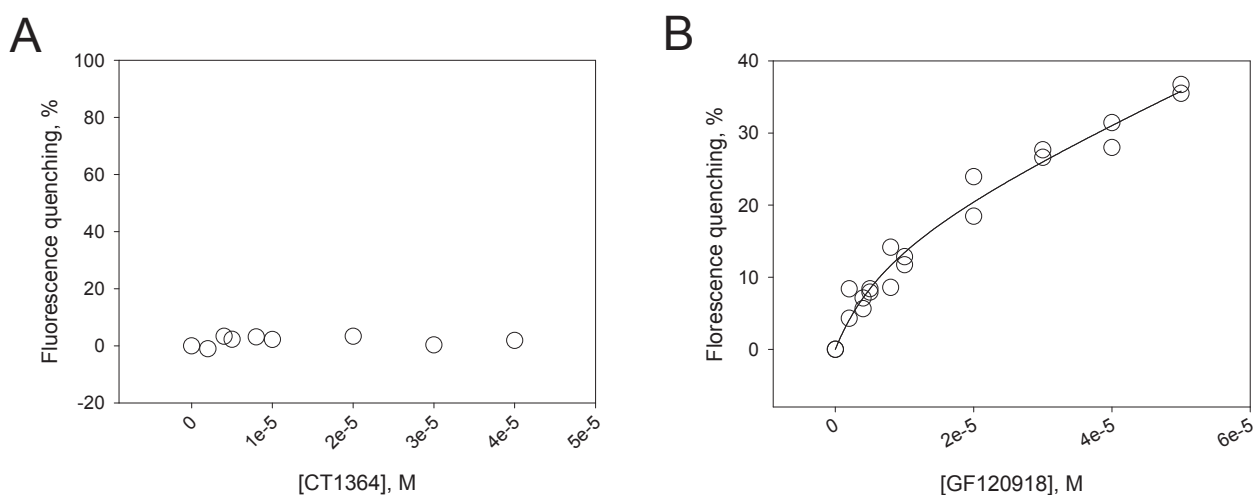
D'autres composés porphyriques testés n'interagissent pas avec ECL3. Il s'agit de la vitamine B12 et de la bilirubine, produit issu du catabolisme de l'hème. La Figure 61 illustre les résultats obtenus.

ii) Autres substrats

Dans un deuxième temps, d'autres composés non porphyriques transportés par ABCG2 (comme la mitoxantrone et la riboflavine) ou capables de se fixer sur ABCG2 (comme la doxorubicine et la rhodamine 123), sont testés sur ECL3. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 62. On constate que ces composés n'interagissent pas avec le domaine ECL3.

iii) Inhibiteurs

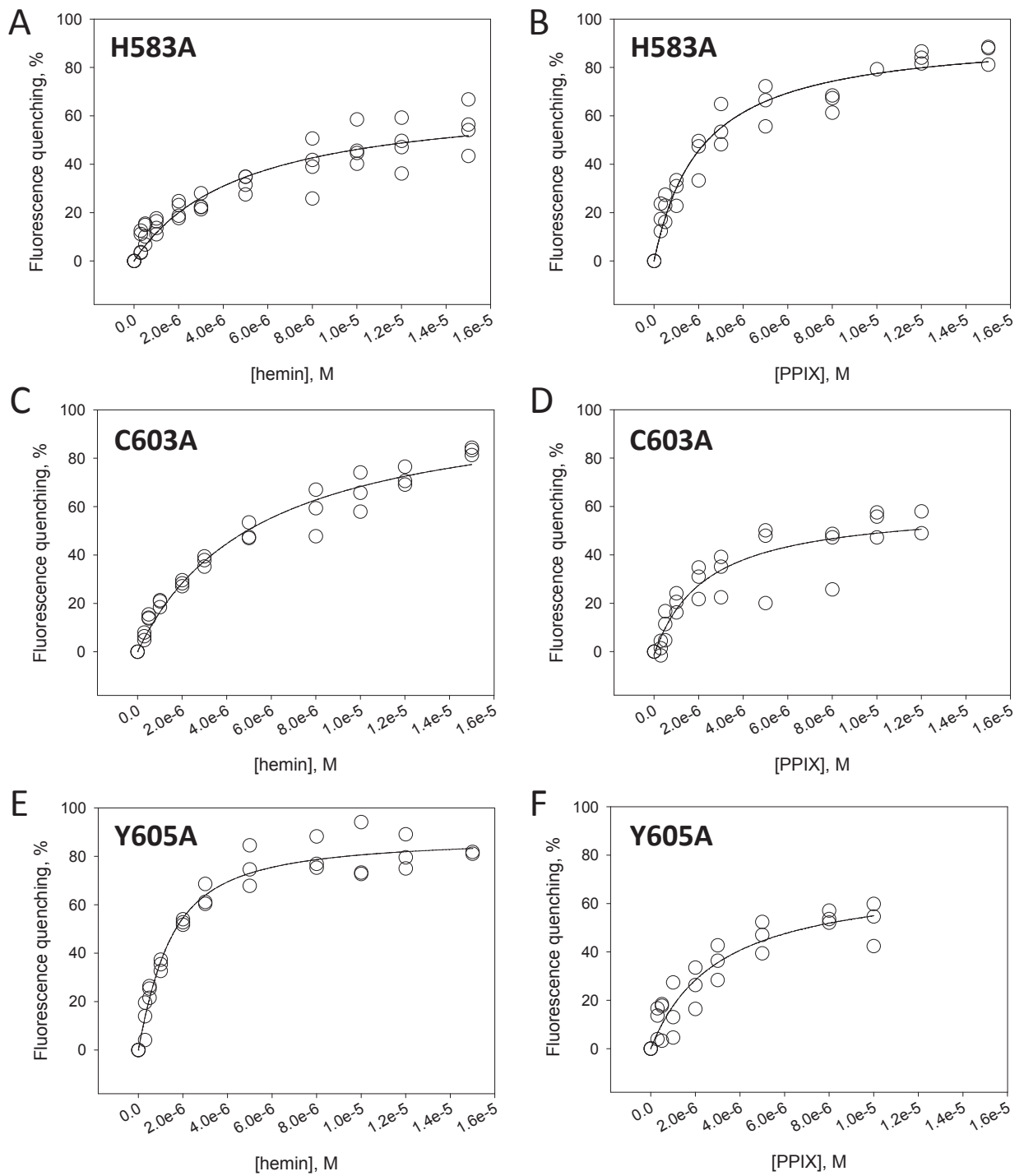
Enfin, l'interaction entre ECL3 et deux inhibiteurs d'ABCG2 a été suivie. Les deux inhibiteurs testés sont le CT1364, inhibiteur développé au laboratoire, spécifique d'ABCG2 et dont l'IC<sub>50</sub> est de 1 μM, et le GF120918, non spécifique d'ABCG2 car actif également sur P-gp, mais qui présente un bon IC<sub>50</sub> sur ABCG2, de 0,3 μM. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 63. Aucune variation de la fluorescence d'ECL3 n'est observée pour le premier inhibiteur, signifiant que le CT1364 n'interagit pas avec ECL3. Le second inhibiteur, le GF120918, peut se fixer sur ECL3, mais avec une très faible affinité et une composante non spécifique importante, illustrés par un K<sub>d</sub> élevé de 8 ± 6 μM.



**Figure 63 - Courbe de saturation de l'interaction d'inhibiteurs d'ABCG2 avec ECL3.**

A. Atténuation de fluorescence de 3 μM d'ECL3 en présence de 0 à 40 μM de CT1364.

B. Atténuation de fluorescence de 3 μM d'ECL3 en présence de 0 à 50 μM de GF120918. La courbe est ajustée à l'aide de Sigmaplot, selon 1 site de fixation, avec l'équation 2.



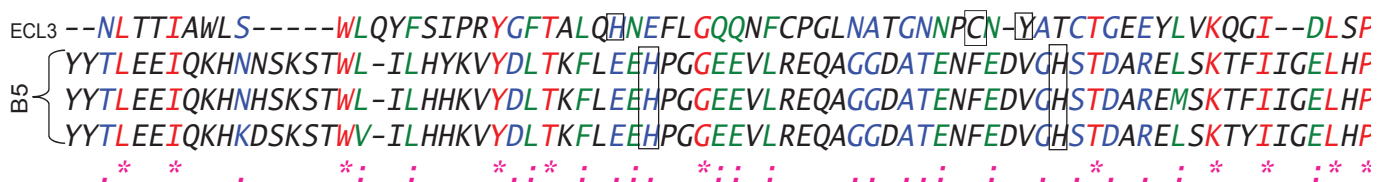
**Figure 64 - Courbes de saturation de la fixation d'hémine et de PPIX sur ECL3 muté.**

Les courbes de gauche représentent l'atténuation de fluorescence du domaine ECL3 portant la mutation précisée en présence d'hémine. A droite, les expériences sont réalisées en présence de PPIX. Les courbes sont ajustées à l'aide de Sigmaplot, selon 1 site de fixation, avec l'équation 2.

#### 4. Sur le domaine ECL3 muté

##### a) Choix des mutations

Le cytochrome B5 est une protéine de taille comparable à ECL3, possédant un ancrage membranaire et capable de fixer de l'hème (Vergeres et al., 1995). L'alignement des séquences primaires des deux protéines est présenté en Figure 65. Il montre qu'ECL3 partage 47 % de similarité avec le cytochrome B5, dont 14,3 % d'identité, 15,6 % de similarité forte et 17,1% de similarité faible. De plus, cet alignement révèle que les résidus H583, C603 et Y605 d'ECL3 ont des positionnements comparables à ceux des résidus histidines du cytochrome B5 impliqués dans la chélation du fer de l'hème. Ces résidus d'ECL3 ont donc été mutés en alanine et les mutants ont été produits et purifiés. Leur capacité à fixer l'hémime et la PPIX a ensuite été testée.



**Figure 65 - Alignement de la structure primaire d'ECL3 avec différents cytochromes B5.**

Les cytochromes B5 sont d'origine bovine (haut), murine (milieu) et humaine (bas). L'alignement a été réalisé avec le logiciel Clustal W (PBIL, NPS@). Les acides aminés sont colorés en fonctions de leur degré de similarité (rouge>vert>bleu>noir). Les histidines du cytochrome B5 impliquées dans la fixation d'hème sont encadrées, ainsi que H583, C603 et Y605 d'ECL3, remplacés par des alanines par mutagenèse dirigée.

##### b) Fixation des porphyrines sur les mutants

La fixation de l'hémime et de la PPIX a été testée sur ECL3 par mesure de la fluorescence intrinsèque du domaine en présence de concentrations croissantes (0 à 14  $\mu\text{M}$ ) de l'un ou l'autre des composés. Les courbes de saturations obtenues pour les différents mutants sont présentées dans la Figure 64. On observe que les effets les plus importants sont obtenus avec les mutants H583A et C603A. En effet, ils fixent l'hémime avec une affinité 5 à 6 fois plus faible que le domaine ECL3 original tandis que l'affinité de l'hémime pour le mutant Y605A n'est pas diminuée (cf. Kd, Figure 66). En revanche, la fixation de la PPIX est peu affectée par les différentes mutations. Cela suggère donc que ces résidus participent à la coordination du fer de l'hémime.

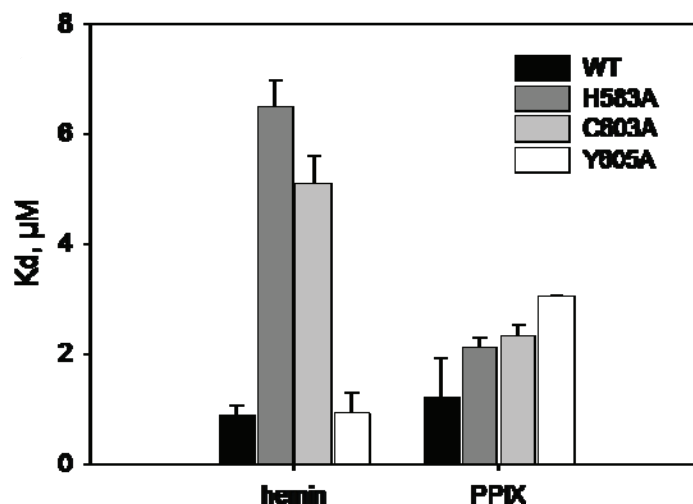


Figure 66 - Constantes de dissociation de l'hémine et de la PPIX fixés sur ECL3 muté. Les valeurs des Kd sont calculées à partir des courbes de saturation présentées en Figure 64.

L'ensemble des constantes de dissociations obtenues pour ABCG2, le domaine ECL3 et les mutants d'ECL3 est résumé dans le Tableau 5 ci-dessous.

Ligand	Origine ECL3	Kd, μM
5D3 Ab	ECL3	0,004±0,002 <sup>(1)</sup>
5D3 Ab	ECL3 réduit	Pas de fixation
Hémine	ECL3	A <sub>412nm</sub> : 1,33±0,72
Hémine	ECL3	Fluow: 0,88±0,18
Hémine	ECL3 réduit	1,03±0,69
Hème	ECL3	0,47±0,40
PPIX	ECL3	1,21±0,71
PPIX	ECL3 réduit	3,40±0,01
ZnPPIX	ECL3	0,80±0,01
CoPPIX	ECL3	0,71±0,38
Phéophorbide a	ECL3	3,42±0,50
Hémine	ECL3 H583A	6,49±0,49
Hémine	ECL3 C603A	5,09±0,52
Hémine	ECL3 Y605A	0,91±0,38
PPIX	ECL3 H583A	2,11±0,19
PPIX	ECL3 C603A	2,31±0,21
PPIX	ECL3 Y605A	3,05±0,01
Hémine(2)	ABCG2	0,19±0,07
Phéophorbide a(2)	ABCG2	>8

Tableau 5 - Constantes de dissociation des différents composés testés sur ABCG2 et le domaine ECL3 sauvage et muté.

(1) en considérant une masse moléculaire de 150 kDa; (2) en présence de 5 μM de mitoxantrone et de doxorubicine.

## 5. Sur ABCG2 entière

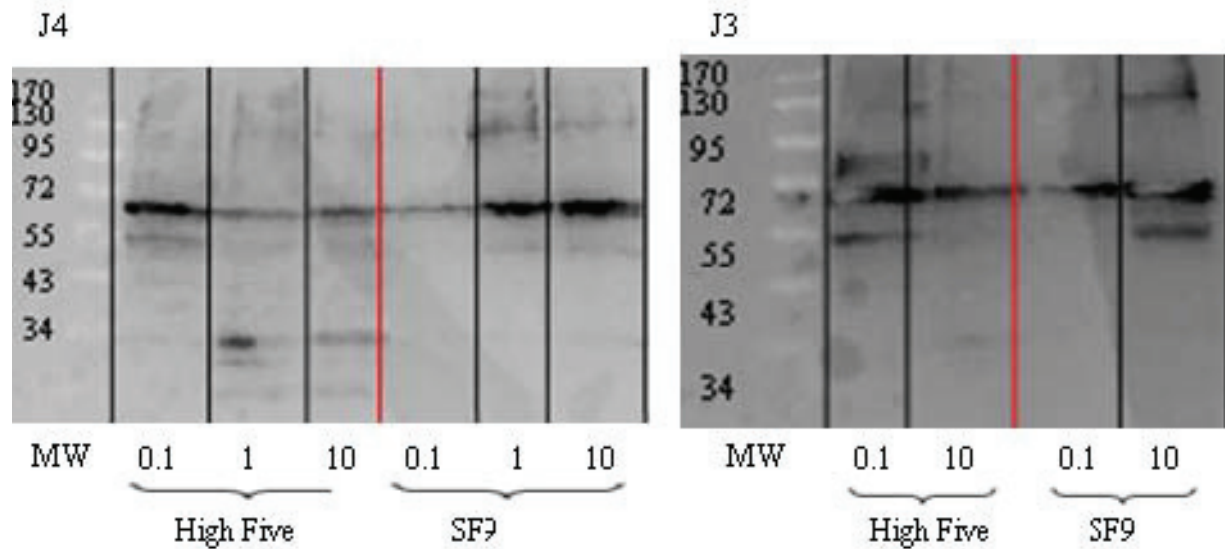
### a) Expression et purification d'ABCG2

Afin de pouvoir réaliser des expériences de fluorimétrie sur ABCG2, nous avons besoin de produire et purifier une protéine active, en quantité suffisante. Le meilleur système pour garantir l'activité d'ABCG2 est le système homologue, en cellules humaines. Malheureusement, ce système ne permet pas d'obtenir les quantités nécessaires. Nous nous sommes donc tournés vers les systèmes hétérologues. Parmi les différentes possibilités, deux avaient déjà été testées au laboratoire par Alexandre Pozza au cours de son doctorat. Le système bactérien en BL21(DE3) produit beaucoup de protéine, mais nécessite d'utiliser le SDS comme détergent lors de la purification (Pozza et al., 2010). De plus, on ne retrouve ni capacité de transport de substrat ni activité ATPasique sur les membranes testées, suggérant qu'ABCG2 n'est pas active dans ces conditions (Pozza et al., 2010). Le système en cellules d'insectes, en revanche, permet d'obtenir une protéine active et en quantité plus faible, mais compatible avec les essais fluorimétriques. Nous avons donc décidé d'utiliser le système en cellules d'insectes.

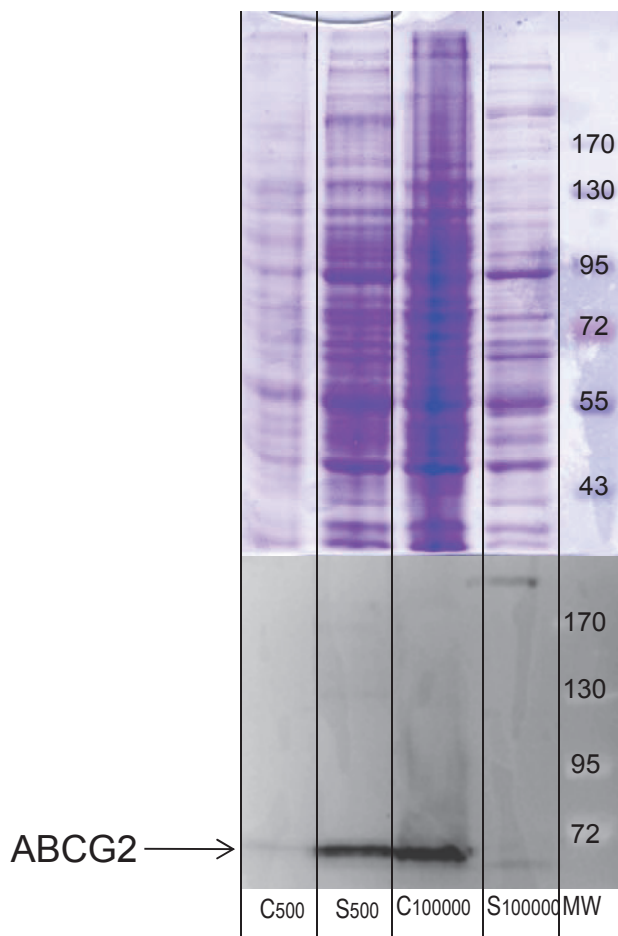
### i) Clonage de H<sub>10</sub>ABCG2 et obtention du baculovirus

Le clonage de H<sub>10</sub>ABCG2 a été réalisé dans pFastBacDual NinaA par Céline Trometer au laboratoire. Le séquençage complet du gène d'ABCG2 a confirmé la présence de l'étiquette 10 histidines.

Le principe d'obtention du baculovirus est détaillé dans la partie « Matériels et Méthodes ». Brièvement, des bactéries DH10 Bac ont été transformées avec ce plasmide et le bacmide recombinant résultant a été extrait de la culture de l'une des colonies blanches. Il a ensuite été utilisé pour infecter des cellules *Sf9* qui ont produit une première population de baculovirus (P1). Cette population de virus a été amplifiée en plusieurs étapes (P1 à P4), puis Lorena Martinez a titré le virus. Les tests d'infection réalisés ensuite nous permettent de déterminer que l'infection optimale des cellules a lieu à une MOI de 0,1 (Figure 67). Cette concentration de virus sera donc utilisée pour les cultures de cellules *Hi-Five*.



**Figure 67 – Détection d’ABCG2 par Western blot à partir de cellules *Hi-5* et *Sf9* infectées pendant 4 (gauche) ou 3 (droite) jours par des quantités variables de baculovirus.**  
 Les cellules *Hi-5* expriment ABCG2 dès la MOI de 0,1 à 3 et 4 jours, tandis que les *sf9* ont besoin d’une quantité de virus 10 à 100 fois plus importante pour exprimer le même niveau de protéine. On choisit de réaliser l’étude avec les cellules *Hi-Five* infectées à une MOI de 0,1.



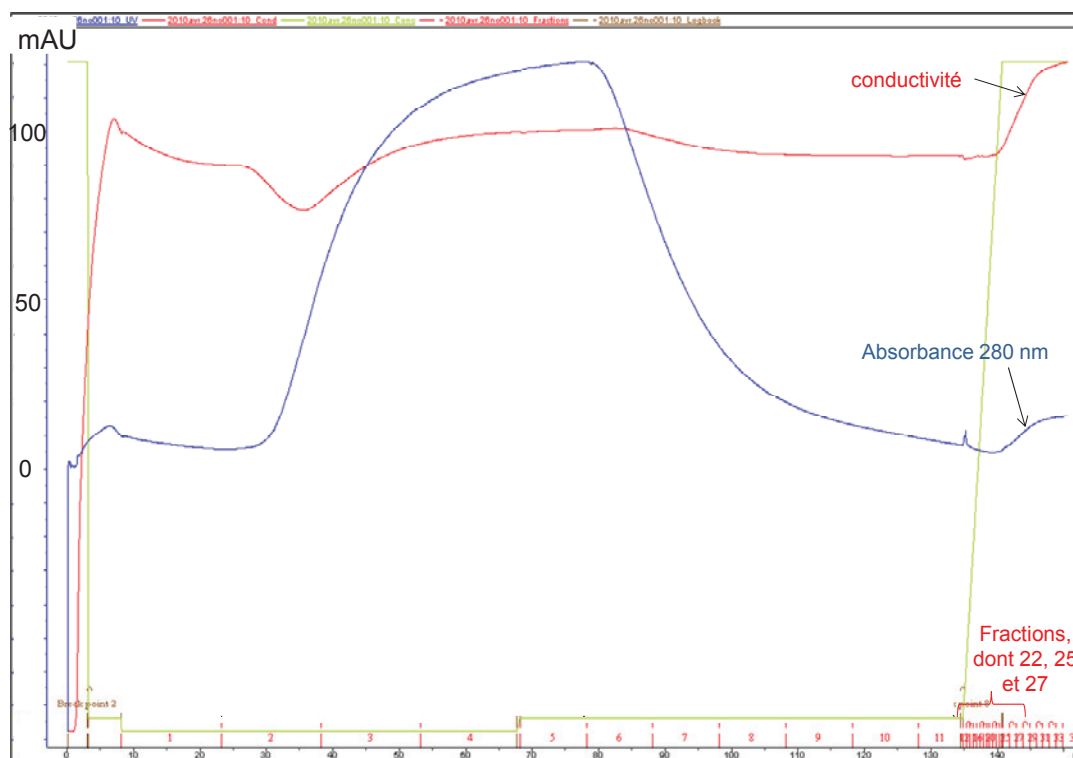
**Figure 68 – Bleu de Coomassie et Western blot des membranes préparées à partir de cellules *Hi-5* surexprimant  $H_{10}ABCG2$ .**  
 La révélation est faite avec l’anticorps BXP-21 ( $1/500^{ème}$ ). On observe une bande à 72 kDa correspondant à la forme monomérique d’ABCG2.  
 C500 : culot après centrifugation à 500xg (cellules non lysées)  
 S500 : surnageant après centrifugation à 500xg  
 C100 000 : culot après centrifugation à 100 000xg (membranes)  
 S100 000 : surnageant après centrifugation à 100 000xg

ii) Culture cellulaire des *Hi-5*, infection et préparation des membranes

Ces étapes sont réalisées par Lorena Martinez pour son stage d'ingénieur au laboratoire. Les cellules des spinners contenant 800 ml de milieu sont infectées au cours de leur phase de croissance, à une MOI de 0,1. La production de la protéine par les cellules se fait alors pendant 72 h, puis les cellules sont récoltées, lysées et les membranes sont préparées selon le protocole décrit plus haut dans la partie « Matériels et méthodes ». Les protéines totales sont dosées et un western blot permet de vérifier la présence d'ABCG2 (Figure 68). On obtient bien l'expression d'ABCG2, visible sous forme monomérique à 72 kDa.

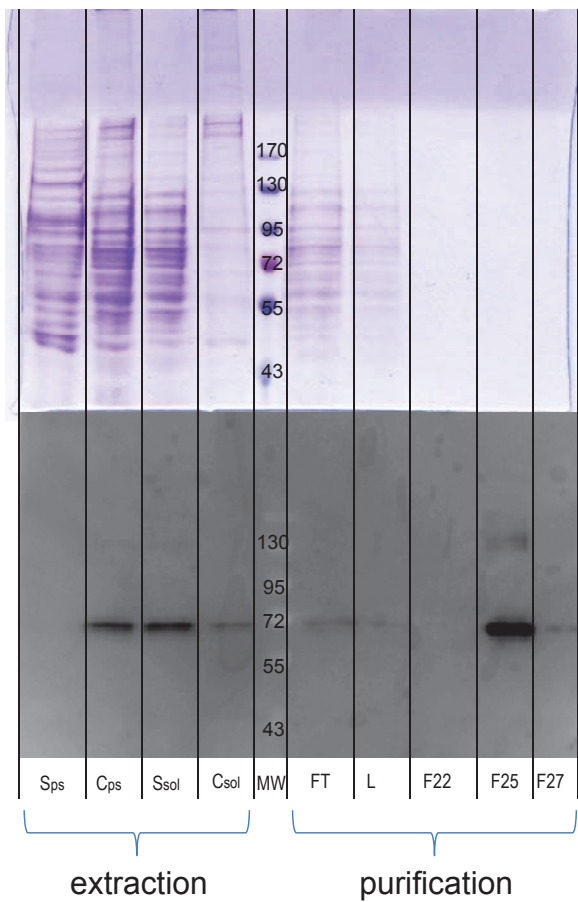
iii) Purification d'ABCG2

La purification d'ABCG2 est réalisée par chromatographie d'affinité comme décrit plus haut dans la partie « Matériels et méthodes ». Le surnageant obtenu après l'étape de solubilisation est chargé sur une colonne Nickel Hi-Trap Chelating HP de 1 ml, puis la résine est lavée et la protéine ABCG2 est éluée par un gradient d'imidazole. Un exemple de profil de purification est présenté en Figure 69. Etant donné la très faible quantité de protéine produite malgré le système d'expression en cellules d'insecte, aucun pic de protéine n'est détectable dans le gradient d'éluion. La réalisation d'un SDS-PAGE et d'un Western blot permet sa visualisation (Figure 70).



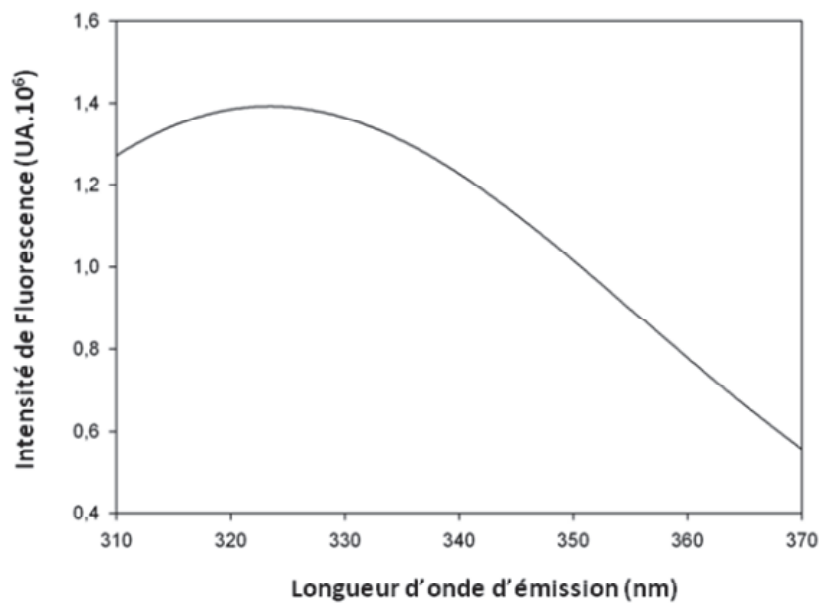
**Figure 69 - Profil de purification de H<sub>10</sub>ABCG2 par chromatographie d'affinité.**

Le suivi de la DO<sub>280 nm</sub> est représenté par la courbe bleue. La courbe rouge correspond à la conductivité. La courbe verte représente la quantité de tampon d'éluion. Les fractions sont figurées en rouge.



**Figure 70 - SDS-PAGE 10% (haut) et western blot (bas) des différentes étapes de la purification de H<sub>10</sub>ABCG2.**

Sps : surnageant de la pré-solubilisation  
 Cps : culot de la pré-solubilisation  
 Ssol : surnageant de la solubilisation  
 Csol : culot de la solubilisation  
 MW : marqueur de poids moléculaire  
 FT : passe-tout-droit  
 L : lavage  
 F22 : fraction d'éluion 22  
 F25 : fraction d'éluion 25  
 F27 : fraction d'éluion 27

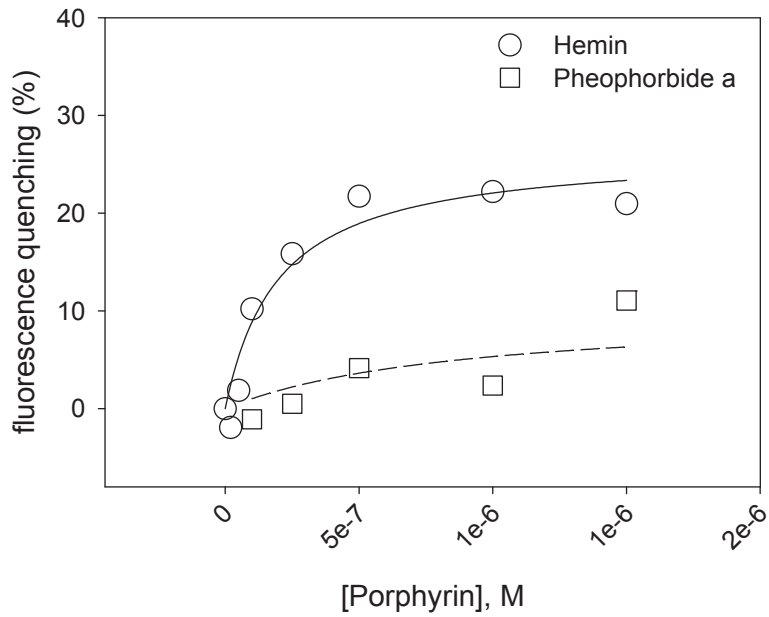


**Figure 71 - Spectre de fluorescence d'ABCG2 à 0,1 μM, après excitation à 295 nm.**



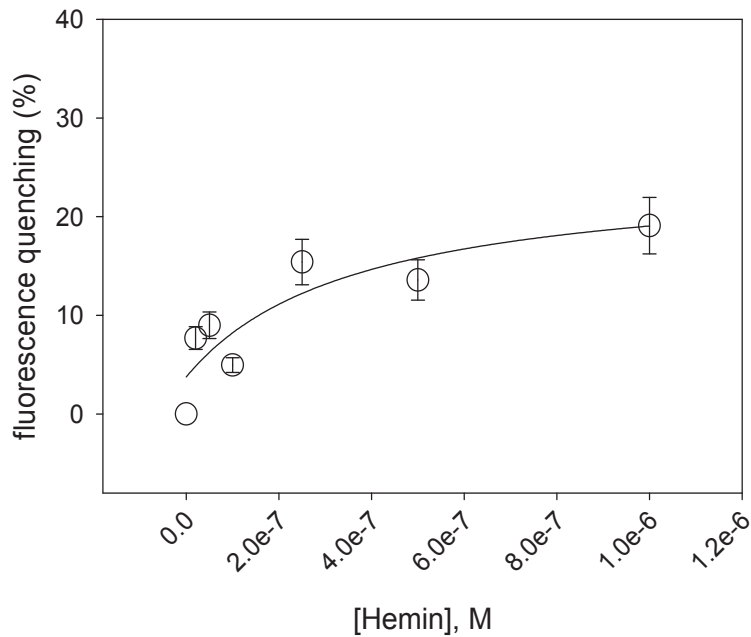
Le SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie montre que les fractions d'élution sont très peu contaminées par d'autres protéines, puisqu'aucune bande n'est visible. En revanche, le taux exact de contamination est impossible à déterminer, ABCG2 étant produite en quantité trop faible pour être détectée par cette méthode. Pour la suite des expérimentations, la protéine sera considérée comme pure. Le western blot révèle que peu d'ABCG2 est perdu au cours de la charge et du lavage, et que la purification semble efficace qualitativement. Les fractions contenant H<sub>10</sub>ABCG2 sont rassemblées et l'imidazole est retiré par dilution/concentration avec un tampon (50 mM HEPES, pH 8,0, 250 mM NaCl, 15% glycérol, 10 mM DDM) dans un amicon de cut-off 50 kDa.

La fluorescence intrinsèque de la protéine est lue entre 310 et 370 nm après excitation à 295 nm. Le spectre obtenu est présenté en Figure 71. ABCG2 présente un spectre caractéristique d'une protéine, avec un maximum de fluorescence à 325 nm, signe que les tryptophanes sont dans un environnement relativement hydrophobe, ce qui suggère que la protéine est repliée.



**Figure 72 - Courbes de saturation de la fixation d'hémine et de phéophorbide a sur H<sub>10</sub>ABCG2 pré-incubée avec des substrats.**

ABCG2 (0,1  $\mu$ M) est pré-incubée avec 5  $\mu$ M de mitoxantrone et doxorubicine, avant l'addition d'hémine (ronds) ou de phéophorbide a (carrés). Les courbes sont ajustées à l'aide du logiciel SigmaPlot, en considérant 1 site de fixation, selon l'équation 2.



**Figure 73 - Courbe de saturation de la fixation d'hémine sur H<sub>10</sub>ABCG2.**

ABCG2 (0,1  $\mu$ M) est additionnée d'hémine en concentrations croissantes. La courbe est ajustée à l'aide du logiciel SigmaPlot, en considérant 1 site de fixation, selon l'équation 2.

## b) Fixation de porphyrines sur ABCG2

Afin de déterminer si ABCG2 possède la capacité de fixer des porphyrines sur sa grande boucle extracellulaire ECL3, on suit l'évolution de sa fluorescence intrinsèque en présence de concentrations croissantes d'hémine ou de phéophorbide a. Comme ABCG2 est connue pour transporter ce type de composés, on peut supposer qu'il existe au moins un site de fixation au niveau de la région membranaire de reconnaissance des substrats. Dans le but de limiter au maximum cette fixation interne, la protéine est donc pré-incubée en présence de 5  $\mu\text{M}$  de mitoxantrone et de doxorubicine, substrats qui se fixent sur les sites de transport. Cette concentration en substrat est estimée suffisante pour saturer les sites, puisque les  $K_d$  de fixation de ces molécules sur ABCG2 sont de 0,9 et 1,6  $\mu\text{M}$  respectivement (Pozza et al., 2006). La fluorescence est lue entre 310 et 370 nm, après excitation à 295 nm et en présence de 0,1 % de CHAPS. La fluorescence du tampon est retirée, et l'effet de filtre interne corrigé, par l'utilisation de NATA. Les spectres obtenus permettent de calculer l'atténuation de fluorescence, ou quenching. Les résultats sont présentés ci-dessous, en Figure 72. On peut voir que l'hémine induit une atténuation de fluorescence de la protéine d'environ 25 % et la courbe de saturation permet de calculer un  $K_d$  de  $0,19 \pm 0,07 \mu\text{M}$ . En revanche, on détecte une interaction beaucoup plus faible avec le phéophorbide a ( $K_d > 8 \mu\text{M}$ ), ce qui suggère que ce composé se fixe mal sur ECL3, ce qui est cohérent avec les résultats précédemment obtenus avec ECL3 isolé.

La même expérience est ensuite réalisée avec l'hémine sur ABCG2, sans la pré-incubation avec les substrats (mitoxantrone et doxorubicine), afin de se rapprocher des conditions physiologiques. Le résultat, présenté dans la Figure 73, montre une courbe de saturation permettant de calculer un  $K_d$  apparent de  $0,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$ .

Ce premier chapitre des résultats permet de conclure à une prise en charge spécifique par ECL3 de certaines porphyrines, et particulièrement l'hème, qui présente la meilleure affinité avec le domaine. Il reste à éclaircir l'implication de cette fixation extracellulaire dans l'homéostasie des porphyrines, et notamment la possibilité d'un partenariat avec une protéine sérique, l'albumine humaine. La Figure 74 ci-dessous illustre le mécanisme possible et complète la Figure 25 précédente.

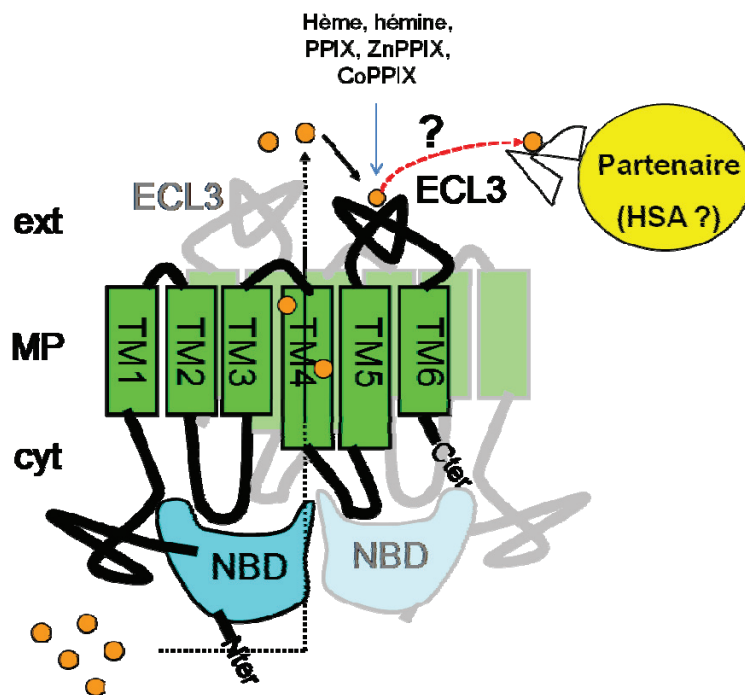


Figure 74 - Schéma de la prise en charge des porphyrines par ECL3 et interaction potentielle avec la HSA. ABCG2 est représentée sous sa forme homodimérique, dont l'un des monomères est en arrière-plan. Les ronds orange représentent les porphyrines. Les flèches noires représentent leurs mouvements probables et la flèche rouge leur mouvement potentiel.

## II Recherche de partenaire

ECL3, domaine extracellulaire d'ABCG2, fixe des porphyrines, composés potentiellement très toxiques lorsqu'ils sont seuls en solution. Au niveau plasmatique, deux protéines sont décrites pour prendre en charge ces composés, l'albumine et l'hémopexine, avec des Kds pour l'hème respectivement de  $1.10^{-8}$  et  $1.10^{-12}$  M. L'hémopexine présente une meilleure affinité pour l'hème, mais l'HSA est beaucoup plus abondante. Ces deux protéines sont donc de bons candidats pour interagir avec ECL3. Au cours de cette thèse, seul le partenariat entre l'albumine humaine (HSA) et ABCG2/ECL3 a été testé. Les résultats sont présentés dans ce chapitre.

### 1. Partenariat avec ECL3 isolé

#### a) A partir de lysats cellulaires

Dans un premier temps, une série d'expériences a été réalisée à l'aide de billes magnétiques sur lesquelles la protéine H<sub>6</sub>ECL3 est greffée, comme décrit plus haut. Elle consiste en une technique de « pêche au ligand », en incubant les billes magnétiques dans un lysat de cellules K562 exprimant ou non ABCG2, afin d'isoler une ou deux protéine(s) partenaire(s). Les billes sont lavées et éluées selon le protocole précédent et l'éluat est analysé sur SDS-PAGE. Les résultats sont présentés en Figure 75. On constate qu'aucune protéine détectée par coloration au coomassie n'est spécifique d'une interaction avec H<sub>6</sub>ECL3, puisque les mêmes protéines sont retrouvées avec les billes contrôle non greffées. Il se peut que les protéines soient en concentration trop faible ou, plus vraisemblablement, qu'aucune protéine n'ait interagit avec le domaine de façon suffisamment forte. Cette méthode n'a pas permis d'isoler une protéine particulière, et le partenariat avec l'HSA a ensuite été étudié de manière spécifique.

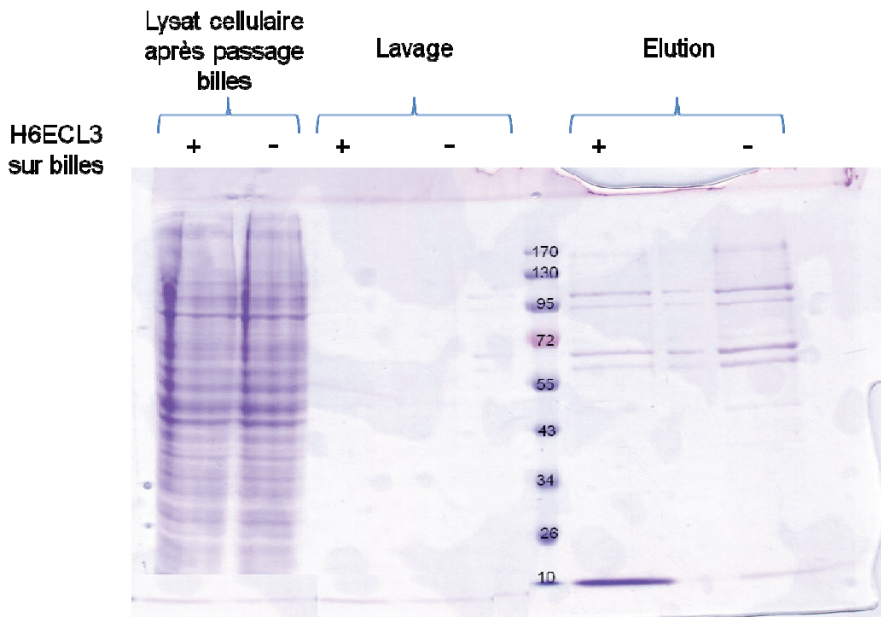


Figure 75 - Migration électrophorétique sur SDS-PAGE des différentes étapes de la « pêche au ligand ».

Expérience réalisée à partir de cellules K562 exprimant ABCG2, avec des billes contrôle (H<sub>6</sub>ECL3 -) et des billes test (H<sub>6</sub>ECL3 +). Les échantillons sont prélevés dans le lysat cellulaire après incubation avec les billes, dans le lavage et dans l'éluion.

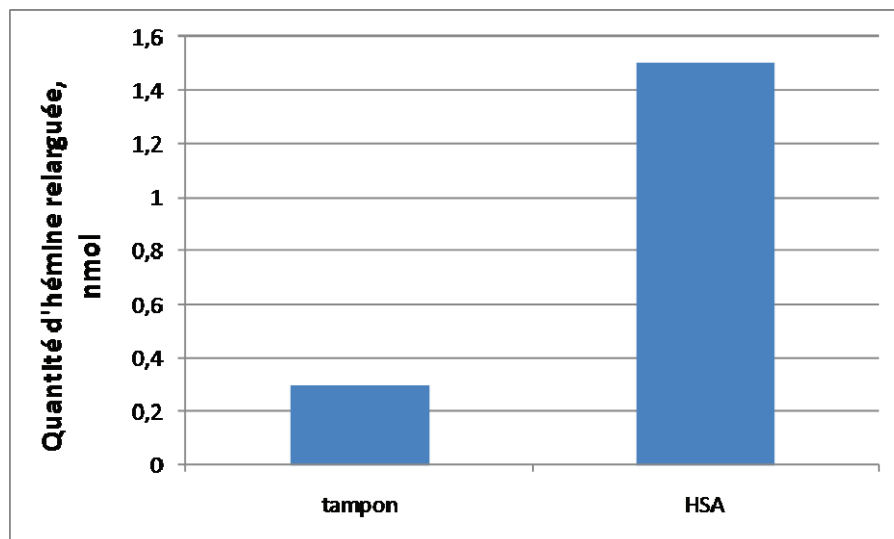
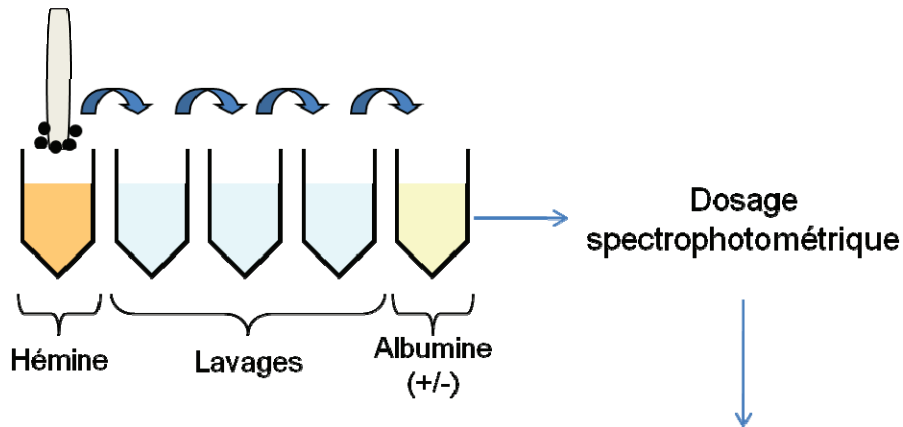


Figure 76 - Relargage d'hémimine fixée sur H<sub>6</sub>ECL3 dans une solution de HSA.

En haut, les flèches indiquent l'avancée du barreau aimanté. En bas sont représentées les quantités d'hémimine dosées dans les deux solutions finales (en nmol).

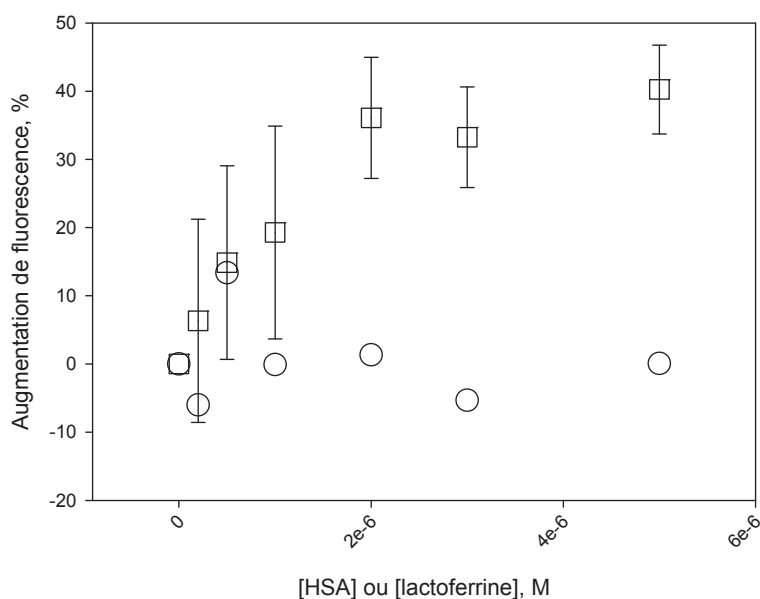
## b) Mise en évidence d'un partenariat avec l'HSA

## i) Par l'intermédiaire de billes magnétiques

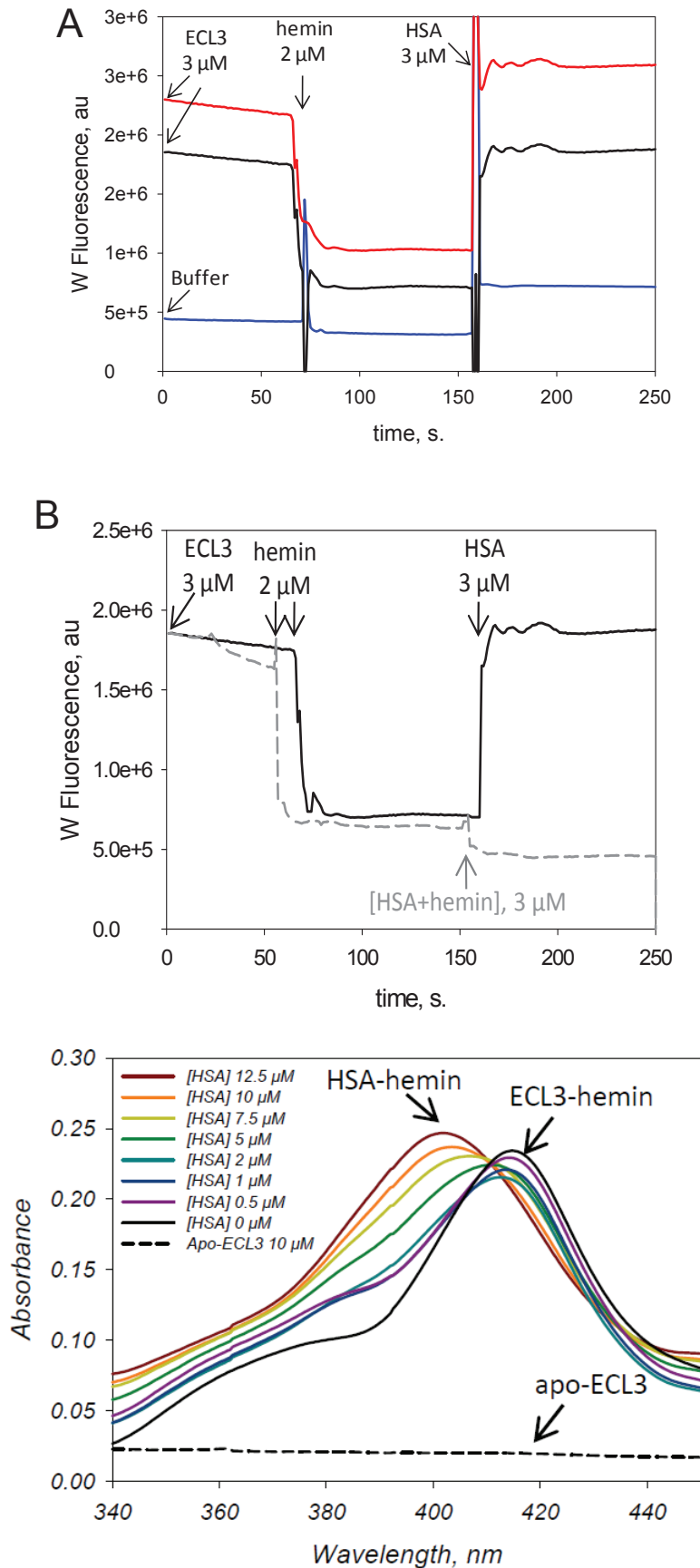
De la même façon que précédemment, la protéine H<sub>6</sub>ECL3 est greffée sur des billes de Ni-NTA, puis ces dernières sont incubées sous agitation dans différents bains. Dans le cas présent, l'expérience suit le schéma présenté en Figure 76. Les billes sont plongées dans une solution d'hémine, puis lavées trois fois et enfin plongées dans une solution contenant 2  $\mu$ M de HSA, ou seulement le tampon, pour contrôle. Un dosage spectrophotométrique permet de déterminer la quantité d'hémine dans les deux dernières solutions. Les résultats obtenus sont illustrés par la Figure 76. On constate que la solution contenant l'albumine présente un taux d'hémine 5 fois supérieur au contrôle (1,5 contre 0,3 nmol), ce qui suggère que l'hémine a bien été déplacée de H<sub>6</sub>ECL3 vers l'albumine.

## ii) Par fluorimétrie intrinsèque

La fluorescence intrinsèque du complexe ECL3-hémine (3  $\mu$ M - 2  $\mu$ M) a été enregistrée entre 310 et 370 nm après excitation à 295 nm, en présence de concentrations croissantes d'HSA ou de lactoferrine. La lactoferrine est une glycoprotéine de 80 kDa qui est exprimée dans la plupart des fluides biologiques et qui possède la capacité de fixer le fer (Gonzales-Chavez et al., 2009). Les résultats obtenus sont présentés en Figure 77. On observe une augmentation de la fluorescence du domaine ECL3 en présence de l'HSA, mais pas de la lactoferrine, ce qui suggère que l'HSA interagit avec ECL3 en présence d'hémine et que cette interaction n'est pas artéfactuelle.



**Figure 77 - Intercation du complexe ECL3-hémine avec l'HSA et la lactoferrine.** Atténuation de fluorescence de 3  $\mu$ M du complexe ECL3-hémine en présence de 0 à 50  $\mu$ M d'HSA (carrés) ou de lactoferrine (ronds).



**Figure 78 – Cinétique de fixation/relargage de l'hémine sur ECL3.**

La fluorescence intrinsèque de 3 μM d'ECL3 à 336 nm est enregistrée avant et après l'ajout de 2 μM d'hémine et 3 μM de HSA (flèches).

A : Correction faite sur le spectre brut d'ECL3 (rouge) par le spectre obtenu pour le tampon (bleu). Le spectre résultant (noir) est reporté sur la figure du bas.

B : l'expérience est réalisée avec ajout de 3 μM de HSA (trait plein noir) ou de 3 μM de complexe HSA-hémine (tirets gris).

**Figure 79 - Spectres d'absorbance de l'hémine en présence d'ECL3 puis de HSA.**

Le spectre est réalisé sur 5 μM d'hémine en présence de 10 μM d'apo-ECL3 puis de concentrations croissantes d'HSA (0-12,5 μM).



## iii) Par fluorimétrie cinétique

La fluorescence intrinsèque du domaine ECL3 a été enregistrée à 336 nm, dans le temps, après excitation à 295 nm. 2  $\mu\text{M}$  d'hémine puis 3  $\mu\text{M}$  de HSA (préalablement saturée ou non par de l'hémine) sont ajoutés successivement dans la cuve. Les spectres obtenus sont présentés dans la Figure 78 ci-dessous. On observe que l'ajout d'hémine induit une atténuation de fluorescence du domaine d'environ 50 à 60 %, ce qui est compatible avec les valeurs obtenues dans la Figure 57 (ronds), et que la fluorescence est stable, ce qui indique que la fixation sur ECL3 est durable. L'addition d'apoHSA provoque une brusque augmentation de la fluorescence du domaine qui revient à sa valeur initiale, signe que l'hémine a été relarguée d'ECL3. Dans le cas de l'ajout d'HSA saturée en hémine, aucune augmentation de fluorescence n'est observée, il n'y a donc pas de changement dans la fixation de l'hémine sur ECL3. Ces résultats permettent de conclure à un déplacement de l'hémine d'ECL3 en présence de HSA, mais le transfert effectif entre les deux protéines reste à démontrer.

## iv) Par spectrophotométrie

Les spectres d'absorbance de 5  $\mu\text{M}$  d'hémine en présence de 10  $\mu\text{M}$  d'apo-ECL3 puis de concentrations croissantes de HSA (0-10  $\mu\text{M}$ ) sont enregistrés entre 320 et 700 nm. Ils sont présentés en Figure 79. On observe que le pic de Soret du complexe hémine-ECL3 à 412 nm se déplace à 402 nm en présence de HSA, ce qui est caractéristique de la formation d'un complexe hémine-HSA (Beaven et al., 1974). On peut en donc déduire que l'hémine est transférée d'ECL3 à l'HSA.

## 6. Partenariat avec ABCG2

Les expériences décrites plus haut permettent de mettre en évidence un échange d'hémine entre ECL3 isolé et HSA. ABCG2 possède une affinité plus forte qu'ECL3 isolée pour l'hémine (0,2  $\mu\text{M}$  contre environ 1  $\mu\text{M}$ ). Il est donc nécessaire de s'assurer que le transfert d'hémine est possible entre ECL3 d'ABCG2 et l'HSA.

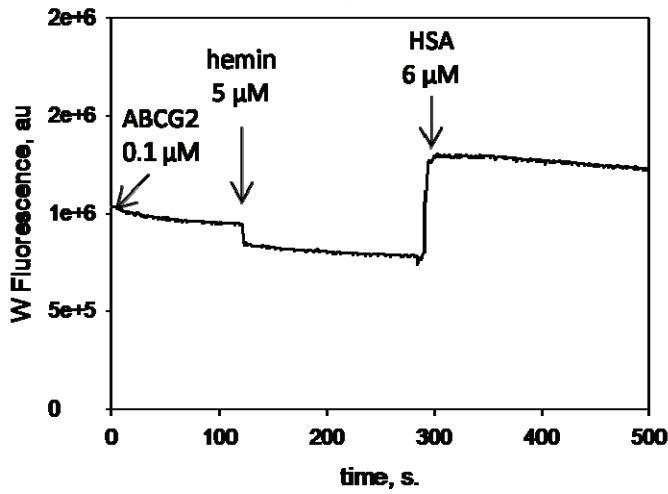


Figure 80 - Cinétique de fixation/relargage de l'hémine sur H<sub>10</sub>ABCG2.

La fluorescence intrinsèque de 0,1 μM d'H<sub>10</sub>ABCG2 à 328 nm est enregistrée avant et après l'ajout de 5 μM d'hémine et 6 μM de HSA.

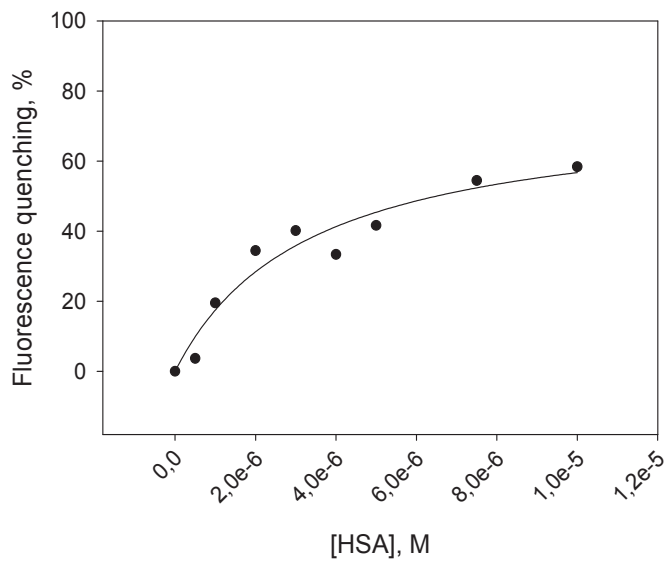


Figure 81 - courbe de saturation de la fixation de HSA sur H<sub>10</sub>ABCG2.

H<sub>10</sub>ABCG2 (0,1 μM) est additionnée d'HSA en concentrations croissantes. Les points sont fittés à l'aide du logiciel Sigma Plot, en considérant 1 site de fixation, selon l'équation 2.

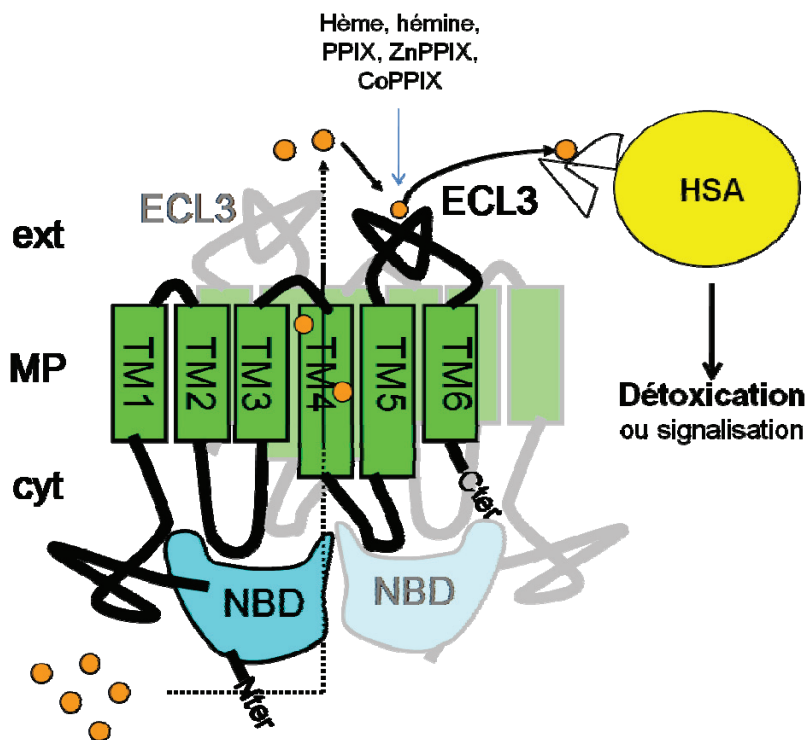
a) Transfert d'hémine entre ABCG2 et HSA

La fluorescence intrinsèque d'H<sub>10</sub>ABCG2 (0,1 µM), préalablement incubée avec 5 µM de mitoxantrone et de doxorubicine pour bloquer les sites internes, a été enregistrée à 328 nm, dans le temps, après excitation à 295 nm. 5 µM d'hémine puis 6 µM de HSA sont ajoutés successivement dans la cuve. Les données sont corrigées de la même façon que précédemment pour ECL3 et le spectre obtenu est présenté en Figure 80. On observe une diminution de la fluorescence d'ABCG2 lors de l'ajout d'hémine, signe d'une fixation du composé sur la protéine. Lors de l'ajout de HSA, la fluorescence augmente fortement et se stabilise à une valeur supérieure à la fluorescence de départ, signe que l'hémine a été déplacée d'ABCG2 et qu'un autre phénomène non expliqué s'y est adjoint (déplacement de la mitoxantrone, de la doxorubicine, interaction entre ABCG2 et HSA... ?)

b) Interaction directe entre ABCG2 et HSA

L'interaction entre les deux protéines a été testée par mesure de l'atténuation de la fluorescence intrinsèque de 0,1 µM d'ABCG2 en présence de concentrations croissantes d'HSA (0-10 µM). La courbe de saturation obtenue est présentée en Figure 81. Elle permet de calculer un K<sub>d</sub> de  $3,3 \pm 1,1$  µM. On peut déduire de cette expérience que l'échange d'hémine entre ABCG2 et HSA se fait par interaction directe entre les deux protéines.

Ce deuxième chapitre des résultats permet de conclure que l'HSA est effectivement un partenaire d'ABCG2 dans la prise en charge des porphyrines, puisqu'elle déplace l'hémine fixée au niveau d'ECL3 par une interaction directe avec la protéine. Cela donne un éclairage nouveau sur l'implication d'ABCG2 dans l'homéostasie des porphyrines. En effet, ABCG2 permet non seulement leur transport, mais également leur prise en charge par une protéine impliquée principalement dans la détoxification de l'hème, et aussi dans certaines voies de signalisation liées à l'hème (induction de la différenciation cellulaire notamment). Le schéma de la Figure 82 illustre ce mécanisme.



**Figure 82 - Schéma de la prise en charge des porphyrines par ECL3 et interaction avec la HSA.** ABCG2 est représentée sous sa forme homodimérique, dont l'un des monomères est en arrière-plan. Les ronds orange représentent les porphyrines. Les flèches noires représentent leurs mouvements probables.

# RESULTATS ANNEXES



## I ABCG2 efflue-t-il l'hème hors des mitochondries ?

Un article publié en 2009 a mis en évidence la présence d'ABCG2 au niveau de la membrane interne de la mitochondrie, siège de la synthèse de l'hème (Solazzo et al., 2009). Afin de déterminer si ABCG2 est capable d'effluer l'hème hors des mitochondries des cellules K562, une préparation mitochondriale est réalisée, puis l'hème est dosé par HPLC.

### 1. Préparation de la fraction mitochondriale des cellules K562

Le protocole suivi est décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les fractions cytoplasmiques et mitochondriales de cellules K562 exprimant ou non ABCG2 sont déposées sur SDS-PAGE et analysées par Western Blot, comme présenté en Figure 83. Les membranes sont révélées avec trois anticorps différents, BXP-21, anti-tubuline et anti-cytochrome C pour déceler la présence d'ABCG2, de la tubuline (spécifique du cytoplasme), et du cytochrome C (spécifique de la mitochondrie), respectivement.

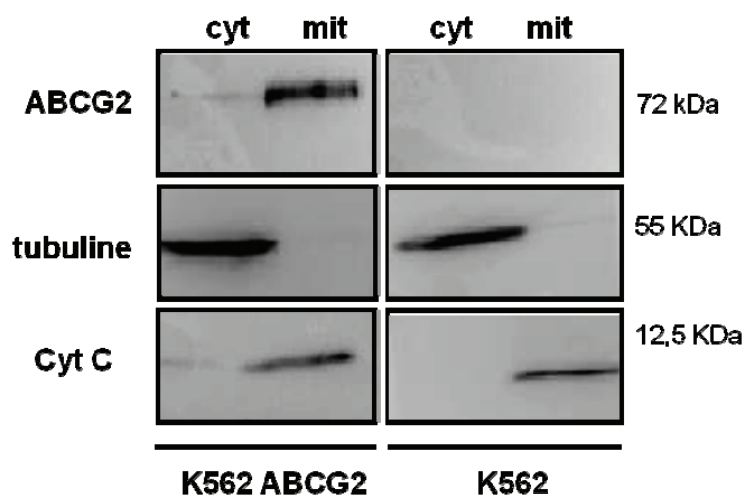
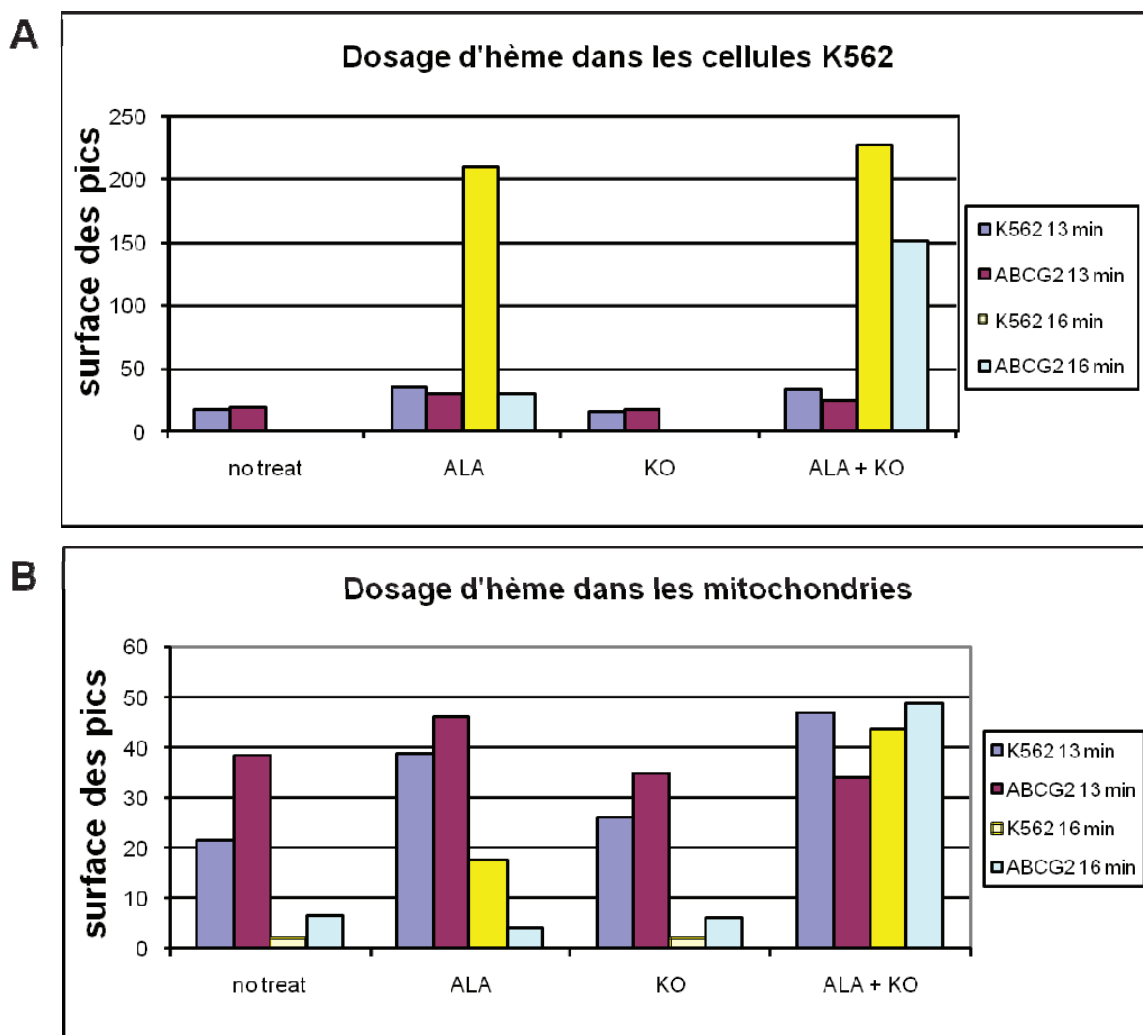


Figure 83 - Western blot des fractions mitochondriales et cytoplasmiques de cellules K562 exprimant ou non ABCG2.

Les fractions cytoplasmiques (cyt) et mitochondriales (mit) des cellules exprimant ABCG2 sont placées à gauche, tandis que celles des cellules ne l'exprimant pas sont à droite. Les tailles des protéines sont indiquées à droite. Les membranes sont révélées avec un anticorps BXP-21 (ABCG2), anti-tubuline (tubuline) et anti-cytochrome C (Cyt C).

Cette étape permet de vérifier que la qualité de la préparation est correcte. En effet, on retrouve bien le cytochrome C dans la fraction mitochondriale et la tubuline dans la fraction cytoplasmique, ce qui confirme que les fractions sont convenablement séparées. De plus, on observe qu'on retrouve bien ABCG2 dans la fraction mitochondriale des cellules K562 ABCG2.



**Figure 84 - Dosage des porphyrines totales et mitochondriales des cellules K562.**

Le dosage est réalisé sur les cellules non traitées (no treat) ou stimulées en présence d'1 mM d'ALA uniquement (ALA), de 1  $\mu$ M de KO143 uniquement (KO) ou des deux combinés (ALA+KO). Les surfaces des pics observés à 13 minutes de rétention (hémine) et à 16 minutes de rétention (PPIX) sont reportées. A. Dosage des porphyrines totales des cellules. B. Dosage des porphyrines des mitochondries.



## 2. Dosage de porphyrines par HPLC

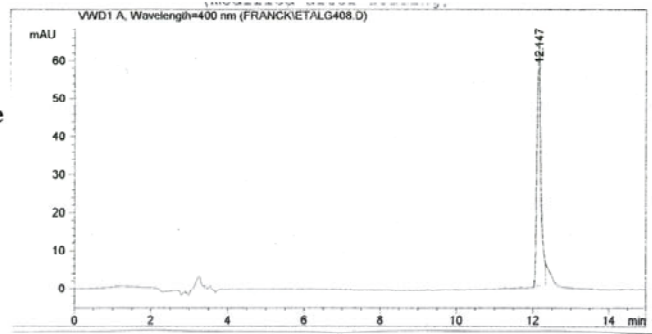
Le dosage de porphyrines est réalisé comme décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ». Les cellules sont incubées au préalable pendant 21 h avec 1 mM d'acide  $\delta$ -aminolévulinique (ALA) pour stimuler la synthèse de l'hème, en absence ou en présence de 1  $\mu$ M de KO143, inhibiteur spécifique d'ABCG2. Le dosage est réalisé à la fois sur les cellules totales et sur les mitochondries. Les chromatogrammes des témoins hémine et PPIX sont présentés en Figure 85 et en Figure 86. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 84. Deux pics sont observés pour la majorité des échantillons, l'un à 13 minutes et l'autre à 16 minutes de rétention, correspondant à l'hémine et à la protoporphyrine IX, respectivement. D'une manière générale, on constate peu de différence de la quantité d'hémine entre les différentes conditions de stimulation aussi bien dans les cellules que dans les mitochondries, alors qu'il y a une augmentation de la PPIX en cas de stimulation par l'ALA. Ceci pourrait s'expliquer par une saturation de l'activité de l'enzyme ferrochélatase, qui ne pourrait pas incorporer un atome de fer dans l'ensemble des molécules de PPIX. L'analyse qui suit se base donc sur le dosage de la PPIX.

- **Au niveau cellulaire** : on constate une forte augmentation de PPIX dans les cellules contrôle, tandis que les cellules exprimant ABCG2 n'accumulent pas ce composé, signe d'un bon fonctionnement d'ABCG2. Lorsqu'on ajoute le KO 143 au milieu de stimulation, on observe que le taux de PPIX des cellules exprimant ABCG2 se rapproche de celui des cellules contrôle et que donc ABCG2 a été inhibé. Ces expériences sur les cellules totales permettent de vérifier que le dosage des porphyrines par HPLC est fiable, puisque l'on retrouve bien les résultats attendus.
- **Au niveau mitochondrial** : De la même façon que dans les cellules, on retrouve une accumulation de PPIX plus faible dans les cellules exprimant ABCG2 que dans les cellules contrôle après stimulation par l'ALA. En revanche, le résultat est moins net lors de l'ajout de KO 143, puisque le taux de PPIX augmente pour les deux lignées cellulaires.

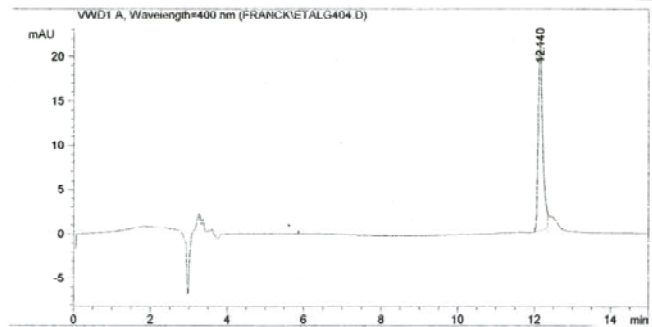
Ces expériences ont été renouvelées plusieurs fois, sans pouvoir mettre en évidence de façon probante la capacité d'ABCG2 mitochondrial à transporter les porphyrines.

**HPLC sur HP 1100 de l'hémine**

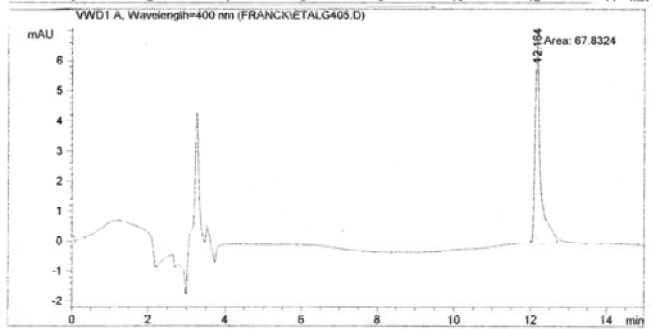
5 $\mu$ Mol  
 H = 65  
 A = 460



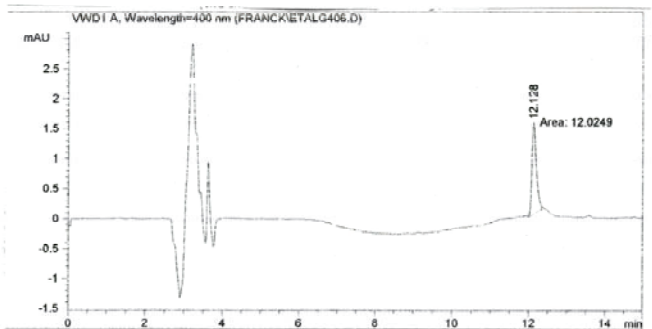
2 $\mu$ Mol  
 H = 24  
 A = 174



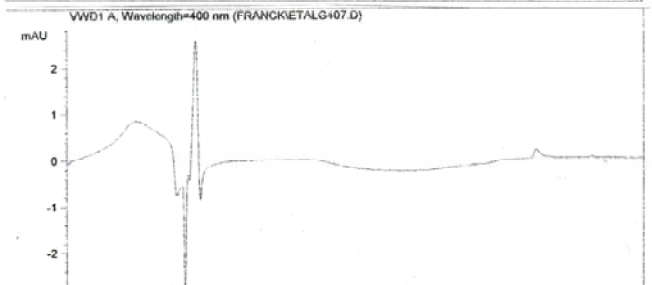
0.5 $\mu$ Mol  
 H = 7  
 A = 68



0.1 $\mu$ Mol  
 H = 1.5  
 A = 12



0.05 $\mu$ Mol  
 H = 0.2  
 A = 2



**Figure 85 - Chromatogrammes HLPC obtenus à 400 nm pour différentes concentrations en hémine.** Les concentrations sont indiquées à gauche, en micromolaire. H représente la hauteur du pic et A son aire, ou surface. Le pic est observé à 12 minutes de rétention pour cette colonne, 13 minutes pour la deuxième colonne utilisée par la suite, en raison de l'ajout d'une précolonne.

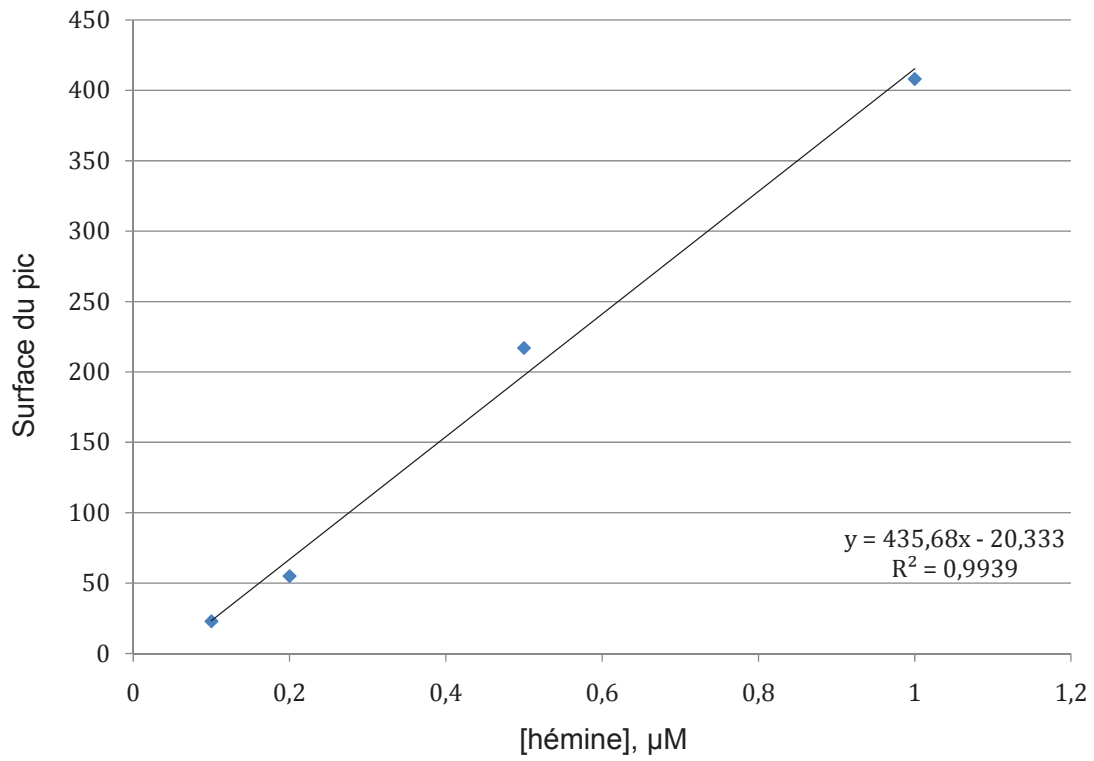


Figure 86 - Dosage de l'hémine par HPLC. Représentation en fonction de la surface du pic observé.

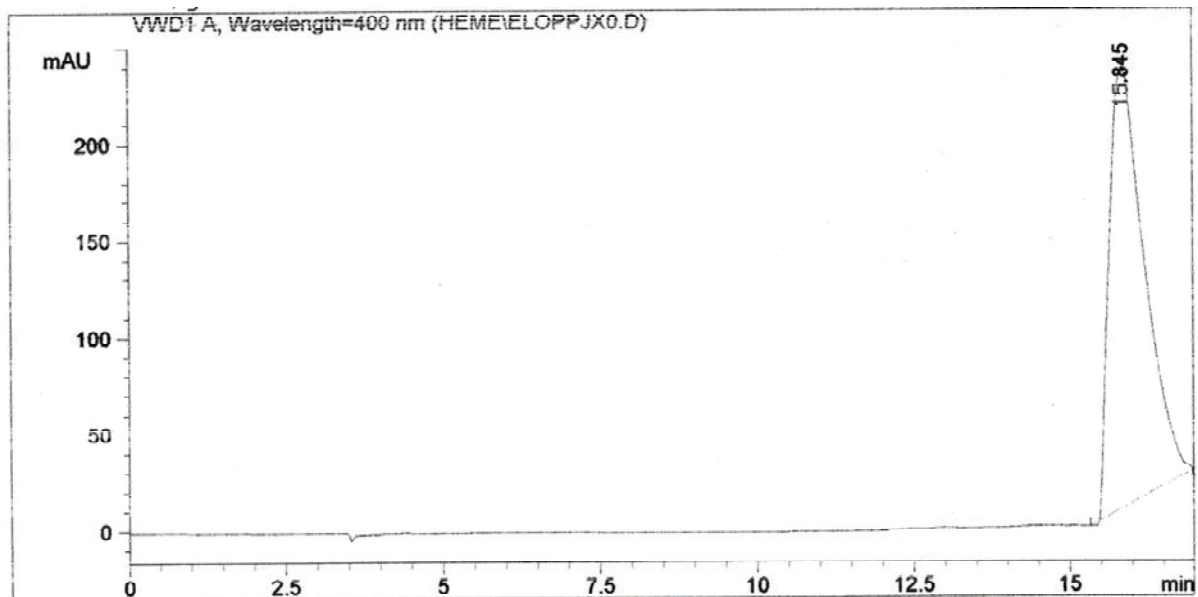


Figure 87 - Chromatogramme HPLC obtenu après injection de PPIX. Le pic est observé à 400 nm. Le temps de rétention est d'environ 16 minutes.

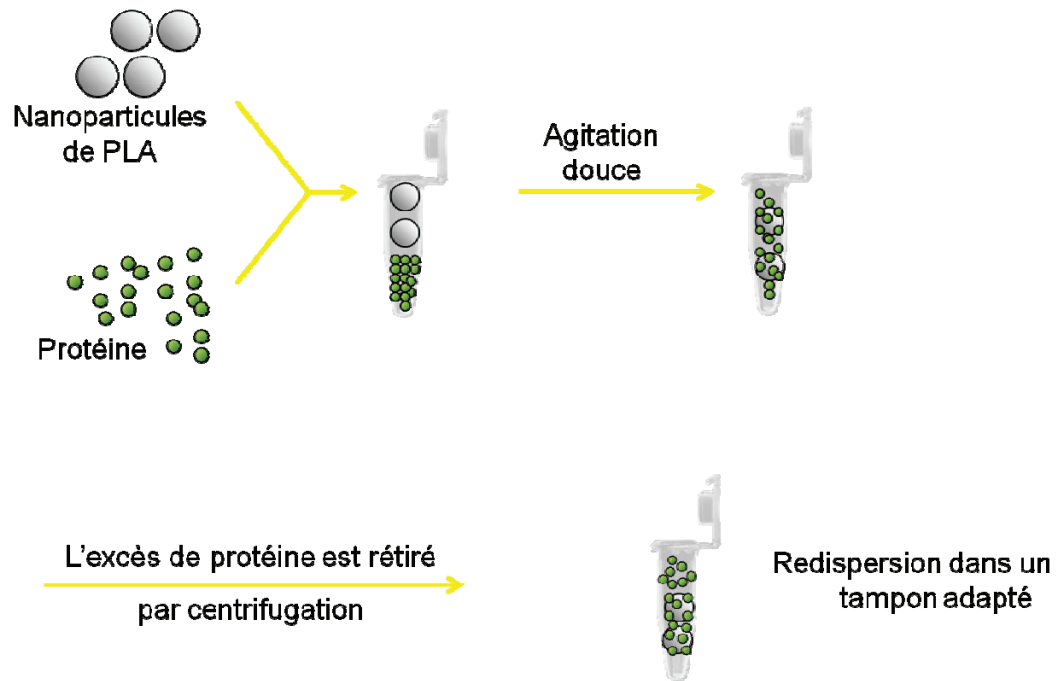


Figure 88 - Formulation d'ECL3 en PLA.

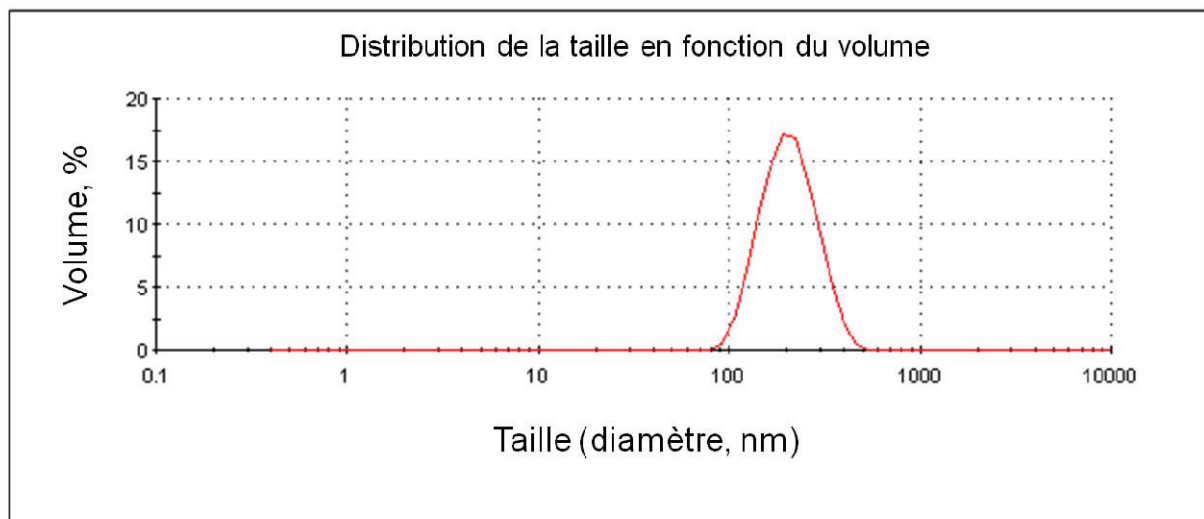


Figure 89 - Mesure de la taille des complexes ECL3-PLA.

## II Formulation d'ECL3 en vue d'immunisation de souris pour l'obtention d'un anticorps spécifique

Les traitements de chimiothérapie sont source de nombreux effets secondaires, car les molécules actives se distribuent dans tout l'organisme et touchent autant les cellules saines que les cellules cancéreuses. De plus, les transporteurs ABC sont à l'origine de résistance à ces traitements, les cellules cancéreuses les surexprimant sont sélectionnées par le traitement de chimiothérapie et conduisent à un échec thérapeutique. Enfin, les différents inhibiteurs de ces protéines testés en essais cliniques n'ont, jusqu'à présent, pas démontré leur efficacité.

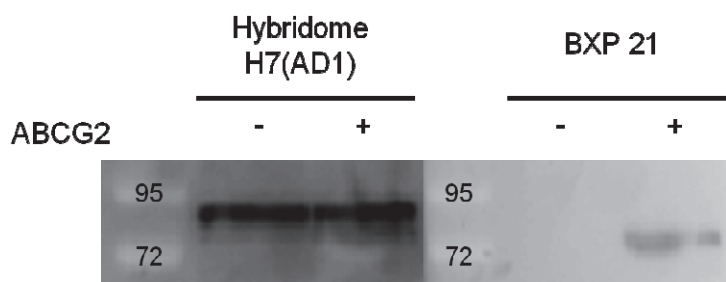
Afin de limiter les effets secondaires des traitements, et éventuellement d'augmenter l'efficacité des inhibiteurs, il est fortement souhaitable de développer des stratégies de ciblage des cellules cancéreuses. En effet, les molécules arrivant directement à leur cible sont plus efficaces, tout en étant utilisées à des doses beaucoup plus faibles, ce qui épargne les tissus sains. La mise en place d'une stratégie de ce type est envisagée au laboratoire, en collaboration avec l'équipe du Dr Verrier (IBCP). Il s'agirait de coupler des substances actives (chimiothérapeutiques en association ou non avec un inhibiteur) encapsulées dans des nanoparticules biodégradables, déjà éprouvées en clinique, avec un anticorps reconnaissant spécifiquement les cellules cancéreuses surexprimant ABCG2. La meilleure cible semble être ABCG2 lui-même, et plus particulièrement ECL3, grande boucle extracellulaire, idéalement placée. L'anticorps 5D3 reconnaît ce domaine extracellulaire et pourrait servir pour le couplage. Néanmoins, cet anticorps commercial est très onéreux et les quantités disponibles commercialement ne sont pas compatibles avec un projet en réclamant plusieurs milligrammes. Il a donc été décidé de produire un autre anticorps en immunisant des souris avec ECL3.

### 1. Formulation d'ECL3 en PLA

Les premiers tests d'immunisation des souris ont été réalisés par injection du domaine ECL3 purifié. Malheureusement, ils ont conduit à la mort de  $\frac{3}{4}$  des souris, probablement en raison de la présence de détergents. Afin de retirer le détergent sans provoquer l'agrégation de la protéine, une formulation avec des polylactates (PLA) a été mise en place. Le protocole est décrit dans la partie « Matériels et méthodes » et illustré dans la Figure 88 ci-contre. En fin d'expérience, les protéines du surnageant sont dosées et le rendement calculé est de 76 %. Les nanoparticules sont suspendues dans un tampon PBS stérile de façon à obtenir 0,2 mg/ml d'ECL3.



**Figure 90 - Test des hybridomes sur des lysats cellulaires contenant ou non ABCG2.**  
 Les tests sont réalisés sur des cellules contrôle (ABCG2 -) et sur des cellules test (ABCG2 +). Le dépôt est de 2 µg de protéines totales. Les résultats obtenus pour BXP-21 et 5D3 servent de référence. Les hybridomes donnant un signal sont repérés en rouge.



**Figure 91 - Western blot de lysats cellulaires de HEK 293 révélés par AD1 ou BXP-21.**  
 Les tests sont réalisés sur des cellules exprimant (ABCG2 +) ou non (ABCG2 -) ABCG2. L'hybridome AD1 est utilisé au 1/10<sup>ème</sup> et BXP-21 au 1/500<sup>ème</sup>.

La taille des particules obtenues est mesurée à 25°C par un Zetasizer Nano S (Malvern Instruments). Le spectre correspondant est présenté en Figure 89. La taille moyenne des complexes ECL3-PLA est d'environ 200 nm et la dispersion est correcte.

## 2. Hybridomes obtenus par immunisation de souris

L'immunisation des souris a été réalisée par la société RD-Biotech, basée à Besançon. 3 souris ont été injectées, et 8 hybridomes se sont révélés positifs pour la protéine ECL3 en Elisa. Ces surnageants ont ensuite été, dans un premier temps, testés dilués au 1/10<sup>ème</sup> en dot blot sur 2 µg de protéines issues de lysats cellulaires de cellules K562. Les résultats sont présentés en Figure 90. On observe que contrairement aux contrôles positifs (BXP-21 et 5D3), aucun des hybridomes ne reconnaît spécifiquement les cellules qui expriment ABCG2. Certains ne reconnaissent pas du tout d'épitope, tandis que d'autres reconnaissent aussi le lysat cellulaire de la lignée contrôle. Dans un deuxième temps, l'un des surnageants (AD1) a été testé en western blot, dilué au 1/10<sup>ème</sup>, sur des lysats cellulaires de cellules HEK 293 exprimant ou non ABCG2. Le résultat est présenté Figure 91. On observe que, comme précédemment, l'hybridome AD1 reconnaît les deux lignées cellulaires. De plus, la bande observée a une taille plus importante qu'ABCG2, reconnue par BXP-21. On en déduit que d'hybridome n'est pas spécifique d'ABCG2.

Les résultats obtenus ne sont pas concluants. Cependant, la quantité de protéine déposée est faible et la dilution trop forte, car les surnageants sont à ce stade peu concentrés. Il est donc possible que certains surnageants ayant donné des résultats négatifs soient seulement sous le seuil de détection. Il faudrait donc recommencer l'expérience avec des surnageants non dilués et sur des dépôts protéiques plus importants.

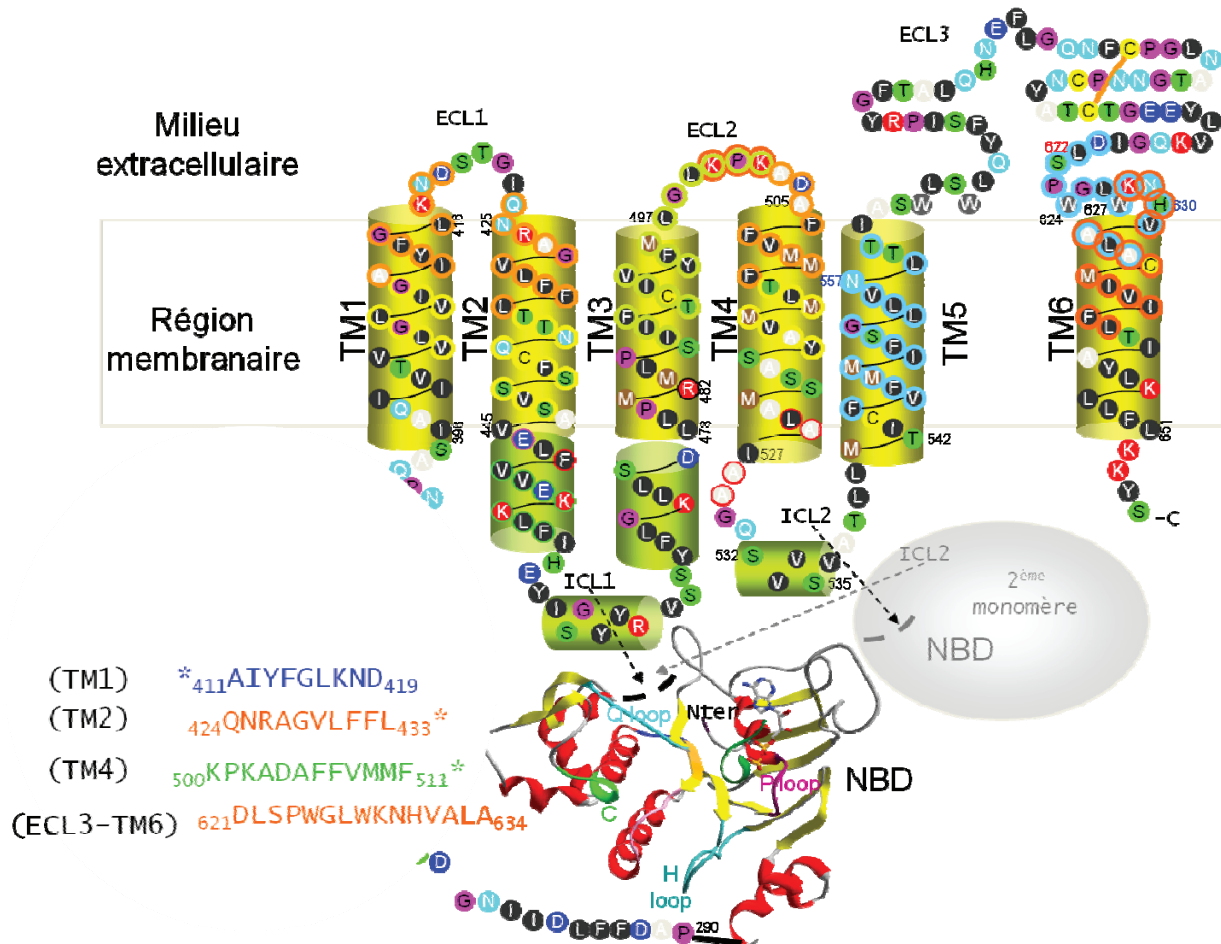


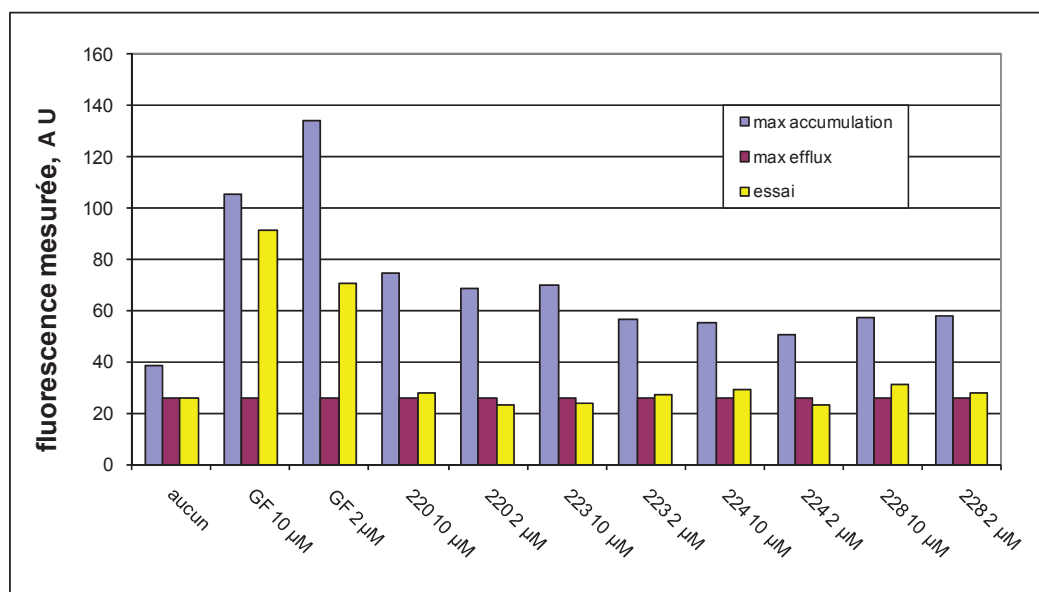
Figure 92 - Topologie d'ABCG2, et localisation des homopeptides.

D'après P. Falson, non publié. Les séquences des homopeptides testés sont indiquées en bas, à gauche. La localisation de l'ensemble des homopeptides est indiquée par un encadrement coloré des résidus concernés.



### III Tests d'homopeptides potentiellement inhibiteurs

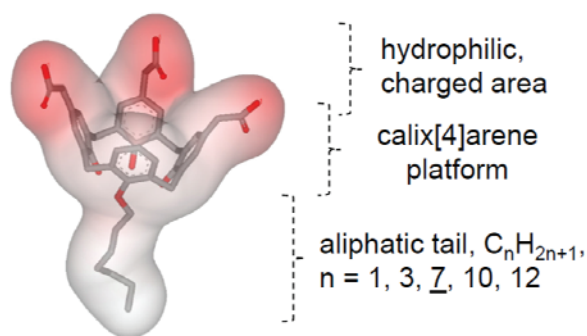
L'une des stratégies mise en place pour lutter contre les phénomènes de résistance à de multiples drogues est le développement de composés capables d'inhiber spécifiquement un transporteur ABC, et notamment ABCG2. Au laboratoire sont testés plusieurs inhibiteurs potentiels. Une nouvelle catégorie d'inhibiteurs d'ABCG2 pourrait être constituée par des homopeptides, c'est-à-dire des peptides synthétiques de séquences primaires identiques à certaines régions d'ABCG2, et qui pourrait venir s'y fixer (Figure 92). Certains de ces homopeptides ont été testés (les séquences sont indiquées sur la Figure 92). Les expériences réalisées en cytométrie de flux permettent de déterminer leur capacité à inhiber le transport de mitoxantrone par ABCG2 dans des cellules HEK 293 surexprimant le transporteur. Les résultats sont présentés en Figure 93.



**Figure 93 - Mesure de la capacité des homopeptides à inhiber le transport de mitoxantrone.**

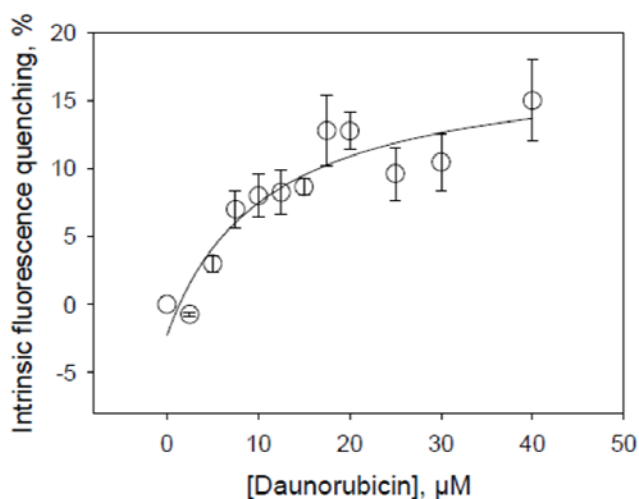
Expérience de cytométrie de flux, avec mesure de la fluorescence de la mitoxantrone dans les cellules HEK 293 exprimant ABCG2, en absence ou en présence de composés inhibiteurs (GF120918) ou à tester, à 10 et 2 µM. En bleu est reportée l'accumulation maximale dans des cellules n'exprimant pas ABCG2, en présence du composé, en violet l'efflux maximal des cellules ABCG2 en absence de composé et en jaune la valeur observée dans les cellules ABCG2 en présence du composé testé.

On observe que dans le cas du GF120918, la valeur de fluorescence de l'essai tend à se rapprocher avec la valeur maximale d'accumulation, ce qui signifie que ce composé est efficace pour inhiber l'efflux de mitoxantrone par ABCG2. En revanche, tous les homopeptides testés ont une valeur de fluorescence d'essai proche ou identique à la valeur d'efflux maximale, aussi bien à 10 qu'à 2 µM, ce qui indique qu'ils ne sont pas capables d'inhiber ce transporteur.



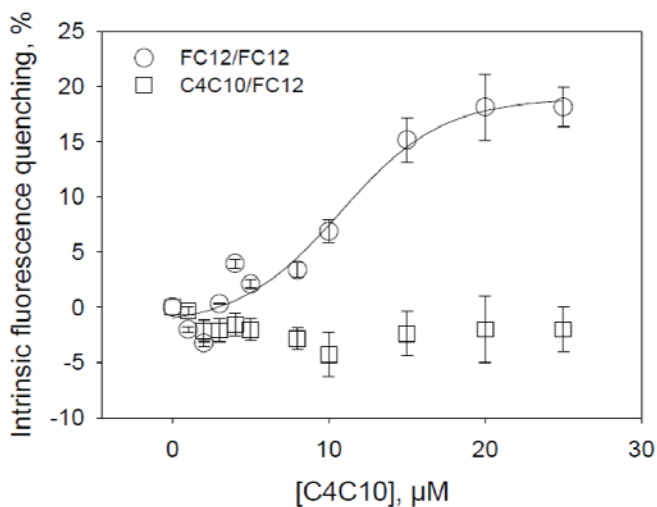
**Figure 94 - Structure chimique des C4Cn.**

Trois noyaux aromatiques sont substitués par un groupe carboxyle méthylène, en position *para*. Une chaîne aliphatique R,  $O(CH_2)_{0-11}CH_3$  est greffée sur le quatrième groupe phénolique.



**Figure 95 - Courbe de saturation de la fixation de daunorubicine sur BmrA solubilisée en C4C10.**

BmrA ( $1 \mu M$ ), solubilisée en C4C10 puis purifiée en FC12, est additionnée de concentrations croissantes de daunorubicine. La courbe est ajustée à l'aide du logiciel SigmaPlot, en considérant 1 site de fixation, selon l'équation 1.



**Figure 96 - Courbe de saturation de l'interaction entre le C4C10 et BmrA solubilisée en FC12 ou C4C10.**

BmrA ( $1 \mu M$ ), solubilisée en FC12 (ronds) ou en C4C10 (carrés) puis purifiée en FC12, est additionnée de concentrations croissantes de C4C10. La courbes est ajustée à l'aide du logiciel SigmaPlot.

## IV Fixation de substrats sur BmrA solubilisée en Stabicalix

Les protéines membranaires représentent environ 20 à 30 % des protéines totales, toutes espèces confondues. Ce sont des cibles particulièrement intéressantes pour la recherche pharmaceutique, mais le développement de nouvelles molécules basées sur leur structure est rendue difficile par le manque de données structurales fiables, obtenues après cristallisation. En effet, ces protéines sont très difficiles d'analyse, car elles nécessitent l'utilisation de détergents pour leur extraction qui, pour la plupart, induisent une perte partielle ou totale de l'activité de la protéine. Une nouvelle classe de détergents a été développée au laboratoire, en collaboration avec plusieurs autres équipes, qui favorise la stabilisation des protéines membranaires et facilite leur cristallisation (Matar-Merheb et al., en révision). Il s'agit de détergents basés sur une structure calix[4]arène, trianioniques (C4Cn), dont la structure est présentée en Figure 94. Une étude complète de leur action sur l'extraction, la purification et la cristallisation de protéines membranaires a été réalisée, notamment sur le transporteur ABC bactérien BmrA. Les expériences présentées ici ont pour but de déterminer si BmrA est toujours capable de fixer un substrat après extraction par le C4C10 et si ce détergent interagit fortement avec cette protéine.

BmrA est solubilisée à partir de membranes à 2 mg/ml soit en FC12, soit en C4C10, puis purifiée en FC12 sur colonne Nickel Hi-Trap Chelating HP de 5 ml, dans un tampon 20 mM Tris-Cl pH 8,0, 50 mM NaCl, 0,3% FC12, 0,02 mM EDTA, 0,1 mM DTT et anti-protéases, et éluée dans le même tampon contenant en plus 250 mM imidazole sous un gradient 0-100 %. L'imidazole est retiré par dilution/concentration et la fixation de daunorubicine est testée sur BmrA par mesure de sa fluorescence intrinsèque. Les résultats sont illustrés en Figure 95. Il a été reporté précédemment que BmrA solubilisée et purifiée en DDM fixe la daunorubicine avec un  $K_d$  d'environ 12  $\mu\text{M}$  (Steinfels et al., 2004). On constate ici que la courbe de saturation obtenue avec la protéine extraite en C4C10 permet d'estimer le  $K_d$  à  $10,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ . On peut en déduire que la présence de C4C10 n'empêche pas la fixation de drogue sur BmrA.

Dans un deuxième temps, la fluorescence intrinsèque de BmrA solubilisée en FC12 ou C4C10 puis purifiée en FC12 a été suivie en présence de concentrations croissantes de C4C10 (0 à 20  $\mu\text{M}$ ). Les résultats obtenus sont présentés en Figure 96. On observe une interaction entre BmrA et le C4C10 lorsque l'extraction a lieu en FC12. En revanche, aucun changement n'est observé dans la fluorescence de BmrA lorsque l'extraction est réalisée en C4C10. On

peut donc supposer que le C4C10 interagit fortement avec BmrA et n'est pas complètement échangé avec la FC12 lors de la purification.

**DISCUSSION ET PERSPECTIVES**



La protéine ABCG2 est connue pour sa capacité à transporter des porphyrines, en particulier la PPIX et le phéophorbide a (Jonker et al., 2002 ; Krishnamurthy et al., 2007), et à lier l'hème (Krishnamurthy et al., 2004). Dans l'étude menée ici, nous montrons qu'ABCG2 est également capable de transporter l'hème, plus exactement son analogue fluorescent, la ZnMP, ce qui n'avait encore jamais été établi clairement. De plus, notre étude montre qu'ABCG2 fixe différentes porphyrines au niveau de sa grande boucle extracellulaire, ECL3. Cette aptitude a été démontrée à la fois sur la protéine entière et sur le domaine isolé.

Les expériences sur la protéine entière ont été réalisées en présence de 0,1 % de CHAPS, détergent qui mime le cholestérol présent dans les membranes et permet une meilleure activité de fixation de la protéine, probablement en relation avec une meilleure conformation. Ces expériences ont également inclus la présence de mitoxantrone et doxorubicine. L'ajout de ces deux substrats d'ABCG2 permet la saturation théorique des sites internes de fixation, et donc *a priori* de mettre uniquement en évidence la fixation des porphyrines au niveau d'ECL3. Les résultats obtenus montrent qu'ABCG2 fixe effectivement l'hémine au niveau d'ECL3 avec un  $K_d$  de 0,2  $\mu\text{M}$ , mais qu'en revanche le phéophorbide a présente un  $K_d$  supérieur à 8  $\mu\text{M}$ , suggérant qu'il ne se fixerait pas dans des conditions physiologiques. Ces résultats sont confirmés sur le domaine produit isolé, puisqu'on retrouve une affinité médiocre pour le phéophorbide a ( $K_d$  de 3  $\mu\text{M}$ ) en comparaison de l'hémine ( $K_d$  de 0,5  $\mu\text{M}$ ).

Les tests de fixation réalisés avec d'autres composés porphyriques, d'autres substrats d'ABCG2, comme la mitoxantrone, la riboflavine ou la doxorubicine (qui se fixe à ABCG2 mais n'est transportée que par les mutants R482G/T (Pozza et al., 2006)) et des inhibiteurs de la protéine ont montré que la fixation au niveau d'ECL3 est spécifique aux porphyrines, et que les ligands préférentiels sont l'hème et l'hémine. En effet, ils présentent les meilleures affinités tant sur ECL3 isolé ( $K_d$  de 0,5 et 1  $\mu\text{M}$  respectivement) que sur la protéine complète et leur fixation est altérée par les mutations H583A et C603A, qui sont sans effet notable sur la liaison de la PPIX. Il semble donc qu'ABCG2 transporte indifféremment plusieurs types de porphyrines (Jonker et al., 2002 ; Krishnamurthy et al., 2004 ; Zhou et al., 2005) mais qu'elle ne les fixe pas toutes de la même manière sur ECL3. Cette sélectivité pourrait être liée à la toxicité de ces composés (Kumar et Bandyopadhyay, 2005), plus importante dans le cas des porphyrines métalliques (Tsiftoglou et al., 2006).

La boucle extracellulaire ECL3 est topologiquement située en aval des sites de transport et proche de ceux-ci, c'est-à-dire bien positionnée pour lier les porphyrines effluées,

malgré une affinité plutôt faible, de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . L'existence d'un site de fixation extracellulaire est *a priori* spécifique d'ABCG2, aucun autre transporteur ABC n'ayant été décrit chez l'homme pour posséder un tel site. Cette localisation particulière ainsi que la faible affinité observée laissent penser qu'ABCG2 pourrait posséder, en plus de sa fonction d'efflux, un rôle de délivrance de ces composés à une protéine tiers. Dans cette optique, nous avons montré que l'hémine liée à ECL3 est ensuite prise en charge par l'albumine humaine (HSA), dont le  $K_d$  de fixation de l'hémine est de  $10^{-8}$  M, 100 fois meilleur que celui d'ECL3 (Muller-Eberhard et Fraig, 1993). L'apoHSA est en effet capable de déplacer l'hémine fixée sur ECL3, par une interaction directe avec ABCG2 ( $K_d$  de 3,3  $\mu\text{M}$ ). On peut supposer que la rapidité du transfert de l'hémine entre les deux protéines *in vitro* est probablement proche des conditions physiologiques, car l'HSA est très abondante au niveau plasmatique (environ 40 g/L) (Silva et al., 2004). L'hémopexine est une autre protéine sérique pouvant être une bonne candidate pour une telle interaction. En effet, bien que présente en quantité plus faible dans le sérum, elle possède une affinité plus élevée que l'HSA pour l'hémine ( $K_d$  de  $10^{-12}$  M) (Delanghe et Langlois, 2001).

ABCG2 est connue pour participer à l'homéostasie des porphyrines en permettant leur efflux. Ce transport est décrit par les différents auteurs dans un contexte de détoxification des cellules différenciées (Jonker et al., 2002) et des cellules souches, particulièrement en condition d'hypoxie (Krishnamurthy et al., 2004 ; Zhou et al., 2005). Notre étude apporte un nouvel éclairage sur rôle d'ABCG2 dans ce contexte. En effet, elle permet de déterminer le devenir immédiat de ces molécules particulièrement toxiques après leur transport : elles seraient prises en charge au niveau extracellulaire par ECL3 puis transférées sur la HSA, protéine impliquée dans leur neutralisation (Grinberg et al., 1999). ABCG2 présenterait donc un double rôle dans l'homéostasie des porphyrines : 1/protection des cellules en limitant leur accumulation et 2/facilitation de leur dégradation par leur prise en charge par l'HSA. Malgré ces rôles importants, ABCG2 n'est indispensable ni à l'érythropoïèse normale, ni plus généralement à la survie de l'organisme, puisque les souris *Abcg2* *-/-* ne présentent pas de phénotype particulier dans des conditions normales (Zhou et al., 2001). Ceci pourrait s'expliquer par une compensation du rôle d'efflux de porphyrines par FLVCR, une autre protéine membranaire connue pour l'efflux d'hème (Quigley et al., 2004). ABCG2 et FLVCR seraient complémentaires, ABCG2 étant plus particulièrement présente dans les stades très précoces de l'hématopoïèse et protégeant plus particulièrement les cellules souches. De plus,



ABCG2 se distingue de FLVCR par la présence d'ECL3, qui pourrait permettre une implication d'ABCG2 dans certaines voies de signalisation.

En effet, l'hème et l'hémine interviennent dans différentes voies de signalisation, notamment dans la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire (Tsiftoglou et al., 2003 ; Fibach et al., 1995). De plus, il a été montré que l'albumine bovine favorise la différenciation cellulaire dépendante de l'hémine. On peut donc se demander dans quelle mesure ABCG2 participerait à ces phénomènes. Nos résultats vont dans le sens d'un partenariat entre ABCG2 et l'albumine, suggérant une implication possible d'ABCG2 dans la différenciation cellulaire. Or, les études précédemment rapportées indiquent un rôle d'ABCG2 dans le maintien du phénotype indifférencié des cellules souches (Zhou et al., 2001 ; Susanto et al., 2008). Il semble donc que la prise en charge de l'hémine par l'albumine soit, dans ce contexte, principalement dédiée à la détoxification. Il serait toutefois intéressant de réaliser des études dans le but de déterminer le rôle d'ABCG2 dans les différentes voies de signalisation liées à l'hémine.

ABCG2 a récemment été retrouvé dans la membrane interne de la mitochondrie (Solazzo et al., 2009). L'étude que nous avons menée sur des cellules K562 exprimant ou non ABCG2 n'a pas démontré la capacité de la protéine à effluer l'hème ou la PPIX vers le cytoplasme, ce qui suggère qu'ABCG2 n'est pas le transporteur responsable de la translocation de l'hème hors des mitochondries. Bien que Solazzo et ses collaborateurs aient observé un faible efflux de mitoxantrone hors des mitochondries exprimant ABCG2, la fonctionnalité d'ABCG2 dans cet organe reste controversée et aucune publication n'en a encore fait la démonstration formelle.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ouvrent de nouvelles perspectives de recherche sur ce nouveau rôle physiologique d'ABCG2, qui n'est plus seulement un transporteur capable d'effluer des porphyrines, mais aussi une protéine impliquée dans l'échange d'hème sur sa face extracellulaire. Ce travail ouvre de nombreuses pistes qui restent à être explorées. Tout d'abord, il serait intéressant de déterminer si l'hémopexine est également un partenaire d'ECL3 et si l'interaction entre ABCG2 et hémopexine est la même qu'entre ABCG2 et HSA. De plus, nous souhaiterions caractériser plus spécifiquement les régions et résidus impliqués dans l'échange de porphyrines entre les deux protéines. Ensuite, nous souhaiterions déterminer quel est le type de coordination de l'hème sur ECL3 et quels

sont ses ligands axiaux. Cette partie de l'étude se fera en collaboration avec un laboratoire spécialisé dans l'étude de l'hème. Ensuite, une étude de la fonctionnalité d'ABCG2 mutée au niveau d'ECL3 pourrait compléter de manière intéressante l'étude menée jusqu'ici. La protéine mutée pourrait être exprimée en cellules de mammifères et sa capacité à transporter différents substrats (et en particuliers les porphyrines), testée par cytométrie de flux. De plus, ces cellules exprimant ABCG2 mutée pourraient être utilisées dans l'étude de l'implication d'ABCG2 dans certaines voies de signalisation (notamment la croissance cellulaire). Enfin, il serait intéressant d'établir la structure tridimensionnelle du domaine.

# CONCLUSION



ABCG2 est impliquée dans la détoxification des cellules de l'organisme de molécules naturelles ou non. Sa capacité à transporter divers composés, dont des porphyrines, est connue depuis plusieurs années. Elle participe au maintien de l'homéostasie des porphyrines, molécules très toxiques lorsqu'elles sont libres en solution, et protège les cellules, en particulier les cellules souches hématopoïétiques. Notre étude s'est appuyée sur l'hypothèse d'un nouveau rôle physiologique possible d'ABCG2, qui serait sa capacité d'échange de porphyrines à un partenaire extracellulaire. Cette hypothèse impliquant que le transporteur lie les porphyrines dans sa région extracellulaire, accessible, nous nous sommes focalisés sur la plus grande des trois boucles de cette région, ECL3. Cette boucle, longue d'environ 70 résidus, a été étudiée à la fois seule et au sein de la protéine ABCG2 et a été produite à l'aide des systèmes d'expression en bactérie et en cellules d'insecte, respectivement. Les différentes protéines ont été purifiées par chromatographie d'affinité puis caractérisées dans un premier temps par différentes méthodes pour leur capacité de liaison de porphyrines. La recherche de partenaire réalisée par la suite a permis de mettre en évidence un échange de porphyrines avec l'albumine sérique humaine.

Nos résultats montrent qu'ABCG2 transporte l'hème et qu'ECL3 isolé lie plusieurs types de porphyrines, dont la protoporphyrine IX, la Zn-protoporphyrine, le phéophorbide a, l'hémine et l'hème, avec une différence toutefois dans les affinités pour ces différents composés, les  $K_d$  s'étendant de 0,5 à 3  $\mu\text{M}$ . L'hème semble être le ligand préférentiel, tandis que le phéophorbide a se fixe relativement mal. Ces résultats sont confirmés par les expériences réalisées sur la protéine entière, qui fixe l'hémine avec un  $K_d$  de 0,2  $\mu\text{M}$  mais fixe très mal le phéophorbide a ( $K_d > 8 \mu\text{M}$ ), suggérant que ce composé ne se fixe pas sur ECL3 dans des conditions physiologiques. Cette fixation sur ECL3 est spécifique de certains composés porphyriques, les autres substrats ou inhibiteurs d'ABCG2 testés ne présentant pas d'affinité pour le domaine.

Nous avons montré ensuite, sur ABCG2 et le domaine ECL3 isolé, que l'hémine fixée au niveau extracellulaire est transférée sur l'albumine sérique humaine. Cet échange a pu être mis en évidence par spectrofluorimétrie cinétique et spectrophotométrie. Il est réalisé rapidement entre les deux protéines, par interaction directe entre ABCG2 et l'HSA, avec un  $K_d$  d'interaction de  $3,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$ . Néanmoins, l'HSA n'est peut être pas la seule protéine à interagir avec ABCG2 et un possible échange de porphyrines avec l'hémopexine reste à déterminer.

Notre étude a permis de mettre en évidence un nouveau rôle d'ABCG2 dans le maintien de l'homéostasie des porphyrines, en démontrant que cette protéine non seulement

transporte des porphyrines, mais les fixe également sur sa région extracellulaire et facilite leur prise en charge par l'HSA, protéine impliquée dans leur détoxication.

## **REFERENCES**





Abraham NG, Kappas A. (2005) "Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system.", *Free Radic Biol Med.*, **39**, 1-25.

Ahmad I, Das AV, James J, Bhattacharya S, Zhao X. (2004) "Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation.", *Semin Cell Dev Biol.*, **15**, 53-62.

Ahmed F, Arseni N, Glimm H, Hiddemann W, Buske C, Feuring-Buske M. (2008) "Constitutive expression of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 enhances the growth potential of early human hematopoietic progenitors.", *Stem Cells*, **26**, 810-8.

Ahmed-Belkacem A, Pozza A, Muñoz-Martínez F, Bates SE, Castanys S, Gamarro F, Di Pietro A, Pérez-Victoria JM. (2005) "Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2.", *Cancer Res.*, **65**, 4852-60.

Ajioka RS, Phillips JD, Kushner JP. (2006) "Biosynthesis of heme in mammals.", *Biochim Biophys Acta.*, **1763**, 723-36.

Alfaras I, Pérez M, Juan ME, Merino G, Prieto JG, Planas JM, Alvarez AI. (2010) "Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP1/ABCG2) in the bioavailability and tissue distribution of trans-resveratrol in knockout mice.", *J Agric Food Chem.*, **58**, 4523-8.

Allen JD, van Loevezijn A, Lakhai JM, van der Valk M, van Tellingen O, Reid G, Schellens JH, Koomen GJ, Schinkel AH. (2002) "Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C.", *Mol Cancer Ther.*, **1**, 417-25.

Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL, Chang G. (2009) "Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding.", *Science*, **323**, 1718-22.

Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M. (1998) "A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance.", *Cancer Res.*, **58**, 5337-9.

Allouche M, Bettaieb A, Vindis C, Rouse A, Grignon C, Laurent G. (1997) "Influence of Bcl-2 overexpression on the ceramide pathway in daunorubicin-induced apoptosis of leukemic cells.", *Oncogene.*, **14**, 1837-45.

An Y, Ongkeko WM. (2009) "ABCG2: the key to chemoresistance in cancer stem cells?", *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, **5**, 1529-42.

Austin CP, Feldman DE, Ida JA Jr, Cepko CL. (1995) "Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch.", *Development.*, **121**, 3637-50.

Azuma M, Kabe Y, Kuramori C, Kondo M, Yamaguchi Y, Handa H. (2008) "Adenine nucleotide translocator transports haem precursors into mitochondria.", *PLoS One.*, **3**, 3070.

- Bäckström G, Taipalensuu J, Melhus H, Brändström H, Svensson AC, Artursson P, Kindmark A. (2003) "Genetic variation in the ATP-binding cassette transporter gene ABCG2 (BCRP) in a Swedish population.", *Eur J Pharm Sci.*, **18**, 359-64.
- Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS, Vercellotti GM. (2000) "Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants.", *Blood*, **95**, 3442-50.
- Beaven GH, Chen SH, d' Albis A, Gratzer WB. (1974) "A spectroscopic study of the haemin-human-serum-albumin system.", *Eur J Biochem.*, **41**, 539-46.
- Begley DJ. (2004) "ABC transporters and the blood-brain barrier.", *Curr Pharm Des.*, **10**, 1295-312.
- Benito A, Silva M, Grillot D, Nuñez G, Fernández-Luna JL. (1996) "Apoptosis induced by erythroid differentiation of human leukemia cell lines is inhibited by Bcl-XL.", *Blood.*, **87**, 3837-43.
- Béroud C, Soussi T. (1998) "p53 gene mutation: software and database.", *Nucleic Acids Res.*, **26**, 200-4.
- Bhaskaran M, Reddy K, Radhakrishanan N, Franki N, Ding G, Singhal PC. (2003) "Angiotensin II induces apoptosis in renal proximal tubular cells.", *Am J Physiol Renal Physiol.*, **284**, 955-65.
- Bhattacharya S, Das A, Mallya K, Ahmad I. (2007) "Maintenance of retinal stem cells by Abcg2 is regulated by notch signaling.", *J Cell Sci.*, **120**, 2652-62.
- Biedler JL, Riehm H. (1970) "Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies.", *Cancer Res.* **30**, 1174-84.
- Bosch TM, Kjellberg LM, Bouwers A, Koeleman BP, Schellens JH, Beijnen JH, Smits PH, Meijerman I. (2005) "Detection of single nucleotide polymorphisms in the ABCG2 gene in a Dutch population.", *Am J Pharmacogenomics.*, **5**, 123-31.
- Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Ozcürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. (1999) "The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease.", *Nat Genet.*, **22**, 347-51.
- Braestrup C, Squires RF. (1977) "Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **74**, 3805-9.
- Brazzelli V, Prestinari F, Barbagallo T, Rona C, Orlandi E, Passamonti F, Locatelli F, Zecca M, Villani S, Borroni G. (2007) "A long-term time course of colorimetric assessment of the effects of imatinib mesylate on skin pigmentation: a study of five patients.", *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, **21**, 384-7.

- Breedveld P, Pluim D, Cipriani G, Wielinga P, van Tellingen O, Schinkel AH, Schellens JH. (2005) "The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of imatinib mesylate (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of imatinib in patients.", *Cancer Res.*, **65**, 2577-82.
- Bunn HF, Jandl JH. (1968) "Exchange of heme among hemoglobins and between hemoglobin and albumin.", *J Biol Chem.*, **243**, 465-75.
- Bunting KD. (2002) "ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells.", *Stem Cells.*, **20**, 11-20.
- Burger H, Nooter K, Boersma AW, van Wingerden KE, Looijenga LH, Jochemsen AG, Stoter G. (1999) "Distinct p53-independent apoptotic cell death signalling pathways in testicular germ cell tumour cell lines.", *Int J Cancer.*, **81**, 620-8.
- Bush JA, Li G. (2002) "Regulation of the Mdr1 isoforms in a p53-deficient mouse model.", *Carcinogenesis.*, **23**, 1603-7.
- Challen GA, Little MH. (2006) "A side order of stem cells: the SP phenotype.", *Stem Cells.*, **24**, 3-12.
- Chami M, Steinfels E, Orelle C, Jault JM, Di Pietro A, Rigaud JL, Marco S. (2002) "Three-dimensional structure by cryo-electron microscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*.", *J Mol Biol.*, **315**, 1075-85.
- Chaney SG, Sancar A. (1996) "DNA repair: enzymatic mechanisms and relevance to drug response.", *J Natl Cancer Inst.*, **88**, 1346-60.
- Chaudhary PM, Roninson IB. (1991) "Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells.", *Cell.*, **66**, 85-94.
- Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. (1990) "Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins.", *J Biol Chem.*, **265**, 506-14.
- Chen JJ, London IM. (1981) "Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes.", *Cell.*, **26**, 117-22.
- Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, Quijcho FA. (2003) "A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle.", *Mol Cell.*, **12**, 651-61.
- Chou AC, Fitch CD. (1981) "Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX.", *J Clin Invest.*, **68**, 672-7.
- Chow JM, Huang GC, Lin HY, Shen SC, Yang LY, Chen YC. (2008) "Cytotoxic effects of metal protoporphyrins in glioblastoma cells: roles of albumin, reactive oxygen species, and heme oxygenase-1.", *Toxicol Lett.*, **177**, 97-107.

- Chu G. (1994) "Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair.", *J Biol Chem.*, **269**, 787-90.
- Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivotto M. (1993) "The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells.", *Blood.*, **82**, 2031-7.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. (1992) "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line.", *Science*, **258**, 1650-4.
- Cooray HC, Blackmore CG, Maskell L, Barrand MA. (2002) "Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain.", *Neuroreport.*, **13**, 2059-63.
- Csere P, Lill R, Kispal G. (1998) "Identification of a human mitochondrial ABC transporter, the functional orthologue of yeast Atm1p.", *FEBS Lett.*, **441**, 266-70.
- Cygalova L, Ceckova M, Pavek P, Staud F. (2008) "Role of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in fetal protection during gestation in rat.", *Toxicol Lett.*, **178**, 176-80.
- Dalmas O, Orelle C, Foucher AE, Geourjon C, Crouzy S, Di Pietro A, Jault JM. (2005) "The Q-loop disengages from the first intracellular loop during the catalytic cycle of the multidrug ABC transporter BmrA.", *J Biol Chem.*, **280**, 36857-64.
- Dassa E, Bouige P. (2001) "The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms.", *Res Microbiol.*, **152**, 211-29.
- Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J. (2008) "Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems.", *Microbiol Mol Biol Rev.*, **72**, 317-64.
- Dawson RJ, Locher KP. (2006) "Structure of a bacterial multidrug ABC transporter.", *Nature*, **443**, 180-5.
- Dawson RJ, Locher KP. (2007) "Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP.", *FEBS Lett.*, **581**, 935-8.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G. (2001) "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.", *J Lipid Res.*, **42**, 1007-17.
- De Bruin M, Miyake K, Litman T, Robey R, Bates SE. (1999) "Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR.", *Cancer Lett.*, **146**, 117-26.
- De Jong FA, Marsh S, Mathijssen RH, King C, Verweij J, Sparreboom A, McLeod HL. (2004) "ABCG2 pharmacogenetics: ethnic differences in allele frequency and assessment of influence on irinotecan disposition.", *Clin Cancer Res.*, **10**, 5889-94.
- Delanghe JR, Langlois MR. (2001) "Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine.", *Clin Chim Acta.*, **312**, 13-23.

- Dezi M, Fribourg PF, Di Cicco A, Arnaud O, Marco S, Falson P, Di Pietro A, Lévy D (2010) “The multidrug resistance half-transporter ABCG2 is purified as a tetramer upon selective extraction from membranes.”, *Biochim Biophys Acta.*, Aug 4.
- Diestra JE, Scheffer GL, Català OI, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, Germà-Lluch JR, Izquierdo MA. (2002) “Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material.”, *J Pathol.*, **198**, 213-9.
- Ding XW, Wu JH, Jiang CP. (2010) “ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy.”, *Life Sci.*, **86**, 631-7.
- Diop NK, Hrycyna CA. (2005) “N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane.”, *Biochemistry*, **44**, 5420-9.
- Dockal M, Carter DC, Rüker F. (1999) “The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties.”, *J Biol Chem.*, **274**, 29303-10.
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. (1998) “A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells.”, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**, 15665-70.
- Doyle LA, Ross DD. (2003) “Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2).””, *Oncogene*, **22**, 7340-58.
- Durand RE. (2001) “Intermittent blood flow in solid tumours--an under-appreciated source of 'drug resistance'.”, *Cancer Metastasis Rev.* **20**, 57-61.
- Endo T, Ishibashi Y, Shiokawa S, Fukumaki Y, Okano H. (1994) “Differential induction of adult and fetal globin gene expression in the human CML cell subline KU-812F/33.”, *J Biochem.*, **115**, 540-4.
- Erlichman C, Boerner SA, Hallgren CG, Spieker R, Wang XY, James CD, Scheffer GL, Maliepaard M, Ross DD, Bible KC, Kaufmann SH. (2002) “The HER tyrosine kinase inhibitor CI1033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux.”, *Cancer Res.*, **61**, 739-48.
- Falson P, Penin F, Divita G, Lavergne JP, Di Pietro A, Goody RS, Gautheron DC. (1993) “Functional nucleotide-binding domain in the F0F1-ATP synthase alpha subunit from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.”, *Biochemistry*, **32**, 10387-97.
- Faneyte IF, Kristel PM, Maliepaard M, Scheffer GL, Scheper RJ, Schellens JH, van de Vijver MJ. (2002) “Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer.”, *Clin Cancer Res.*, **8**, 1068-74.
- Fibach E, Kollia P, Schechter AN, Noguchi CT, Rodgers GP. (1995) “Hemin-induced acceleration of hemoglobin production in immature cultured erythroid cells: preferential enhancement of fetal hemoglobin.”, *Blood.*, **85**, 2967-74.

Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ, Scheper RJ. (1996) "Tissue distribution of the multidrug resistance protein.", *Am J Pathol.*, **148**, 1237-47.

Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A, Nakagawa H, Morishima Y, Osawa Y, Ishikawa T. (2009) "Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations.", *Pharm Res.*, **26**, 469-79.

Furuya KN, Bradley G, Sun D, Schuetz EG, Schuetz JD. (1997) "Identification of a new P-glycoprotein-like ATP-binding cassette transporter gene that is overexpressed during hepatocarcinogenesis.", *Cancer Res.*, **57**, 3708-16.

Gaudet R, Wiley DC. (2001) "Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing.", *EMBO J.*, **20**, 4964-72.

González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. (2009) "Lactoferrin: structure, function and applications.", *Int J Antimicrob Agents.*, **33**, 301-8.

Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. (2010) "Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1.", *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **50**, 323-54.

Grinberg LN, O'Brien PJ, Hrkal Z. (1999) "The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalytic activities of hemin.", *Free Radic Biol Med.*, **27**, 214-9.

Gusella JF, Weil SC, Tsiftoglou AS, Volloch V, Neumann JR, Keys C, Housman DE. (1980) "Hemin does not cause commitment of murine erythroleukemia (MEL) cells to terminal differentiation.", *Blood.*, **56**, 481-7.

Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. (1999) "Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation.", *Nature.*, **401**, 390-4.

Gutteridge JM, Smith A. (1988) "Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation.", *Biochem J.*, **256**, 861-5.

Hao XY, Bergh J, Brodin O, Hellman U, Mannervik B. (1994) "Acquired resistance to cisplatin and doxorubicin in a small cell lung cancer cell line is correlated to elevated expression of glutathione-linked detoxification enzymes.", *Carcinogenesis.*, **15**, 1167-73.

Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M. (1999) "Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme.", *Circ Res.*, **85**, 663-71.

Hazai E, Bikádi Z. (2008) "Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2).", *J Struct Biol.*, **162**, 63-74.

Henriksen U, Fog JU, Litman T, Gether U. (2005) "Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2.", *J Biol Chem.*, **280**, 36926-34.

Higgins CF, Linton KJ. (2004) "The ATP switch model for ABC transporters.", *Nat Struct Mol Biol.*, **11**, 918-26.

Hirsch-Ernst KI, Gaini-Rahimi S, Ernst BP, Schmitz-Salue C, Blume S, Kahl GF. (1998) "Molecular cDNA cloning and tissue distribution of mRNA encoding a novel ATP-binding cassette (ABC) half-transporter.", *Biochem Biophys Res Commun.*, **249**, 151-5.

Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Pérez WY, Robey RW, van de Laar A, Litman T, Dean M, Bates SE. (2001) "Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells.", *Cancer Res.*, **61**, 6635-9.

Hsiung Y, Jannatipour M, Rose A, McMahon J, Duncan D, Nitiss JL. (1996) "Functional expression of human topoisomerase II alpha in yeast: mutations at amino acids 450 or 803 of topoisomerase II alpha result in enzymes that can confer resistance to anti-topoisomerase II agents.", *Cancer Res.*, **56**, 91-9.

Hulspas R, Quesenberry PJ. (2000) "Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry.", *Cytometry.*, **40**, 245-50.

Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF, Kim SH. (1998) "Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter.", *Nature*, **396**, 703-7.

Imai Y, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. (2002) "Estrone and 17beta-estradiol reverse breast cancer resistance protein-mediated multidrug resistance.", *Jpn J Cancer Res.*, **93**, 231-5.

Imai Y, Asada S, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. (2003) "Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens.", *Mol Pharmacol.*, **64**, 610-8.

Itoda M, Saito Y, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S, Sawada J (2003) "Eight novel single nucleotide polymorphisms in ABCG2/BCRP in Japanese cancer patients administered irinotecan.", *Drug Metab Pharmacokinet.*, **18**, 212-7.

Jackson KA, Mi T, Goodell MA. (1999) "Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **96**, 14482-6.

Jadhav AP, Cho SH, Cepko CL. (2006) "Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property.", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18998-9003.

Jensen FB. (2009) "The dual roles of red blood cells in tissue oxygen delivery: oxygen carriers and regulators of local blood flow.", *J Exp Biol.*, **212**, 3387-93.

Jitsukawa K, Suizu R, Hidano A. (1984) "Chlorella photosensitization. New phytophotodermatitis.", *Int J Dermatol.*, **23**, 263-8.

Jones PM, George AM. (2002) "Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 12639-44.

- Jonker JW, Smit JW, Brinkhuis RF, Maliepaard M, Beijnen JH, Schellens JH, Schinkel AH. (2000) "Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan.", *J Natl Cancer Inst.*, **92**, 1651-6.
- Jonker JW, Buitelaar M, Wagenaar E, Van Der Valk MA, Scheffer GL, Scheper RJ, Plosch T, Kuipers F, Elferink RP, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH (2002) "The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 15649-54.
- Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, Mesman E, Dale TC, Schinkel AH. (2005) "The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk.", *Nat Med.*, **11**, 127-9.
- Jonker JW, Musters S, Vlaming ML, Plösch T, Gooijert KE, Hillebrand MJ, Rosing H, Beijnen JH, Verkade HJ, Schinkel AH. (2007) "Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) is expressed in the harderian gland and mediates transport of conjugated protoporphyrin IX.", *Am J Physiol Cell Physiol.*, **292**, 2204-12.
- Juliano RL, Ling V. (1976) "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants.", *Biochim Biophys Acta.*, **455**, 152-62.
- Kaasik K, Lee CC. (2004) "Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals.", *Nature*, **430**, 467-71.
- Kage K, Tsukahara S, Sugiyama T, Asada S, Ishikawa E, Tsuruo T, Sugimoto Y. (2002) "Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization.", *Int J Cancer*, **97**, 626-30.
- Kage K, Fujita T, Sugimoto Y. (2005) "Role of Cys-603 in dimer/oligomer formation of the breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2.", *Cancer Sci.*, **96**, 866-72.
- Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, Thomas PJ, Hunt JF. (2001) "Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter.", *Structure*, **9**, 571-86.
- Keel SB, Doty RT, Yang Z, Quigley JG, Chen J, Knoblaugh S, Kingsley PD, De Domenico I, Vaughn MB, Kaplan J, Palis J, Abkowitz JL. (2008) "A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis.", *Science*, **319**, 825-8.
- Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. (2005) "Heme oxygenase and heme degradation. ", *Biochem Biophys Res Commun.*, **338**, 558-67.
- Klein I, Sarkadi B, Váradi A. (1999) "An inventory of the human ABC proteins.", *Biochim Biophys Acta.*, **1461**, 237-62.
- Kobayashi D, Ieiri I, Hirota T, Takane H, Maegawa S, Kigawa J, Suzuki H, Nanba E, Oshimura M, Terakawa N, Otsubo K, Mine K, Sugiyama Y. (2005) "Functional assessment of ABCG2 (BCRP) gene polymorphisms to protein expression in human placenta.", *Drug Metab Dispos.*, **33**, 94-101.



- Köhne CH, Peters GJ. (2000) "UFT: mechanism of drug action.", *Oncology*, **14**, 13-8.
- Koller ME, Romslo I. (1978) "Studies on the uptake of porphyrin by isolated rat liver mitochondria.", *Biochim Biophys Acta.*, **503**, 238-50.
- Koller ME. (1979) "Studies on the uptake of porphyrin by isolated rat liver mitochondria with particular emphasis on the effect of heme.", *FEBS Lett.*, **100**, 47-51.
- Kos V, Ford RC. (2009) "The ATP-binding cassette family: a structural perspective.", *Cell Mol Life Sci.*, **66**, 3111-26.
- Köster W. (2001) "ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12.", *Res Microbiol.*, **152**, 291-301.
- Krishnamurthy P, Ross DD, Nakanishi T, Bailey-Dell K, Zhou S, Mercer KE, Sarkadi B, Sorrentino BP, Schuetz JD. (2004) "The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme.", *J Biol Chem.*, **279**, 24218-25.
- Krishnamurthy P, Schuetz JD. (2005) "The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival.", *Biomaterials*, **18**, 349-58.
- Krishnamurthy PC, Du G, Fukuda Y, Sun D, Sampath J, Mercer KE, Wang J, Sosa-Pineda B, Murti KG, Schuetz JD. (2006) "Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter.", *Nature.*, **443**, 586-9.
- Krishnamurthy P, Schuetz JD. (2006) "Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine.", *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **46**, 381-410.
- Krishnamurthy P, Xie T, Schuetz JD. (2007) "The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis.", *Pharmacol Ther.*, **114**, 345-58.
- Kumar S, Bandyopadhyay U. (2005) "Free heme toxicity and its detoxification systems in human.", *Toxicol Lett.*, **157**, 175-88.
- Kuzelová K, Mrhalová M, Hrkal Z. (1997) "Kinetics of heme interaction with heme-binding proteins: the effect of heme aggregation state.", *Biochim Biophys Acta.*, **1336**, 497-501.
- Labbe RF, Rettmer RL. (1989) "Zinc protoporphyrin: a product of iron-deficient erythropoiesis.", *Semin Hematol.*, **26**, 40-6.
- Lacapère JJ, Papadopoulos V. (2003) "Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis.", *Steroids*, **68**, 569-85.
- Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. (1998) "Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice.", *Reprod Toxicol.*, **12**, 457-63.
- Latunde-Dada GO, Simpson RJ, McKie AT. (2006) "Recent advances in mammalian haem transport.", *Trends Biochem Sci.*, **31**, 182-8.

Lavi A, Weitman H, Holmes RT, Smith KM, Ehrenberg B. (2002) "The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency.", *Biophys J.*, **82**, 2101-10.

Leier I, Jedlitschky G, Büchler M, Buchholz U, Brom M, Keppler D. (1996) "Identification of the biosynthetic leukotriene C4 export pump in murine mastocytoma cells as a homolog of the multidrug-resistance protein.", *Eur J Biochem.*, **242**, 201-5.

Leimanis ML, Georges E. (2007) "ABCG2 membrane transporter in mature human erythrocytes is exclusively homodimer.", *Biochem Biophys Res Commun.*, **354**, 345-50.

Letarte PB, Lieberman K, Nagatani K, Haworth RA, Odell GB, Duff TA. (1993) "Hemin: levels in experimental subarachnoid hematoma and effects on dissociated vascular smooth-muscle cells.", *J Neurosurg.*, **79**, 252-5.

Levine AJ. (1997) "p53, the cellular gatekeeper for growth and division.", *Cell.*, **88**, 323-31.

Linton KJ, Higgins CF. (1998) "The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins.", *Mol Microbiol.*, **28**, 5-13

Liu Y, Yang Y, Qi J, Peng H, Zhang JT. (2008) "Effect of cysteine mutagenesis on the function and disulfide bond formation of human ABCG2.", *J Pharmacol Exp Ther.*, **326**, 33-40.

Locher KP, Lee AT, Rees DC. (2002) "The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism.", *Science*, **296**, 1091-8.

Loe DW, Oleschuk CJ, Deeley RG, Cole SP. (2000) "Structure-activity studies of verapamil analogs that modulate transport of leukotriene C(4) and reduced glutathione by multidrug resistance protein MRP1.", *Biochem Biophys Res Commun.*, **275**, 795-803.

Longley DB, Latif T, Boyer J, Allen WL, Maxwell PJ, Johnston PG. (2003) "The interaction of thymidylate synthase expression with p53-regulated signaling pathways in tumor cells.", *Semin Oncol.* **30**, 3-9.

Löscher W. (2005) "Mechanisms of drug resistance.", *Epileptic Disord., Suppl 1*:S3-9.

Lynch J, Fukuda Y, Krishnamurthy P, Du G, Schuetz JD. (2009) "Cell survival under stress is enhanced by a mitochondrial ATP-binding cassette transporter that regulates hemoproteins.", *Cancer Res.*, **69**, 5560-7.

Makin G, Dive C. (2001) "Modulating sensitivity to drug-induced apoptosis: the future for chemotherapy?", *Breast Cancer Res.*, **3**, 150-3.

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. (2001) "Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues.", *Cancer Res.*, **61**, 3458-64.

Martin C, Berridge G, Mistry P, Higgins C, Charlton P, Callaghan R. (2000) "Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis.", *Biochemistry*, **39**, 11901-6.

Martin CM, Ferdous A, Gallardo T, Humphries C, Sadek H, Caprioli A, Garcia JA, Szweda LI, Garry MG, Garry DJ. (2008) "Hypoxia-inducible factor-2alpha transactivates Abcg2 and promotes cytoprotection in cardiac side population cells.", *Circ Res.*, **102**, 1075-81.

Matar-MerhebR, Rhimi M, Leydier A, Huché F, Galián C, Desuzinges-Mandon E, Ficheux D, Flot D, Aghajari N, Kahn R, Di Pietro A, Jault JM, Coleman AW and Falson P (2010) "Structuring -Detergents for Extracting Functional Membrane Proteins", *Nat. Com.*, en revision.

McDevitt CA, Collins RF, Conway M, Modok S, Storm J, Kerr ID, Ford RC, Callaghan R. (2006) "Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2.", *Structure*, **14**, 1623-32.

McFadyen MC, Cruickshank ME, Miller ID, McLeod HL, Melvin WT, Haites NE, Parkin D, Murray GI. (2001) "Cytochrome P450 CYP1B1 over-expression in primary and metastatic ovarian cancer.", *Br J Cancer.* **85**, 242-6.

Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. (2009) "Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease.", *Nat Rev Cancer.* **9**, 665-74.

Merino G, Jonker JW, Wagenaar E, van Herwaarden AE, Schinkel AH. (2005) "The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin.", *Mol Pharmacol.*, **67**, 1758-64.

Merino G, Alvarez AI, Pulido MM, Molina AJ, Schinkel AH, Prieto JG. (2006) "Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion.", *Drug Metab Dispos.*, **34**, 690-5.

Miroux B, Walker JE. (1996) "Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels.", *J Mol Biol.*, **260**, 289-98.

Mitsubishi N, Miki T, Senbongi H, Yokoi N, Yano H, Miyazaki M, Nakajima N, Iwanaga T, Yokoyama Y, Shibata T, Seino S. (2000) "MTABC3, a novel mitochondrial ATP-binding cassette protein involved in iron homeostasis.", *J Biol Chem.*, **275**, 17536-40.

Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R, Cristensen B, Brangi M, Greenberger L, Dean M, Fojo T, Bates SE. (1999) "Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes.", *Cancer Res.*, **59**, 8-13.

Mizuarai S, Aozasa N, Kotani H. (2004) "Single nucleotide polymorphisms result in impaired membrane localization and reduced atpase activity in multidrug transporter ABCG2.", *Int J Cancer.*, **109**, 238-46.

Mohrmann K, van Eijndhoven MA, Schinkel AH, Schellens JH. (2005) "Absence of N-linked glycosylation does not affect plasma membrane localization of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2).", *Cancer Chemother Pharmacol.*, **56**, 344-50.

Monette FC, Holden SA, Sheehy MJ, Matzinger EA. (1984) "Specificity of hemein action in vivo at early stages of hematopoietic cell differentiation.", *Exp Hematol.*, **12**, 782-7.

Morgan WT, Liem HH, Sutor RP, Muller-Eberhard U. (1976) "Transfer of heme from heme-albumin to hemopexin.", *Biochim Biophys Acta.*, **444**, 435-45.

Morgan J, Jackson JD, Zheng X, Pandey SK, Pandey RK. (2010) "Substrate specificity of photosensitizers derived from chlorophyll-a: The ABCG2 transporter affects the phototoxic response of side population stem cell-like cancer cells to photodynamic therapy.", *Mol Pharm.*, Aug 4.

Muller-Eberhard U, Fraig M. (1993) "Bioactivity of heme and its containment.", *Am J Hematol.*, **42**, 59-62.

Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT (1997) "Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1.", *Cancer Res.* **57**, 3026-31.

Nagata K, Nishitani M, Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Ueda K. (2000) "Nonequivalent nucleotide trapping in the two nucleotide binding folds of the human multidrug resistance protein MRP1.", *J Biol Chem.*, **275**, 17626-30.

Nakagawa H, Tamura A, Wakabayashi K, Hoshijima K, Komada M, Yoshida T, Kometani S, Matsubara T, Mikuriya K, Ishikawa T. (2008) "Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonymous SNP variants of human ABC transporter ABCG2.", *Biochem J.*, **411**, 623-31.

Nakamura Y, Oka M, Soda H, Shiozawa K, Yoshikawa M, Itoh A, Ikegami Y, Tsurutani J, Nakatomi K, Kitazaki T, Doi S, Yoshida H, Kohno S. (2005) "Gefitinib ("Iressa", ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, reverses breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated drug resistance.", *Cancer Res.*, **65**, 1541-6.

Nath KA, Balla J, Croatt AJ, Vercellotti GM. (1995) "Heme protein-mediated renal injury: a protective role for 21-aminosteroids in vitro and in vivo.", *Kidney Int.*, **47**, 592-602.

Nath KA, Grande JP, Haggard JJ, Croatt AJ, Katusic ZS, Solovey A, Hebbel RP. (2001) "Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease.", *Am J Pathol.*, **158**, 893-903.

Ni Z, Mark ME, Cai X, Mao Q. (2010) "Fluorescence resonance energy transfer (FRET) analysis demonstrates dimer/oligomer formation of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in intact cells.", *Int J Biochem Mol Biol.*, **1**, 1-11.

Nitiss JL, Vilalta PM, Wu H, McMahon J. (1994) "Mutations in the gyrB domain of eukaryotic topoisomerase II can lead to partially dominant resistance to etoposide and amsacrine.", *Mol Pharmacol.*, **46**, 773-7.

- Orelle C, Gubellini F, Durand A, Marco S, Lévy D, Gros P, Di Pietro A, Jault JM. (2008) “Conformational change induced by ATP binding in the multidrug ATP-binding cassette transporter BmrA.”, *Biochemistry*, **47**, 2404-12.
- Ozvegy-Laczka C, Várady G, Köblös G, Ujhelly O, Cervenak J, Schuetz JD, Sorrentino BP, Koomen GJ, Váradi A, Németh K, Sarkadi B. (2005) “Function-dependent conformational changes of the ABCG2 multidrug transporter modify its interaction with a monoclonal antibody on the cell surface.”, *J Biol Chem.*, **280**, 4219-27.
- Ozvegy-Laczka C, Laczkó R, Hegedus C, Litman T, Várady G, Goda K, Hegedus T, Dokholyan NV, Sorrentino BP, Váradi A, Sarkadi B. (2008) “Interaction with the 5D3 monoclonal antibody is regulated by intramolecular rearrangements but not by covalent dimer formation of the human ABCG2 multidrug transporter.”, *J Biol Chem.*, **283**, 26059-70.
- Paoli M, Anderson BF, Baker HM, Morgan WT, Smith A, Baker EN. (1999) “Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains.”, *Nat Struct Biol.*, **6**, 926-31.
- Paterson JK, Shukla S, Black CM, Tachiwada T, Garfield S, Wincovitch S, Ernst DN, Agadir A, Li X, Ambudkar SV, Szakacs G, Akiyama S, Gottesman MM. (2007) “Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane.”, *Biochemistry*, **46**, 9443-52.
- Peters WH, Roelofs HM. (1992) “Biochemical characterization of resistance to mitoxantrone and adriamycin in Caco-2 human colon adenocarcinoma cells: a possible role for glutathione S-transferases.”, *Cancer Res.*, **52**, 1886-90.
- Polgar O, Robey RW, Morisaki K, Dean M, Michejda C, Sauna ZE, Ambudkar SV, Tarasova N, Bates SE. (2004) “Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif.”, *Biochemistry*, **43**, 9448-56.
- Polgar O, Ierano C, Tamaki A, Stanley B, Ward Y, Xia D, Tarasova N, Robey RW, Bates SE. (2010) “Mutational analysis of threonine 402 adjacent to the GXXXG dimerization motif in transmembrane segment 1 of ABCG2.”, *Biochemistry*, **49**, 2235-45.
- Pozza A, Perez-Victoria JM, Sardo A, Ahmed-Belkacem A, Di Pietro A. (2006) “Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482.”, *Cell Mol Life Sci.*, **63**, 1912-22.
- Quigley JG, Burns CC, Anderson MM, Lynch ED, Sabo KM, Overbaugh J, Abkowitz JL. (2000) “Cloning of the cellular receptor for feline leukemia virus subgroup C (FeLV-C), a retrovirus that induces red cell aplasia.”, *Blood*, **95**, 1093-9.
- Quigley JG, Yang Z, Worthington MT, Phillips JD, Sabo KM, Sabath DE, Berg CL, Sassa S, Wood BL, Abkowitz JL. (2004) “Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis.”, *Cell.*, **118**, 757-66.
- Rabindran SK, He H, Singh M, Brown E, Collins KI, Annable T, Greenberger LM. (1998) “Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C.”, *Cancer Res.*, **58**, 5850-8.

Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, Harris JW. (1994) "Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8.", *Cancer Res.* **54**, 5543-6.

Rajagopal A, Simon SM. (2003) "Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins.", *Mol Biol Cell.*, **14**, 3389-99.

Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, Uhm S, Mathew MK, Fleming MD, Paw BH, Krause M, Hamza I. (2008) "Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins.", *Nature.*, **453**, 1127-31.

Ricchelli F, Gobbo S, Jori G, Salet C, Moreno G. (1995) "Temperature-induced changes in fluorescence properties as a probe of porphyrin microenvironment in lipid membranes. 2. The partition of hematoporphyrin and protoporphyrin in mitochondria.", *Eur J Biochem.*, **233**, 165-70.

Robey RW, Medina-Pérez WY, Nishiyama K, Lahusen T, Miyake K, Litman T, Senderowicz AM, Ross DD, Bates SE. (2001) "Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells.", *Clin Cancer Res.*, **7**, 145-52.

Robey RW, Honjo Y, Morisaki K, Nadjem TA, Runge S, Risbood M, Poruchynsky MS, Bates SE. (2003) "Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity.", *Br J Cancer.*, **89**, 1971-8.

Robey RW, Steadman K, Polgar O, Morisaki K, Blayney M, Mistry P, Bates SE. (2004) "Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition.", *Cancer Res.*, **64**, 1242-6.

Rocchi E, Khodjakov A, Volk EL, Yang CH, Litman T, Bates SE, Schneider E. (2000) "The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane.", *Biochem Biophys Res Commun.*, **271**, 42-6.

Rosell R, Taron M, Ariza A, Barnadas A, Mate JL, Reguart N, Margel M, Felip E, Méndez P, García-Campelo R. (2004) "Molecular predictors of response to chemotherapy in lung cancer.", *Semin Oncol.*, **31**, 20-7.

Rosenberg MF, Velarde G, Ford RC, Martin C, Berridge G, Kerr ID, Callaghan R, Schmidlin A, Wooding C, Linton KJ, Higgins CF. (2001) "Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle.", *EMBO J.*, **20**, 5615-25.

Rosenberg MF, Bikadi Z, Chan J, Liu X, Ni Z, Cai X, Ford RC, Mao Q. (2010) "The human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) shows conformational changes with mitoxantrone.", *Structure*, **18**, 482-93.

Rosenfeld M, Surgenor DM. (1952) "The hematin-binding reaction as a basis for serum albumin determination.", *J Biol Chem.*, **199**, 911-21.

- Ross J, Sautner D. (1976) "Induction of globin mRNA accumulation by hemin in cultured erythroleukemic cells.", *Cell.*, **8**, 513-20.
- Rousselot P, Larghero J, Raffoux E, Calvo F, Tulliez M, Giraudier S, Rybojad M. (2003) "Photosensitization in chronic myelogenous leukaemia patients treated with imatinib mesylate.", *Br J Haematol.*, **120**, 1091-2.
- Rund D, Fibach E, Goldfarb A, Friedberg A, Rachmilewitz E. (1998) "Heme arginate therapy for beta thalassemia: in vitro versus in vivo effects.", *Acta Haematol.*, **100**, 82-4.
- Russ WP, Engelman DM. (2002) "The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association.", *J Mol Biol.*, **296**, 911-9.
- Rutherford TR, Harrison PR. (1979) "Globin synthesis and erythroid differentiation in a Friend cell variant deficient in heme synthesis.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **76**, 5660-4.
- Ryter SW, Tyrrell RM. (2000) "The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties.", *Free Radic Biol Med.*, **28**, 289-309.
- Sachdev D, Chirgwin JM (2000) "Fusions to maltose-binding protein: control of folding and solubility in protein purification.", *Methods Enzymol.*, **326**, 312-21.
- Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Németh K, Váradi A. (2004) "ABCG2 - a transporter for all seasons.", *FEBS Lett.*, **567**, 116-20.
- Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. (2006) "Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system.", *Physiol Rev.*, **86**, 1179-236.
- Sarkadi B, Orbán TI, Szakács G, Várady G, Schamberger A, Erdei Z, Szabéni K, Homolya L, Apáti A. (2010) "Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice?", *Stem Cells*, **28**, 174-6.
- Sassa S. (1976) "Sequential induction of heme pathway enzymes during erythroid differentiation of mouse Friend leukemia virus-infected cells.", *J Exp Med.*, **143**, 305-15.
- Sato E, Sagami I, Uchida T, Sato A, Kitagawa T, Igarashi J, Shimizu T. (2004) "SOUL in mouse eyes is a new hexameric heme-binding protein with characteristic optical absorption, resonance Raman spectral, and heme-binding properties.", *Biochemistry*, **43**, 14189-98.
- Sauna ZE, Nandigama K, Ambudkar SV. (2006) "Exploiting reaction intermediates of the ATPase reaction to elucidate the mechanism of transport by P-glycoprotein (ABCB1).", *J Biol Chem.*, **281**, 26501-11.
- Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. (2002) "The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors.", *Blood.*, **99**, 507-12.

- Scheffer GL, Maliapaard M, Pijnenborg AC, van Gastelen MA, de Jong MC, Schroeijers AB, van der Kolk DM, Allen JD, Ross DD, van der Valk P, Dalton WS, Schellens JH, Scheper RJ. (2000) "Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines.", *Cancer Res.*, **60**, 2589-93.
- Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. (1996) "P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs.", *J Clin Invest.*, **97**, 2517-24.
- Schmitt L, Tampé R. (2002) "Structure and mechanism of ABC transporters.", *Curr Opin Struct Biol.*, **12**, 754-60.
- Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT. (2005) "Identification of an intestinal heme transporter.", *Cell.*, **122**, 789-801.
- Shen S, Callaghan D, Juzwik C, Xiong H, Huang P, Zhang W. (2010) "ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: A potential role in Alzheimer's disease.", *J Neurochem.*, Jul 1.
- Shirihai OS, Gregory T, Yu C, Orkin SH, Weiss MJ. (2000) "ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation.", *EMBO J.*, **19**, 2492-502.
- Shono T, Ono M, Izumi H, Jimi SI, Matsushima K, Okamoto T, Kohno K, Kuwano M. (1996) "Involvement of the transcription factor NF-kappaB in tubular morphogenesis of human microvascular endothelial cells by oxidative stress.", *Mol Cell Biol.*, **16**, 4231-9.
- Silva D, Cortez CM, Louro SR. (2004) "Quenching of the intrinsic fluorescence of bovine serum albumin by chlorpromazine and hemin.", *Braz J Med Biol Res.*, **37**, 963-8.
- Smith A, Morgan WT. (1964) "Hemopexin-mediated heme uptake by liver. Characterization of the interaction of heme-hemopexin with isolated rabbit liver plasma membranes.", *J Biol Chem.*, **259**, 12049-53.
- Smith A, Morgan WT. (1981) "Hemopexin-mediated transport of heme into isolated rat hepatocytes.", *J Biol Chem.*, **256**, 10902-9.
- Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, Hunt JF. (2002) "ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer.", *Mol Cell.*, **10**, 139-49.
- Solazzo M, Fantappiè O, D'Amico M, Sassoli C, Tani A, Cipriani G, Bogani C, Formigli L, Mazzanti R. (2009) "Mitochondrial expression and functional activity of breast cancer resistance protein in different multiple drug-resistant cell lines.", *Cancer Res.*, **69**, 7235-42.
- Spangrude GJ, Johnson GR. (1990) "Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **87**, 7433-7.



Steinfels E, Orelle C, Fantino JR, Dalmas O, Rigaud JL, Denizot F, Di Pietro A, Jault JM. (2004) "Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis*.", *Biochemistry*, **43**, 7491-502.

Susanto J, Lin YH, Chen YN, Shen CR, Yan YT, Tsai ST, Chen CH, Shen CN. (2008) "Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells.", *PLoS One.*, **3**, 4023.

Szakács G, Váradi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. (2008) "The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox).", *Drug Discov Today.*, **13**, 379-93.

Taylor CS, Willett BJ, Kabat D. (1999) "A putative cell surface receptor for anemia-inducing feline leukemia virus subgroup C is a member of a transporter superfamily.", *J Virol.*, **73**, 6500-5.

Taketani S, Adachi Y, Kohno H, Ikehara S, Tokunaga R, Ishii T. (1998) "Molecular characterization of a newly identified heme-binding protein induced during differentiation of urine erythroleukemia cells.", *J Biol Chem.*, **273**, 31388-94.

Taketani S. (2005) "Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation.", *Tohoku J Exp Med.*, **205**, 297-318.

Tamura A, Wakabayashi K, Onishi Y, Nakagawa H, Tsuji M, Matsuda Y, Ishikawa T. (2006) "Genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2: development of the standard method for functional validation of SNPs by using the Flp recombinase system.", *J Exp Ther Oncol.*, **6**, 1-11.

Tamura A, Watanabe M, Saito H, Nakagawa H, Kamachi T, Okura I, Ishikawa T. (2006) "Functional validation of the genetic polymorphisms of human ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2: identification of alleles that are defective in porphyrin transport.", *Mol Pharmacol.*, **70**, 287-96.

Teicher BA, Herman TS, Holden SA, Wang YY, Pfeffer MR, Crawford JW (1990) "Tumorresistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo.", *Science*. **247**, 1457-61.

Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. (1970) "The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin.", *J Lab Clin Med.*, **75**, 410-21.

Tew KD. (1994) "Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance.", *Cancer Res.*, **54**, 4313-20.

Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. (1987) "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **84**, 7735-8.

Thunell S. (2000) "Porphyrins, porphyrin metabolism and porphyrias. I. Update.", *Scand J Clin Lab Invest.*, **60**, 509-40.

Townsend DM, Tew KD. (2003) "The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance.", *Oncogene*, **22**, 7369-75.

Tsiftoglou AS, Wong W, Wheeler C, Steinberg HN, Robinson SH. (1986) "Prevention of anthracycline-induced cytotoxicity in hemopoietic cells by hemin.", *Cancer Res.*, **46**, 3436-40.

Tsiftoglou AS, Wong W, Robinson SH. (1988) "Analysis of hemin-induced protection of human hemopoietic cells from the cytotoxic effects of anthracyclines.", *Cancer Res.*, **48**, 3566-70.

Tsiftoglou AS, Wong W, Tsamadou AI, Robinson SH. (1991) "Cooperative effects of hemin and anthracyclines in promoting terminal erythroid maturation in K562 human erythroleukemia cells.", *Exp Hematol.*, **19**, 928-33.

Tsiftoglou AS, Pappas IS, Vizirianakis IS. (2003) "Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells.", *Pharmacol Ther.*, **100**, 257-90.

Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. (2006) "Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects.", *Pharmacol Ther.*, **111**, 327-45.

Usuda J, Tsunoda Y, Ichinose S, Ishizumi T, Ohtani K, Maehara S, Ono S, Tsutsui H, Ohira T, Okunaka T, Furukawa K, Sugimoto Y, Kato H, Ikeda N. (2009) "Breast cancer resistant protein (BCRP) is a molecular determinant of the outcome of photodynamic therapy (PDT) for centrally located early lung cancer.", *Lung Cancer.*, **67**, 198-204.

Van Herwaarden AE, Wagenaar E, Merino G, Jonker JW, Rosing H, Beijnen JH, Schinkel AH. (2007) "Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk.", *Mol Cell Biol.*, **27**, 1247-53.

Vergères G, Ramsden J, Waskell L. (1995) "The carboxyl terminus of the membrane-binding domain of cytochrome b5 spans the bilayer of the endoplasmic reticulum.", *J Biol Chem.*, **270**, 3414-22.

Vlaming ML, Lagas JS, Schinkel AH. (2009) "Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in *Abcg2* knockout mice.", *Adv Drug Deliv Rev.*, **61**, 14-25.

Wakabayashi K, Nakagawa H, Adachi T, Kii I, Kobatake E, Kudo A, Ishikawa T. (2005) "Identification of cysteine residues critically involved in homodimer formation and protein expression of human ATP-binding cassette transporter ABCG2: a new approach using the flp recombinase system.", *J Exp Ther Oncol.*, **5**, 205-22.

Wakabayashi K, Tamura A, Saito H, Onishi Y, Ishikawa T. (2006) "Human ABC transporter ABCG2 in xenobiotic protection and redox biology.", *Drug Metab Rev.*, **38**, 371-91.

Wakabayashi K, Nakagawa H, Tamura A, Koshiha S, Hoshijima K, Komada M, Ishikawa T. (2007) "Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein.", *J Biol Chem.*, **282**, 27841-6.

- Wakabayashi-Nakao K, Tamura A, Furukawa T, Nakagawa H, Ishikawa T. (2009) "Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: ubiquitination and proteasomal degradation.", *Adv Drug Deliv Rev.*, **61**, 66-72.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. (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.
- Walton MI, Whysong D, O'Connor PM, Hockenbery D, Korsmeyer SJ, Kohn KW. (1993) "Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis.", *Cancer Res.*, **53**, 1853-61.
- Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S, Baba M. (2003) "Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors.", *Mol Pharmacol.*, **63**, 65-72.
- Wang H, Lee EW, Cai X, Ni Z, Zhou L, Mao Q. (2008) "Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence.", *Biochemistry*, **47**, 13778-87.
- Wendler G, Lindemann P, Lacapère JJ, Papadopoulos V. (2003) "Protoporphyrin IX binding and transport by recombinant mouse PBR.", *Biochem Biophys Res Commun.*, **311**, 847-52.
- Wolf NS, Koné A, Priestley GV, Bartelmez SH. (1993) "In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection.", *Exp Hematol.*, **21**, 614-22.
- Woodard SI, Dailey HA. (2000) "Multiple regulatory steps in erythroid heme biosynthesis.", *Arch Biochem Biophys.*, **384**, 375-8.
- Woodward OM, Köttgen A, Coresh J, Boerwinkle E, Guggino WB, Köttgen M. (2009) "Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout.", *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106**, 10338-42.
- Worthington MT, Cohn SM, Miller SK, Luo RQ, Berg CL. (2001) "Characterization of a human plasma membrane heme transporter in intestinal and hepatocyte cell lines.", *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **280**, 1172-7.
- Xu J, Peng H, Chen Q, Liu Y, Dong Z, Zhang JT. (2007) "Oligomerization domain of the multidrug resistance-associated transporter ABCG2 and its dominant inhibitory activity.", *Cancer Res.*, **67**, 4373-81.
- Yoshida T, Migita CT. (2000) "Mechanism of heme degradation by heme oxygenase.", *J Inorg Biochem.*, **82**, 33-41.
- Zamber CP, Lamba JK, Yasuda K, Farnum J, Thummel K, Schuetz JD, Schuetz EG. (2003) "Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine.", *Pharmacogenetics.*, **13**, 19-28.

Zhang Y, Wang H, Unadkat JD, Mao Q. (2007) “Breast cancer resistance protein 1 limits fetal distribution of nitrofurantoin in the pregnant mouse.”, *Drug Metab Dispos.*, **35**, 2154-8.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. (2001) “The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype.”, *Nat Med.*, **7**, 1028-34.

Zhou S, Zong Y, Lu T, Sorrentino BP. (2003) “Hematopoietic cells from mice that are deficient in both Bcrp1/Abcg2 and Mdr1a/1b develop normally but are sensitized to mitoxantrone.”, *Biotechniques.*, **35**, 1248-52.

Zhou S, Zong Y, Ney PA, Nair G, Stewart CF, Sorrentino BP. (2005) “Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels.”, *Blood*, **105**, 2571-6.

Zong Y, Zhou S, Fatima S, Sorrentino BP. (2006) “Expression of mouse Abcg2 mRNA during hematopoiesis is regulated by alternative use of multiple leader exons and promoters.”, *J Biol Chem.*, **281**, 29625-32.

Zutz A, Gompf S, Schägger H, Tampé R. (2009) “Mitochondrial ABC proteins in health and disease.”, *Biochim Biophys Acta.*, **1787**, 681-90.

# ANNEXES

---

## RESUME en français

ABCG2 est un transporteur de la famille ABC impliqué dans le phénotype de résistance aux drogues développé par certaines cellules, par exemple les cellules cancéreuses. Ce transporteur a aussi un rôle physiologique de détoxification de composés endogènes, notamment les porphyrines, molécules indispensables mais qui présentent une toxicité potentielle. Cette toxicité nécessite une prise en charge particulière, évitant à ces composés d'être libres en solution. Dans ce contexte, nous avons fait l'hypothèse qu'ABCG2 pourrait participer à cette détoxification en limitant l'accumulation des porphyrines dans les cellules en les présentant à un partenaire extracellulaire. Nous montrons qu'ABCG2 transporte de l'hème ainsi que certains de ses dérivés et précurseurs et que ces porphyrines, contrairement aux autres substrats d'ABCG2, se fixent sur un domaine extracellulaire spécifique d'ABCG2, ECL3, composé d'environ 70 acides aminés. L'affinité d'ECL3 pour les porphyrines est de 0,5 à 3,5  $\mu$ M, suffisamment affine pour permettre leur fixation après transport. Nous montrons aussi que l'albumine sérique humaine, impliquée dans la détoxification de l'hème, récupère les porphyrines fixées sur ECL3 par une interaction directe avec ABCG2. L'ensemble de ce travail a donc permis d'une part de mieux comprendre le rôle d'ABCG2 dans la régulation de l'homéostasie des porphyrines, notamment l'hème, et d'autre part, de façon originale, d'identifier le mécanisme moléculaire par lequel cette détoxification s'effectue.

---

## TITRE en anglais

Role of the extracellular domain of ABCG2 in porphyrin homeostasis.

---

## RESUME en anglais

ABCG2 belongs to the ABC-transporter family, involved in drug resistance developed by cells, notably cancer cells. This transporter has also a physiological role of endobiotic detoxification, in particular porphyrins that are essential but potentially toxic molecules. This toxicity implies a specific handle, to avoid them to remain free in solution. In that context, we hypothesized that ABCG2 participate to this detoxification, limiting the intracellular porphyrin accumulation by presenting them to an extracellular partner. We show that ABCG2 transports heme and some of its derivatives and precursors. Interestingly, these porphyrins, unlike other ABCG2 (non-porphyrin) substrates, can bind to an extracellular domain, specific of ABCG2, ECL3, 70 residues-long. ECL3 displays affinities for porphyrins in the range of 0.5 to 3.5  $\mu$ M, high enough to allow their binding after transport. We also show that human serum albumin, implicated in heme detoxification, releases porphyrins bound to ECL3 by a direct interaction with ABCG2. This work established a better comprehension of ABCG2 role in porphyrin and in particular heme homeostasis regulation. In addition, our results contribute to elucidate part of the molecular mechanism by which such regulation is carried out.

---

## DISCIPLINE

Biochimie

---

## MOTS-CLES

Transporteur ABC, ABCG2, porphyrines, détoxification, albumine, interaction protéine-ligand.

---

## INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Equipe labellisée Ligue 2009 « Protéines de Résistance aux Agents Chimiothérapeutiques », Institut de Biologie et Chimie des Protéines, UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1 et IFR 128 Biosciences Gerland-Lyon Sud. 7, passage du Vercors 69367 Lyon cedex 07