



HAL
open science

Régulation de l'expression membranaire du transporteur de phospholipides biliaires ABCB4: effet de mutations

Alix Bruneau

► To cite this version:

Alix Bruneau. Régulation de l'expression membranaire du transporteur de phospholipides biliaires ABCB4: effet de mutations. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT: 2019SORUS048 . tel-02935849

HAL Id: tel-02935849

<https://theses.hal.science/tel-02935849v1>

Submitted on 10 Sep 2020

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.

Sorbonne Université

L'école doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique ED394

Centre de Recherche Saint-Antoine – UMR_S 938 INSERM / Sorbonne Université
Équipe « Maladie fibro-inflammatoires d'origine métabolique et biliaire du foie »

Régulation de l'expression membranaire du transporteur de phospholipides biliaires ABCB4 : Effet de mutations

Par Alix Bruneau

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par Tounsia Aït-Slimane

Présentée et soutenue publiquement le 02 octobre 2019

Devant un jury composé de :

Pr Philippe Cardot Professeur des Universités, Sorbonne Université (UMR_S1158)	Président du jury
Dr Emmanuel Gonzales PU-PH, Université Paris Sud (UMR_S1174)	Rapporteur
Dr Jean-Michel Jault DR CNRS, Université de Lyon (UMR_5086)	Rapporteur
Dr Alexandre Hinzpeter CR INSERM, Université Paris Descartes (U_1151)	Examineur
Dr Boris Julien, Université Paris Sud Maître de Conférences, Université Paris Sud (UMR_3347)	Examineur
Dr Tounsia Aït-Slimane Maître de Conférences, Sorbonne Université (UMR_S938)	Directeur de thèse

TABLE DES MATIERES

Remerciements	4
Liste des abréviations.....	6
-Résumé-	8
-Abstract-	9
-Introduction bibliographique-	10
Chapitre I – La sécrétion biliaire.....	10
I.1. Foie et voies biliaires	10
I.2. Rôle physiologique de la bile	14
I.3. Composition, synthèse et devenir de la bile	15
Chapitre II – Transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire	32
II.1. Transporteurs hépatocytaires.....	32
II.2. Autres transporteurs	37
II.3. Régulation de l’expression des transporteurs hépatocytaires impliqués dans la sécrétion biliaire	38
Chapitre III – Superfamille des transporteurs ABC.....	41
III.1. Structure et motifs conservés	41
III.2. Sous-familles de transporteurs ABC	45
III.3. Modifications co- et post-traductionnelles.....	50
Chapitre IV - ABCB4	54
IV.1. Découverte	54
IV.2. Expression cellulaire et tissulaire	55
IV.3. Structure	57
IV.4. Fonction d’ABCB4 : sécrétion de phospholipides biliaires	58
IV.5. Régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle	60
IV.6. Pathologies liées à ABCB4.....	64

Chapitre V – Mécanismes impliqués dans l’expression membranaire des transporteurs ABC hépatocytaires	83
V.1. ABCB1	83
V.2. ABCC2	87
V.3. ABCB11	90
V.4. ABCB4	92
Chapitre VI - MLCII et MRCK α	94
VI.1. La chaîne légère de myosine II non musculaire MLC2 : un partenaire d’ABCB4	94
VI.2. Domaine N-terminal d’ABCB4 : Double-hybride et identification de partenaires	100
VI.3. MRCK α	103
VI.4. Rho GTPases	114
-Objectifs des travaux de thèse-	118
-Résultats-	120
Première partie :	120
Impact de mutations situées dans les domaines de liaison à l’ATP d’ABCB4.....	120
-Article-	121
Deuxième partie	135
Étude du rôle fonctionnel de l’interaction d’ABCB4 avec la kinase MRCK α	135
-Manuscrit en préparation-	136
-Résultats complémentaires-	160
Troisième partie.....	164
Si l’effet de la kinase MRCK α passait par son effecteur MLC2 ?	164
-Discussion-	171
-Conclusions et perspectives-	182
-Annexes-	184
-Références-	199

REMERCIEMENTS

Après quatre années de doctorat, je tiens à remercier tout particulièrement le Professeur Chantal Housset de m'avoir accueillie dans son équipe, de m'avoir soutenue et offert la possibilité de m'épanouir dans le monde la recherche.

Je remercie mes rapporteurs les Dr. Jean-Michel Jault et Emmanuel Gonzales pour le temps qu'ils ont consacré à ce manuscrit. Merci également au Pr. Philippe Cardot de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse, et au Dr. Alexandre Hinzpeter et Boris Julien qui ont répondu présent pour ma mi-thèse et aujourd'hui encore en tant qu'examineurs de cette thèse.

Un immense merci à ma directrice de thèse, Tounsia. Merci pour ton accueil alors que j'étais étudiante en Master 2. Je te suis très reconnaissante d'avoir cru en moi, de m'avoir conseillée et écoutée, je n'oublierai pas les moments passés à échanger et tout ce que j'ai appris avec toi ! Merci à Chantal et Tounsia de m'avoir offert de nombreuses opportunités de présenter mes travaux lors de congrès qui m'ont été extrêmement bénéfiques et m'ont permis d'échanger avec de nombreux scientifiques.

Anne-Marie et Jean-Louis, vous m'avez pris sous votre aile et appris les rudiments de la paillasse, je pars avec vos conseils gravés dans ma mémoire. Jean-Louis, merci pour tous ces échanges sur mes théories un peu folles, toutes les blagues et les encouragements ! Anne-Marie, un énorme merci pour la relecture et la chasse aux coquilles. Tu as toujours pris soin de moi et j'ai eu une chance inouïe de partager ces années avec toi !

Virginie, ma grande sœur de labo, je te suis incroyablement reconnaissante de m'avoir aidée à me faire confiance, poussée à tester mes théories « bissextilles » au quotidien, et d'avoir tellement ri avec moi. Ces deux années m'ont tant aidée à grandir. Amel, ta gentillesse et ta bienveillance ont rendu mon quotidien si agréable. Je t'envoie plein de force pour ta dernière ligne droite, tu vas y arriver ! Merci aussi à Michèle et Thomas pour leurs précieux conseils et nos échanges lors des réunions du groupe ABCB4.

Haquima, merci pour ton aide, tes encouragements et nos échanges scientifiques réguliers.

Jérémie, un grand merci pour ton soutien de tous les jours et ton aide dans la recherche de post doc, je t'enverrai des bretzels de Berlin !

A tous les membres de l'équipe, j'ai beaucoup appris grâce à vous. Vous avez tous égayé mes journées !

A mes parents, éternels supports dans mes périodes d'incertitude, merci d'être encore et toujours là pour moi, encourageants et aimants. Pierre et Anna ma famille je vous aime, vous avez été une source de joie infinie pendant mes années parisiennes.

Marc pour ta patience illimitée, ton amour, ton réconfort, tes rires qui ont illuminé mes moments de doutes, mille mercis.

A ma bande de joyeux docteurs diplômés ou en devenir, Romain, Gweltas, Nanou, Pauline, pour les conseils prodigués, le soutien et l'incroyable quantité de bêtises échangées, vous m'avez aidée à traverser ces années pleines de défis !

Alice, Marion, Pauline, Camille, Noémie, David, Pierre S. et Seb, pour les années partagées, votre écoute et nos rires, qu'aurais-je fait sans vous ?

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAV : Adeno Associated Virus
ABC : ATP Binding Cassette
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ATP : Adénosine TriPhosphate
Cas9 : CRISPR associated protein 9
CC : Coiled-coil
Cdc42 : Cell division control protein 42 homolog
Cdc42-BP α : Cdc42 Binding Protein kinase alpha
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHC : Carcinome Hépatocellulaire
CRIB : Cdc42/Rac Interactive Binding domain
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CYP7A1 : Cholestérol 7 α -hydroxylase ou Cytochrome P450 7A1
CYP8B1 : Sterol 12- α -hydroxylase
DAG : Diacylglycérol
DILI : Drug Induced Liver Injury
ELC : Essentiel Light Chain
ERM : Ezrin Radixin Moesin
FXR : Farnesoid X Receptor
GFP : Green Fluorescent Protein
 γ -GT : Gamma Glutamyl Transferase
GSH : Gluthation
HAX-1 : HS1-Associated protein X-1
HEK293 : Human Embryonic Kidney
HepG2 : Human hepatocellular liver carcinoma cell line
HDL : High Density Lipoprotein
ICP : Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy
KO : Knock Out
LPAC : Low Phospholipid Associated Cholelithiasis

LXR : Liver X Receptor
M : Molaire
MDR : Multi-Drug Resistance
MHC : Myosin Heavy Chain
MLC2 : Myosin Light Chain II
MLCK : Myosin Light Chain Kinase
MLCP : Myosin Light Chain Phosphatase
MRCK α : Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42-binding Kinase alpha
MRP : Multidrug Resistance associated Protein
MYH : Myosin Heavy chain
MYL : Myosin Light chain
NBD : Nucleotide Binding Domain
NMII : Non Muscular Myosin II
NTCP : Na⁺ Taurocholate Co-transporting Polypeptide
PC : Phosphatidylcholine
PE : PhosphatidylEthanolamine
PFIC : Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis
pH : potentiel Hydrogène
Pgp : P-glycoprotein
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PMA : Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PS : PhosphatidylSérine
RACK1 : Receptor For Activated C Kinase 1
RE : Réticulum Endoplasmique
ROCK : Rho-associated protein Kinase
RXR : Retinoid X Receptor
SHP : Small Heterodimer Partner
TCA : Taurocholate
TMD : TransMembrane Domain
UDCA : Acide Ursodéoxycholique
WT : Wild-Type

-RESUME-

ABCB4 est un transporteur ABC exprimé au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes. Sa fonction est de sécréter de la phosphatidylcholine, un composant majeur de la bile. Depuis que des maladies biliaires ont pu être associées à un défaut moléculaire d'ABCB4, plus de 500 variations ont été identifiées. La pathologie la plus sévère est la cholestase intrahépatique familiale progressive de type 3 (PFIC3). Elle se développe tôt dans l'enfance et progresse rapidement vers la cirrhose et l'insuffisance hépatique avant l'âge adulte. La seule thérapie efficace étant la transplantation hépatique mais elle présente des limitations : la disponibilité des greffons et la mortalité post-transplantation. Le développement de thérapies alternatives représente donc un enjeu primordial.

Cette thèse s'intéresse à l'effet de cinq mutations décrites chez des patients et situées dans les sites de liaison à l'ATP d'ABCB4. Grâce à une approche innovante combinant la modélisation 3D et des études *in vitro*, nous avons montré que ces mutations sont responsables d'un défaut d'activité du transporteur ABCB4. Nous avons mis en évidence que le VX-770, un médicament approuvé en clinique pour traiter les patients atteints de mucoviscidose, permet de restaurer l'activité de ces cinq mutants. Ces travaux ouvrent des perspectives de repositionnement du VX-770 pour le traitement personnalisé des patients atteints de pathologies biliaires liées à ABCB4.

L'objectif de la seconde partie de cette thèse est d'étudier le rôle de l'interaction du domaine N-terminal d'ABCB4 avec la kinase MRCK α . L'inhibition ou l'extinction de cette kinase montrent que MRCK α joue un rôle dans la régulation de l'expression membranaire d'ABCB4 en contrôlant son internalisation depuis la membrane plasmique. Nous avons ensuite voulu déterminer si l'effet de MRCK α sur l'expression d'ABCB4 passe par son effecteur MLC2, qui est un partenaire du domaine linker d'ABCB4. En inhibant la protéine MLC2, nous avons obtenu les mêmes effets sur ABCB4 que lorsque MRCK α est inhibé. Notre travail montre clairement un rôle commun de ces deux partenaires dans la régulation de l'internalisation d'ABCB4.

Mots clés : Transporteurs ABC ; Sécrétion biliaire ; Cholestase génétique ; VX-770 ; Pharmacothérapie ciblée ; MRCK α

-ABSTRACT-

ABCB4 is a phospholipid floppase exclusively expressed at the canalicular membrane of hepatocytes where its function is to translocate phosphatidylcholine (PC) into the bile. Variations in the ABCB4 gene sequence are associated with several chronic and progressive liver diseases. The most severe is progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3), which develops early in childhood and most often requires liver transplantation. Less severe diseases are the intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) and the low phospholipid-associated cholelithiasis (LPAC) syndrome, which occur in young adults. Up to now, about 500 distinct disease-causing ABCB4 variants have been reported. A challenge is to find pharmacological treatments for the severe forms of these diseases.

We have studied the effect of five disease-causing variations that reside in the highly conserved motifs of ABC transporters, involved in ATP binding. Using three-dimension structural modeling and in vitro studies, we showed that the five mutants were normally processed and targeted to the plasma membrane, whereas their PC secretion activity was dramatically decreased. As also hypothesized on the basis of molecular modeling, PC secretion activity of the mutants was rescued by the clinically approved CFTR potentiator ivacaftor (VX-770). These results pave the way for personalized therapy in ABCB4-related diseases.

The second part of my project was aimed at investigating the potential role of two ABCB4 partners, the kinase MRCK α and its effector the myosin light chain II (MLCII) in the expression and function of ABCB4 at the canalicular membrane of hepatocytes. We found that downregulation of both partners did not affect the canalicular localization of ABCB4 at steady state, but led to a reduction of its endocytosis.

In conclusion, our results provide evidence that MRCK α and MLCII bind to ABCB4, and play a critical role in its internalization from the canalicular membrane. They open new insights into the molecular mechanisms underlying the regulation of ABCB4 expression and function.

Keywords : ABC transporters ; Bile secretion ; Genetic cholestasis ; Targeted pharmacotherapy ; MRCK α

-INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE-

Chapitre I – La sécrétion biliaire

I.1. Foie et voies biliaires

I.1.1. Le foie

Le foie est un organe central dans le maintien de l'homéostasie du corps humain. Il est doté d'une importante activité de synthèse, de dégradation, détoxification et d'excrétion de molécules variées. C'est un organe volumineux, multilobé et structurellement complexe dont le parenchyme est composé de nombreux types cellulaires comprenant entre autres :

- Les hépatocytes, qui constituent 85% du volume hépatique
- Les cholangiocytes
- Des macrophages
- Des lymphocytes
- Des cellules dendritiques
- Les cellules étoilées

Ces différentes cellules s'organisent dans une matrice fortement vascularisée à l'aide de capillaires spécifiques, les sinusoides hépatiques, alimentés par du sang veineux et du sang artériel. Le sang veineux ayant préalablement circulé au travers de l'intestin, du pancréas ainsi que de la rate sera pauvre en oxygène et de faible pression mais riche en nutriments et toxines provenant du tube digestif. Le sang artériel en provenance du cœur sera quant à lui riche en oxygène.

La structure interne du foie peut être divisée en sous-unités fonctionnelles appelées lobules. Les lobules sont de forme hexagonale et séparés entre eux par du tissu conjonctif, formant des espaces portes en périphérie des lobules. Chaque espace porte est composé d'une veine porte et d'une artère hépatique qui alimentent les sinusoides en sang veineux et artériel ainsi que d'un canal biliaire intrahépatique collectant la bile provenant des hépatocytes (Figure 1).

Un lobule est donc formé de :

- Une veine centrale ou centro-lobulaire.
- Des sinusoides hépatiques afférant à cette veine.
- Six espaces portes périphériques contenant chacun une veine porte, une artère hépatique et un canal biliaire.
- Des hépatocytes organisés en travées autour des sinusoides hépatiques.

Au sein d'un lobule, le sang circulera donc de l'espace porte vers la veine centro-lobulaire, contrairement à la bile, produite dans la zone centrale du lobule et collectée en périphérie au niveau des espaces portes.

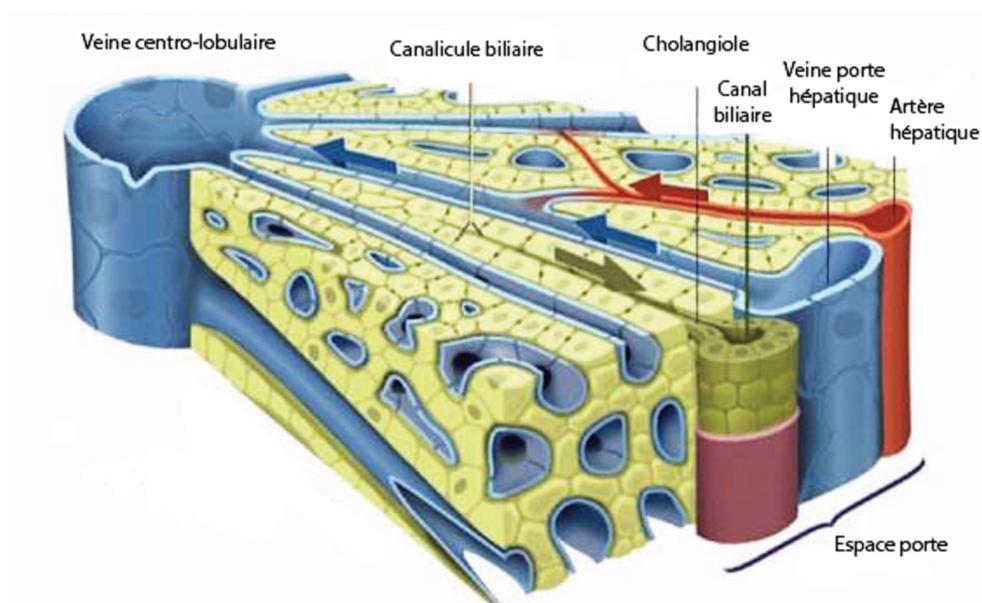


Figure 1 : Organisation d'un espace porte. Le foie est organisé en lobules, délimités par les espaces portes. Chaque espace porte est constitué de travées d'hépatocytes, d'une branche de la veine porte, de l'artère hépatique et d'un canal biliaire. Au centre du lobule on retrouve une veine centro-lobulaire. D'après (Treyer 2013)

I.1.2 Les voies biliaires

L'arbre biliaire est le lieu de la sécrétion biliaire et fait le lien entre le parenchyme hépatique et l'intestin. La bile est produite par les hépatocytes. Elle est ensuite collectée au niveau des canalicules biliaires formés par les membranes apicales (ou canaliculaires) des hépatocytes. Les canalicules biliaires se réunissent en cholangioles, tapissés de cellules épithéliales appelées cholangiocytes, qui traversent les lobules hépatiques pour se réunir en un canal biliaire interlobulaire situé dans l'espace porte. Les différents canaux biliaires forment l'arbre biliaire

intra-hépatique, ils convergent vers le conduit biliaire commun qui mène la bile vers un canal extra-hépatique unique, le canal cholédoque. La bile sera alors stockée dans la vésicule biliaire puis déversée lors des repas par l'intermédiaire de ce canal au niveau du duodénum (Figure 2).

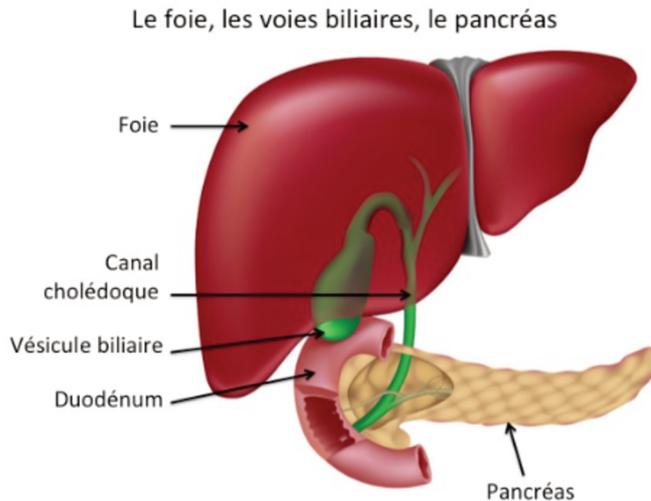


Figure 2 : Le système biliaire.

Les canaux hépatiques se rejoignent pour former le canal hépatique commun, qui rejoint le canal cystique reliant le foie à la vésicule. Le canal cholédoque déverse la bile dans le duodénum lors des repas.

I.1.3. L'hépatocyte

Les hépatocytes constituent les principales cellules hépatiques (60% des cellules pour 85% du volume du foie). Dotés d'une durée de vie de 300 à 500 jours, on considère que 30 à 40% des hépatocytes ont également la particularité d'être polyploïdes (Gentric 2014).

Ce sont des cellules épithéliales hexagonales et polarisées dont les membranes basales - ou sinusoidales - sont en contact avec les sinusoides hépatiques alors que les membranes apicales forment des canalicules biliaires (Figure 3). Cette organisation permet donc aux hépatocytes de mener en parallèle leurs fonctions de synthèse, d'excrétion, d'absorption de nutriments et d'élimination de composés cytotoxiques.

Chaque hépatocyte contribue à former plusieurs canalicules biliaires dont la lumière comprise entre 0,5 et 2 μ m est maintenue close par des jonctions serrées. Elles forment une barrière entre le canalicule biliaire et le sang sinusoidal, prévenant la diffusion des acides biliaires dans la circulation sanguine. Ces jonctions serrées sont composées de protéines de jonctions telles que la claudine, l'occludine et les zonula-occludens ZO-1, ZO-2 qui sont indispensables à la mise en place de la polarité des hépatocytes. D'autres jonctions contribuent à la polarisation des hépatocytes : les jonctions gap, les jonctions intermédiaires, les jonctions adhérentes ou encore les desmosomes (Grisham 2009, Musch 2014, Treyer 2013).

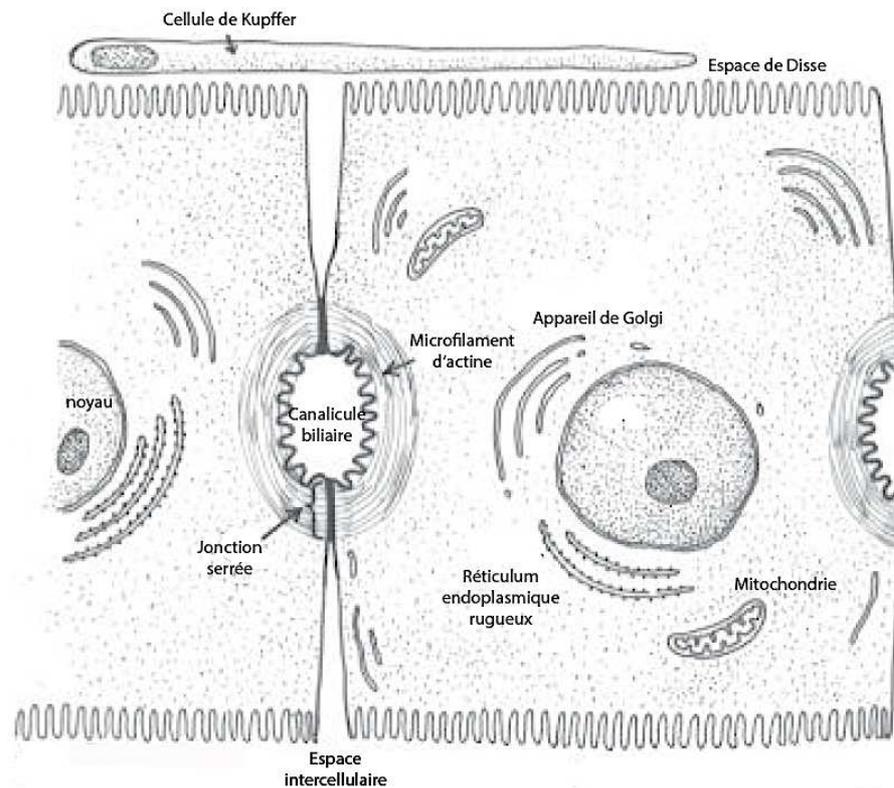


Figure 3 : Hépatocytes et canalicule biliaire. Les hépatocytes sont des cellules polarisées. L'association des membranes apicales de deux hépatocytes adjacents forme un canalicule biliaire. Chaque hépatocyte contribue à en former plusieurs. La membrane basolatérale forme une zone d'échange avec les sinusoides hépatiques. D'après (Boyer 2013)

La surface du canalicule est augmentée grâce à de nombreuses microvillosités, le canalicule représentant alors 10 à 15% de la surface d'un hépatocyte (Boyer 2013). Les nombreuses protéines de transport indispensables à la sécrétion biliaire sont retrouvées au niveau de ces microvillosités, dont une part conséquente de transporteurs appartenant à la superfamille ABC (ATP Binding Cassette). Ces protéines seront détaillées dans les Chapitres II et III. Dans la majorité des cellules épithéliales (hépatocytes, glandes lacrymales, entérocytes) les microfilaments d'actine sont fortement enrichis formant un « cortex » ou « ceinture » d'actine sous la membrane plasmique apicale. Ce réseau péri-canaliculaire a la particularité d'être contractile, facilitant ainsi la sécrétion des constituants de la bile dans la lumière du canalicule. Sous cette « ceinture » d'actine, on retrouve les microtubules impliqués dans la sécrétion des lipides et le transport vésiculaire.

La membrane basolatérale ou sinusoidale est en contact avec les capillaires sanguins sinusoidaux (Figure 3). Elle est le lieu d'échanges de nombreux ions organiques et d'absorption de différents composants plasmatiques, tels que le LDL-cholestérol, les acides biliaires circulants, des hormones et des nutriments. La membrane sinusoidale est également riche en

transporteurs pouvant assurer l'excrétion de divers métabolites (voir Chapitre II), comme la bilirubine lors d'hyperbilirubinémie ou les acides biliaires au cours d'une cholestase. Ces transporteurs ont donc pour fonction de protéger les hépatocytes en prévenant l'accumulation intracellulaire de composés toxiques.

I.2. Rôle physiologique de la bile

Le foie est l'unique lieu de la sécrétion biliaire. La bile joue plusieurs fonctions dans l'organisme, un rôle digestif et un rôle de détoxification.

I.2.1. Rôle digestif

La présence des acides biliaires dans la bile lui confère une activité digestive majeure puisqu'ils facilitent l'assimilation des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles (A, D, E et K). Au travers de leur action détergente, les acides biliaires permettent l'émulsion des graisses, favorisant ainsi leur lyse par les lipases pancréatiques et intestinales. Cette solubilisation permet la formation de micelles augmentant ainsi l'absorption des lipides alimentaires par les entérocytes. C'est la structure amphipatique particulière des acides biliaires qui permet de solubiliser des lipides dans la bile. En effet, ils sont composés d'une partie hydrophile et d'une hydrophobe (Maldonado-Valderrama 2011) (Figure 4).

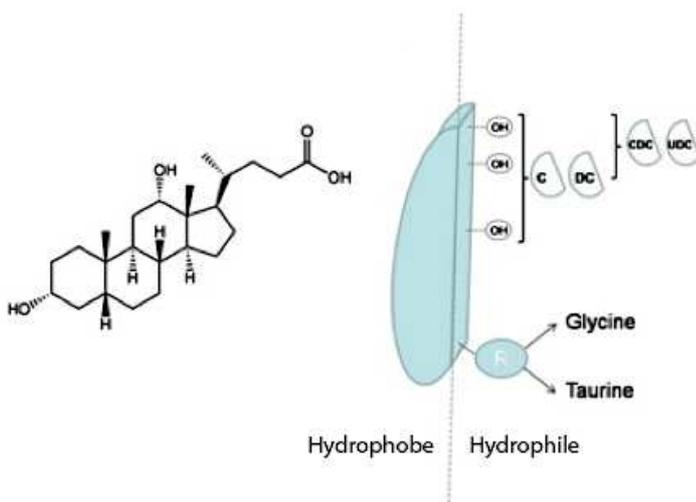


Figure 4 : Structure d'un acide biliaire.

A gauche, la structure d'un acide biliaire avec quatre cycles et une chaîne conjuguée avec un acide aminé glycine ou taurine. A droite, la représentation du caractère amphiphile des acides biliaires avec une face hydrophobe et une tête hydrophile. D'après (Maldonado-Valderrama 2011)

I.2.2. Détoxification

La bile est la voie majeure d'excrétion de molécules potentiellement toxiques qu'elles soient exogènes (xénobiotiques) :

- Médicaments
- Additifs
- Pesticides

Ou endogènes :

- Ions inorganiques (fer, cuivre)
- Excès de cholestérol
- Bilirubine...

L'élimination du surplus de cholestérol par sa conversion en acides biliaires aide au maintien de l'homéostasie. La bilirubine sera quant à elle éliminée dans les fèces.

I.3. Composition, synthèse et devenir de la bile

I.3.1. Les différents types de bile

Chez l'Homme, le flux biliaire journalier est d'environ 600mL et est séparé en deux fractions, la bile canaliculaire ou primaire (75%) et la bile ductulaire (25%) (Esteller 2008, Hundt 2019) (Figure 5).

La bile canaliculaire

La bile canaliculaire est divisée en :

- BADFc ou flux dépendant de la fraction en acides biliaires, conditionné par la sécrétion hépatocyttaire en acides biliaires, soit 220mL représentant 36% du flux total.
- BAIFc ou flux indépendant de la fraction en acides biliaires, qui dépend d'autres molécules osmotiquement actives (glutathion, bicarbonate), soit 235mL de bile par jour (39%).

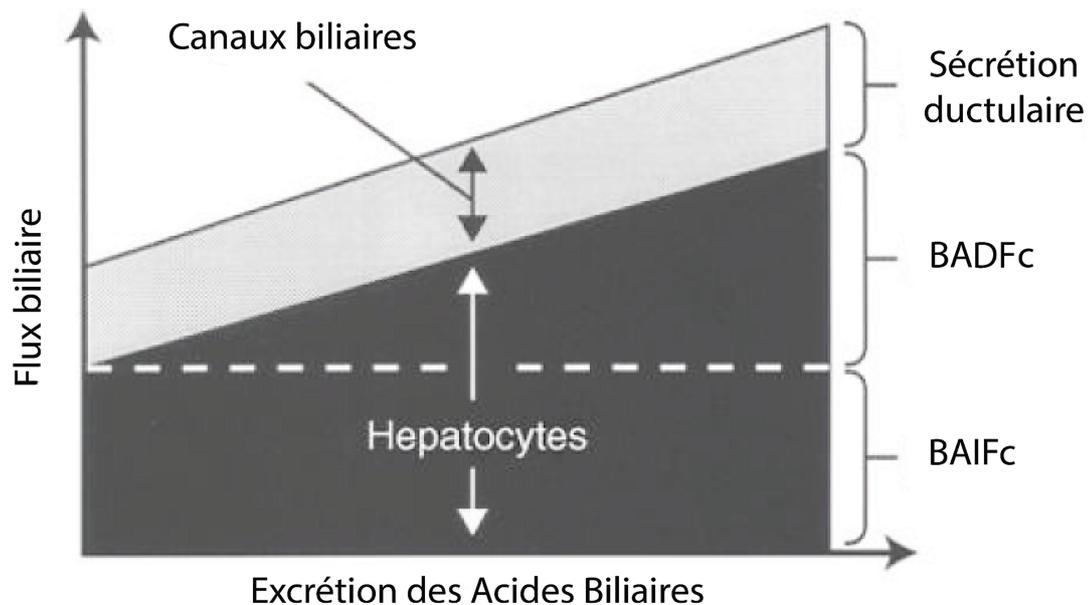


Figure 5 : Flux Biliaire. Le flux biliaire est constitué de la bile canaliculaire et la bile ductulaire. La sécrétion biliaire canaliculaire est séparée en deux fractions, la bile dépendante de la fraction en acides biliaires ou BADFc, et la bile indépendante de la fraction en acides biliaires ou BAIFc. D'après (Boyer 2013)

Bile dépendante de la fraction en acides biliaires – BADFc

La bile est une solution aqueuse complexe élaborée au niveau des canalicules biliaires par les hépatocytes. Localisée à la membrane sinusoidale des hépatocytes, on trouve une pompe Na^+/K^+ ATPase qui crée un gradient d'ions Na^+ des capillaires vers le cytoplasme des hépatocytes. Par symport, cette entrée de Na^+ permet aux acides biliaires de pénétrer dans la cellule au niveau des membranes basolatérales puis de diffuser jusqu'aux canalicules. Suite à un transport actif, les acides biliaires sont sécrétés dans le canalicule, ce qui entraîne un flux d'eau par un phénomène de filtration osmotique. En effet, les acides biliaires sont des anions transportés contre le gradient de concentration grâce à des transporteurs ATP-dépendants localisés aux membranes canaliculaires des hépatocytes. Ce flux de charges négatives provoque un transport passif de cations (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ...) qui déclenche un mouvement osmotique à l'aide des aquaporines ainsi qu'au travers des jonctions serrées.

Bile indépendante de la fraction en acides biliaires – BAIFc

La seconde fraction de la bile canaliculaire est indépendante de la sécrétion des acides biliaires par les hépatocytes. C'est le transport actif de diverses molécules comme le glutathion ou la bilirubine conjuguée qui est à l'origine de ce flux (Branum 1991, Javitt 2014).

Bile ductulaire

La bile primaire est ensuite modifiée le long des canaux biliaires par les cholangiocytes selon des procédés de sécrétion et réabsorption. Ces cellules épithéliales vont réabsorber des xénobiotiques, des sels biliaires, du glucose précédemment excrétés par les hépatocytes et sécréter des ions (HCO_3 , Cl), entraînant ainsi de nouveaux mouvements d'eau.

Cette sécrétion biliaire qui représente un quart de la bile produite quotidiennement est régulée pas de multiples signaux : Les hormones libérées suite à l'ingestion d'un repas (sécrétine), le calcium intracellulaire, l'osmolarité. Une fois sa fluidité et son pH modifiés, la bile sera stockée dans la vésicule biliaire ou directement déversée dans le duodénum.

I.3.2. Composition

La bile est un fluide aqueux composée de 95% d'eau pour la bile hépatique et de 85% pour la bile vésiculaire, dans lequel de nombreux électrolytes, solutés organiques et inorganiques sont dissouts. Les composés organiques retrouvés sont majoritairement des acides biliaires, du cholestérol, des phospholipides avec essentiellement de la phosphatidylcholine, des peptides et des protéines (4,5%) comme le glutathion et l'albumine ainsi que des pigments biliaires avec principalement de la bilirubine (50-200 mg/dL). Les composés inorganiques sont surtout des anions comme indiqué dans le tableau de la Figure 6. D'autres composés endogènes comme des hormones (thyroïdiennes, œstrogènes), des vitamines ou du glucose peuvent également être détectés dans la bile (Boyer 2013, Esteller 2008, Portincasa 2012).

Les acides biliaires (2-45 mM) sont prédominants dans la composition de la bile, environ la moitié sont des acides choliques et chénodésoxycholiques (Reshetnyak 2013). La bile est un fluide riche en lipides avec des phospholipides (140-810 mg/dL) dont une majorité de phosphatidylcholine, mais aussi du cholestérol (97-320 mg/dL). Le ratio physiologique phospholipides/acides biliaires est de 0,3, celui cholestérol/acides biliaires est de 0,07 (Figure 6).

Composition	Bile hépatique	Bile vésiculaire
Eau		
Sels biliaires	11 mg/mL	60 mg/mL
Cholestérol	1 mg/mL	9 mg/mL
Bilirubine	0,4 mg/mL	3 mg/mL
Phosphatidylcholine	0,4 mg/mL	3 mg/mL
Acides gras	1,2 mg/mL	12 mg/mL
Na ⁺	145 mM	130 mM
K ⁺	5mM	12mM
Ca ²⁺	2,5 mM	12 mM
Cl ⁻	100 mM	25 mM
HCO ₃ ⁻	28 mM	10 mM

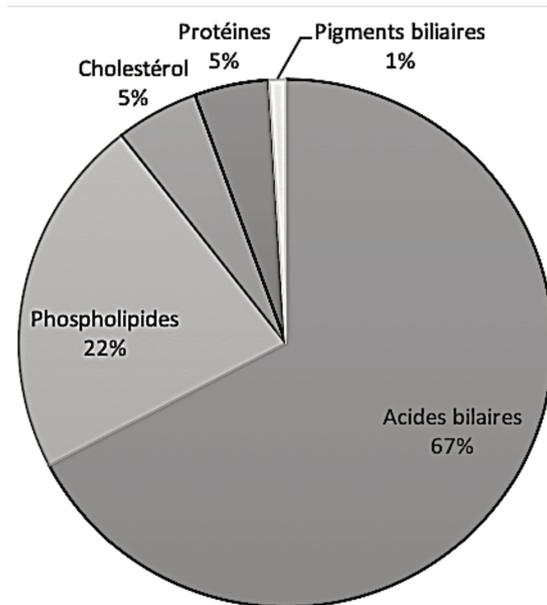


Figure 6 : Composition de la bile. Les proportions de composés organiques et inorganiques varient entre la bile hépatique et la bile vésiculaire. Na⁺ : Sodium ; Ca²⁺ : Calcium ; Cl⁻ : Chlore ; HCO₃⁻ : Bicarbonate. Adapté d'après (Boyer 2013, Esteller 2008)

I.3.3. Synthèse des principaux constituants : acides biliaires, phospholipides et cholestérol

Les phospholipides

La phosphatidylcholine (PC), aussi appelée lécithine, représente plus de 95% des phospholipides biliaires sécrétés par les hépatocytes (Alvaro 1986). Le transporteur responsable de la sécrétion de la PC dans la bile a été identifié grâce à un modèle de souris KO pour le gène *Mdr2* dont la bile était dépourvue de PC (Smit 1993). Ce transporteur appelé ABCB4 ou MDR3 chez l'Homme sera détaillé dans le Chapitre IV.

La PC est un glycérophospholipide comprenant un squelette glycéride, deux chaînes d'acides gras, un phosphate et une tête choline, ce qui en fait une molécule amphiphile (Figure 7). Elle possède en effet :

- Une tête hydrophile avec le résidu choline et le groupement phosphate
- Une queue hydrophobe composée de deux chaînes d'acides gras

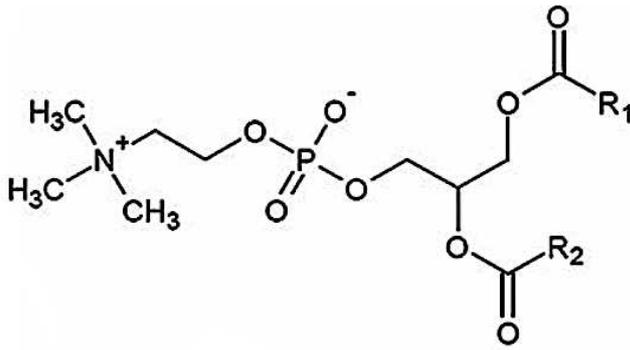


Figure 7 : Structure de la Phosphatidylcholine. A gauche, la partie hydrophile contenant la tête choline, à droite la queue hydrophobe avec R1 et R2, des chaînes d'acides gras variables donnant lieu à différents types de PC. D'après (Mengesha 2010)

Il existe plusieurs espèces de PC selon la taille des chaînes d'acides gras, la position et le nombre de leurs insaturations. Des espèces sont en particulier retrouvées enrichies dans la bile, les espèces palmitoylées sn-I 16:0 – 16:0, sn-I 16:0 – 18:1 et sn-I 16:0 – 18:2 et sn-I 16:0 – 20:4 (Alvaro 1986, Kawamoto 1980).

Biosynthèse de la phosphatidylcholine hépatique

La PC biliaire a plusieurs origines, une part non négligeable de la PC provient des membranes des HDL (High Density Lipoprotein) (Portal 1993), une autre part plus importante provient de voies métaboliques de synthèse. Les hépatocytes possèdent deux voies de synthèse de la PC. Comme toute cellule eucaryote, les hépatocytes synthétisent la PC par la voie ubiquitaire dépendante de la CDP-choline (voie de Kennedy), que l'on peut résumer en trois étapes enzymatiques (Gibellini 2010) :

- La phosphorylation de la choline par une choline oxydase formant de la phosphocholine
- La formation de CDP-phosphocholine permettant la libération d'énergie sous forme de pyrophosphate
- La dernière réaction catalytique : l'ajout d'une ancre lipidique diacylglycérol (DAG) ou alkyl-acylglycérol (AAG) sur la CDP-phosphocholine, permettant de libérer de la phosphatidylcholine et du CMP (Cytidine MonoPhosphate).

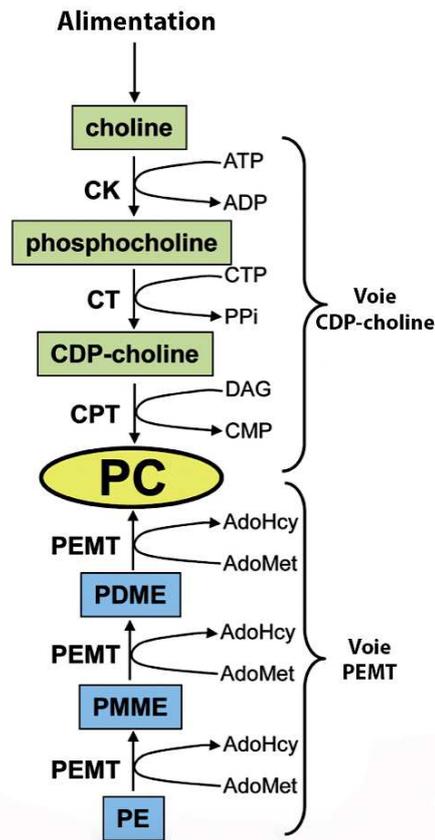


Figure 8 : Voies de synthèse de la PC. Deux voies métaboliques distinctes sont impliquées dans la synthèse de la PC : La voie CDP-choline (Cytidine-DiPhosphate-choline) qui convertit la choline provenant de l'alimentation en PC, et la voie PEMT (Phosphatidylmonométhylethanolamine N-méthyltransférase) qui synthétise de la PC à partir de la PE. Les enzymes représentées sur ce schéma sont : CK : Choline Kinase ; CT : Cytidine triphosphate ; CPT : choline-phosphotransférase. CTP : phosphocholine cytidyltransférase ; PC : Phosphatidylcholine, PE : Phosphatidyléthanolamine. D'après (Cole 2012)

Une voie annexe spécifique au foie permet également aux hépatocytes de synthétiser de la PC à hauteur de 30% de sa production : la voie PEMT (phosphatidylmonométhylethanolamine N-méthyltransférase) (Vance 1986). Cette voie consiste à méthyler progressivement de la phosphatidyléthanolamine (PE) sous action de la PE méthyltransférase (PEMT) qui induit la formation de mono-, di- puis triméthyl-PE qui correspond à de la PC (Figure 8).

Cette voie est indispensable au bon fonctionnement du foie puisque l'invalidation de son enzyme clé, la PEMT, dans le foie de souris associée à une alimentation déplétée en choline, diminue la PC biliaire de moitié et induit une stéatose hépatique qui entraîne une insuffisance hépatique causant la mort des souris au bout de 4 à 5 jours. Il est intéressant de noter que si *Mdr2/Abcb4* est invalidé conjointement à *Pemt*, les souris soumises à ce même régime sans choline développent une stéatose hépatique mais sont par ailleurs protégées de l'insuffisance hépatique et survivent plus de 90 jours (Li 2011, Zhu 2003). La faculté de ces souris à survivre

et à être protégées suggère que dans le modèle KO *Pemt* simple, l'activité de sécrétion de PC d'ABCB4 dans la bile serait responsable d'une diminution rapide de la PC hépatique entraînant la mort des souris (Li 2005, Li 2011). Lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisses, ces mêmes souris *Pemt*^{-/-} développent différentes pathologies hépatiques et biliaires, comme la NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) (Presa 2019) ou des cholestases (Wan 2019). Chaque voie de synthèse de la PC est soumise à une régulation bien spécifique. Ainsi la voie CDP-choline est essentiellement modulée par la régulation d'une de ses enzymes, la phosphocholine cytidyltransferase (CTP). Il existe plusieurs niveaux de régulation de la CTP (Cornell 2015) :

- Transcriptionnel : L'expression de la CTP est activée par les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 (Specificity protein 1 et 3) qui régulent positivement la transcription de son gène.
- Phosphorylation : Il a été montré que la phosphorylation de CTP conduit à son accumulation sous forme inactive dans le cytoplasme, alors que l'action de phosphatases va permettre sa translocation à la membrane sous forme active.

La voie PEMT est régulée de différentes façons. Comme pour de nombreuses enzymes, la quantité de substrats de l'enzyme est régulatrice de son activité. D'autre part, des facteurs de transcription, Sp1 et AP-1 ont été identifiés respectivement comme inhibiteurs et activateurs de la transcription de la PEMT. De plus, plusieurs études ont montré un rôle des œstrogènes. En effet, l'expression de la PEMT augmente de façon dose-dépendante lorsque des hépatocytes murins et humains sont traités pendant 24h au 17-β-œstrogène, une hormone sexuelle de la famille des œstrogènes et dérivée du métabolisme du cholestérol (Vance 2013).

Le cholestérol

Le cholestérol est une molécule rigide contenant un noyau stéroïde hydrophobe à quatre cycles carbonés, et une tête hydrophile (groupe -OH) (Figure 9). C'est un acteur indispensable des structures et du fonctionnement cellulaire. Il est en effet un composant majeur des membranes cellulaires, un précurseur d'hormones stéroïdiennes, des acides biliaires et de vitamines (Cerqueira 2016).

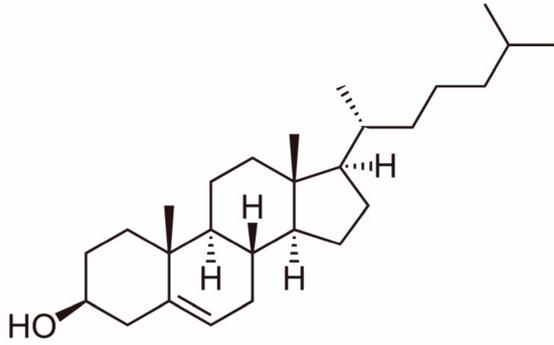


Figure 9 : Structure du cholestérol.

Le cholestérol est une molécule composée de quatre cycles carbonés constituant le noyau stéroïde, et d'une tête hydrophile (fonction -OH). D'après (Zhou 2009).

Le cholestérol présent dans notre organisme provient de deux sources, l'alimentation et la synthèse *de novo*. Toutes les cellules de notre organisme sont capables de synthétiser du cholestérol, néanmoins seul le foie peut l'éliminer en le sécrétant dans la bile ou en réalisant sa conversion en acides biliaires. Les hépatocytes peuvent non seulement réaliser cette synthèse *de novo*, mais ils expriment aussi des récepteurs spécifiques aux lipoprotéines, HDL et LDL, dont le rôle est de transporter le cholestérol alimentaire dans la circulation sanguine. C'est ce que l'on appelle le transport inverse du cholestérol (ou RCT), qui permet le retour du cholestérol des tissus extra-hépatiques vers le foie (Tosheska Trajkovska 2017). Le foie a donc un rôle capital dans le métabolisme du cholestérol.

La synthèse *de novo* est une suite de réactions enzymatiques, dont les deux principales sont :

- La formation de mévalonate par la condensation de deux acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA)
- La formation des unités isopréniques à partir du mévalonate

Bien que le cholestérol issu de la synthèse *de novo* participe à la composition de la bile, le cholestérol biliaire provient essentiellement de l'absorption du cholestérol transporté par les lipoprotéines plasmatiques (Zanlungo 2004).

Le cholestérol est éliminé par le foie grâce à deux voies. La première par l'intermédiaire des VLDL (Very Low Density Lipoproteins) qui sont des lipoprotéines riches en triglycérides, assurant la distribution de cholestérol et d'acides gras aux cellules des tissus périphériques. La seconde voie d'excrétion, qui est la voie majeure de dégradation du cholestérol, est son élimination par la bile. Il est éliminé soit directement en s'associant avec les acides biliaires et la phosphatidylcholine en micelles mixtes permettant son élimination dans les fèces, soit après sa conversion en acides biliaires (Dijkers 2010).

Les acides biliaires

Afin d'éliminer l'excès de cholestérol, qui est une molécule hydrophobe, les cellules utilisent différentes voies enzymatiques. Le mécanisme majeur à l'origine du catabolisme du cholestérol est sa conversion dans le foie en acides biliaires amphiphiles, représentant 67% des constituants de la bile. Chez l'Homme adulte, environ 0,5 g de cholestérol est quotidiennement transformé en acides biliaires (Thomas 2008).

Les acides biliaires sécrétés au niveau du canalicule proviennent de deux sources différentes :

- Les acides biliaires primaires, synthétisés chaque jour *de novo* à partir du cholestérol (5%)
- Les acides biliaires secondaires modifiés par le microbiote intestinal et recyclés via la circulation entéro-hépatique (95%)

Les acides biliaires primaires principaux sont l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique. Ils sont conjugués à un acide aminé, glycine ou taurine, permettant de diminuer leur toxicité en augmentant leur hydrophilie. A pH physiologique, ce sont des anions qui se couplent avec un ion sodium, répondant alors au nom de « sels biliaires ». Les sels biliaires primaires sont : le glycocholate, le glycochérate, le taurocholate et le taurochérate.

Chez l'Homme, le ratio d'acides biliaires glyco- et tauro-conjugués est de 3 pour 1. En contexte pathologique, ce ratio peut être modifié par l'alimentation ou sous influence hormonale (Reshetnyak 2013). Les sels biliaires primaires sont sécrétés dans le canalicule grâce à des transporteurs ATP-dépendants (ABCB11/BSEP, Chapitres II et III) situés au niveau des membranes canaliculaires des hépatocytes. Une fois dans l'intestin, ils seront déconjugués et modifiés par la flore bactérienne, devenant alors des acides biliaires secondaires.

Les acides biliaires secondaires sont majoritairement représentés par les acides désoxycholiques et lithocholiques. Ils sont réabsorbés dans l'iléon et retournent jusqu'aux hépatocytes par le cycle entéro-hépatique (Figure 10). Grâce à un transport actif au niveau des membranes basolatérales des hépatocytes, les acides biliaires secondaires sont soit reconjugués comme les acides biliaires primaires, soit sulfoconjugués comme l'acide lithocholique transformé en acide ursodésoxycholique (UDCA) qui est considéré comme un acide biliaire tertiaire.

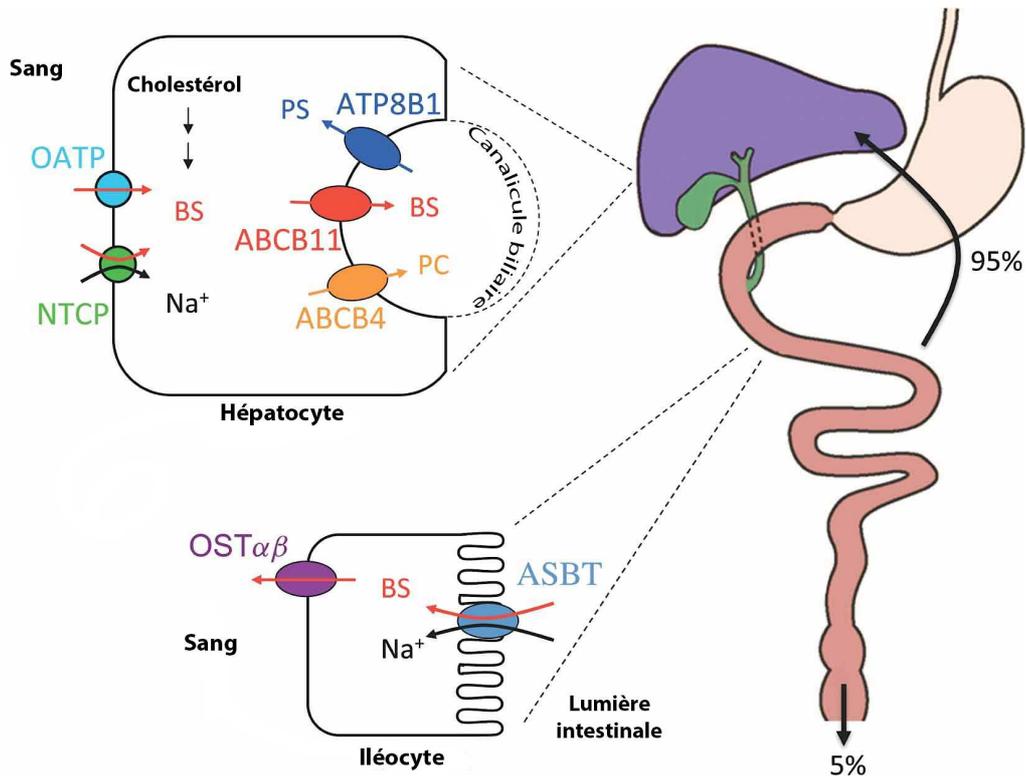


Figure 10 : Circulation entérohépatique des acides biliaires. Environ 95% des acides biliaires sont réabsorbés dans l'intestin au niveau de l'iléum grâce à un transporteur ATP-dépendant localisé à la membrane apicale des iléocytes appelé ASBT. Ils sont transportés dans le sang sous forme de complexe avec l'albumine à l'aide du transporteur OST $\alpha\beta$ et rejoignent le foie par la veine porte. Ils pénètrent dans les hépatocytes via leurs membranes sinusoidales avec l'aide de différents transporteurs, OATP, NTCP, MRPs... NTCP : Na-Taurocholate Co-Transport polypeptide ; OATP : Organic Anion Transporting Polypeptides ; ABCB4 et ABCB11 : ATP Binding Cassette sous famille B membres 4 et 11 respectivement. D'après (Nicolaou 2012)

Structurellement, les acides biliaires appartiennent à la famille chimique des stéroïdes avec un noyau stérane hydrophobe à 4 cycles (Figure 11). Ils sont amphiphiles, constitués de :

- Une extrémité polaire où a lieu la conjugaison avec la taurine ou glycine
- Une extrémité apolaire, le noyau hydrophobe du cholestérol
- Une face polaire avec des fonctions alcool
- Une face apolaire avec des groupes méthyles (CH₃-)

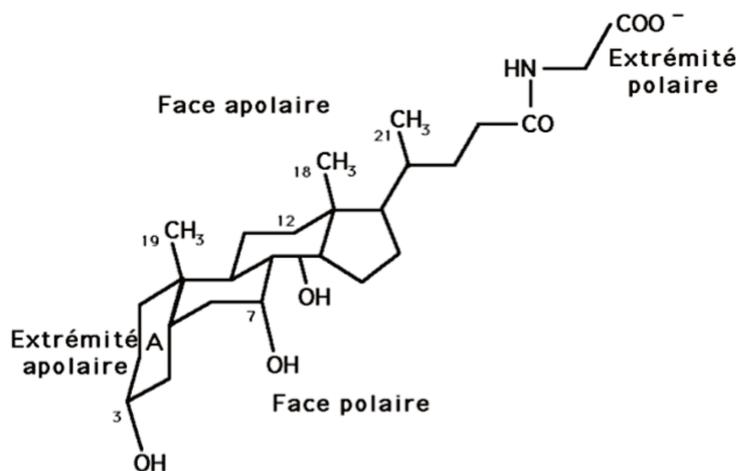


Figure 11 : Exemple de structure d'un acide biliaire, ici le glycocholate.

On observe 4 cycles, des fonctions alcool (-OH) hydrophiles et des groupes méthyles (CH₃-) hydrophobes. L'extrémité polaire présente un acide aminé taurine ou glycine selon l'acide biliaire.

Biosynthèse des acides biliaires

Il existe deux voies de synthèse des acides biliaires, la voie principale dite classique (neutre) et la voie alternative (acide). Les réactions enzymatiques successives nécessaires à la synthèse *de novo* des acides biliaires ont lieu dans différents compartiments hépatocytaires : cytosol, réticulum endoplasmique, mitochondrie, peroxyosome. Il ne faut pas moins de 17 enzymes et réactions successives pour réaliser la transition du cholestérol en acides biliaires glyco- ou tauro-conjugués. Les enzymes impliquées dans les réactions d'oxydation font pour la plupart partie de la famille protéique du cytochrome P450 (CYP).

Dans la voie classique, l'enzyme limitante initiant la synthèse est la 7 α -hydroxylase (ou cytochrome P450 7A1/CYP7A1) (Figure 12), exprimée exclusivement dans le foie, en particulier au niveau du réticulum endoplasmique. Cette enzyme réalise une hydroxylation du cholestérol. La voie alternative débute également par l'hydroxylation du cholestérol mais grâce à la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1), localisée au niveau des mitochondries. Ces deux voies mèneront à la synthèse des acides biliaires primaires décrits ci-dessus, l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique, selon les enzymes impliquées dans la suite de la synthèse. C'est l'enzyme stérol 12 α -hydroxylase CYP8B1 qui sera déterminante quant à leur distribution. Si elle est active, le produit de la réaction sera de l'acide cholique, sinon de l'acide chénodésoxycholique sera synthétisé. Elle détermine donc le ratio acide cholique / acide chénodésoxycholique (Chiang 2009). Pour finaliser la synthèse, la chaîne latérale du cholestérol est oxydée dans les mitochondries puis raccourcie au niveau des peroxyosomes.

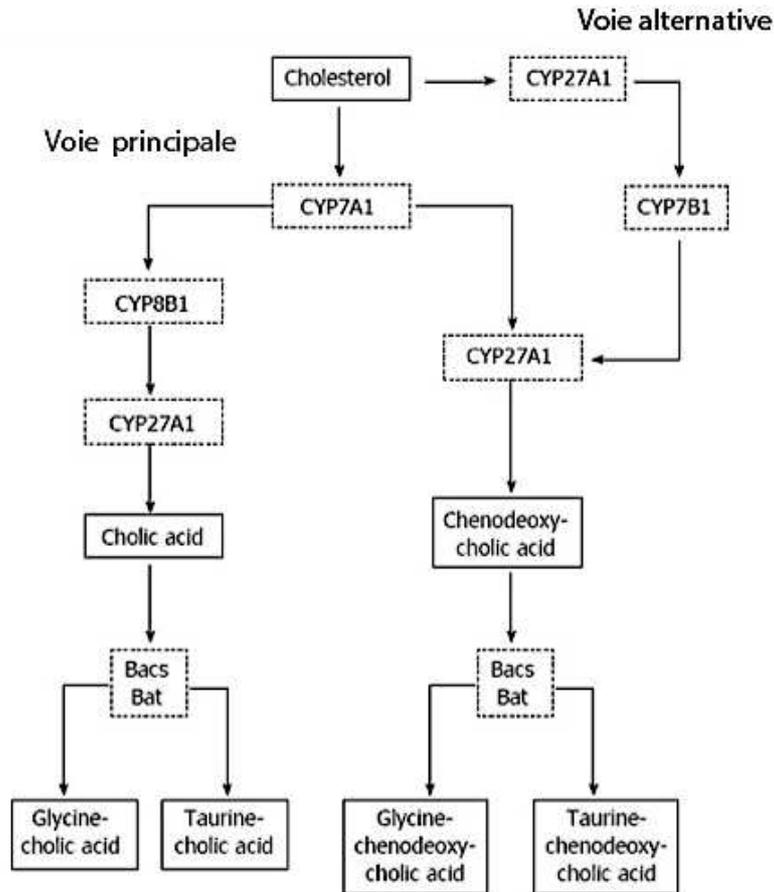


Figure 12 : Voies de synthèse des acides biliaires chez l’Homme. Deux voies différentes mènent à la synthèse des acides biliaires : la voie classique ou la voie alternative. Elles permettent toutes deux de synthétiser l’acide cholique et l’acide chénodésoxycholique qui seront ensuite glyco- ou tauro-conjugués. Les enzymes sur le schéma sont les suivantes : CYP7A1 : Enzyme cholestérol-7 α -hydroxylase ; CYP27A1 : Mitochondrial stérol 27 hydroxylase ; CYP7B1 : 7 α -hydroxylase ; CYP8B1 : Stérol 12 α -hydroxylase. D’après (Reshetnyak 2013)

Régulation de la synthèse des acides biliaires et du cholestérol

Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la synthèse des acides biliaires sont soumis à un contrôle strict de leur expression. La régulation de la synthèse des acides biliaires est étroitement liée à celle du cholestérol. Lorsque la quantité d’acides biliaires augmente, leur synthèse est inhibée par une boucle de régulation négative diminuant l’expression des enzymes CYP7A1 et CYP8B1. Au contraire, l’augmentation de la quantité de cholestérol active la synthèse biliaire au travers de l’expression de CYP7A1.

Les facteurs de transcription contrôlant l’expression des gènes CYP7A1 et CYP8B1 ont été identifiés dans les années 1980 (Russell 2003). Il s’agit d’une classe de récepteurs nucléaires appelée Farnesoid X Receptor (ou FXR), fortement exprimés dans le foie et les intestins. Il en existe plusieurs, ceux qui sont essentiellement impliqués sont FXR, LXR, RXR, SHP.

Lorsque les acides biliaires sont présents en excès, ils vont se fixer dans le cytoplasme sur le récepteur FXR. Le complexe va alors être transloqué dans le noyau où il va former un hétérodimère avec un autre ensemble récepteur-ligand. Cet hétérodimère peut alors se fixer sur un promoteur et activer la transcription du récepteur nucléaire Short Heterodimeric Partner-1 ou SHP-1. SHP-1 peut donc se lier avec un troisième récepteur nucléaire, LRH-1, et l'inhiber. Lorsque LRH-1 est libre, il active la transcription des gènes codant pour CYP7A1 et CYP8B1, donc la synthèse des acides biliaires. Une fois LRH-1 rendu inactif par SHP-1, les enzymes nécessaires à la voie classique de synthèse *de novo* des acides biliaires sont absentes et cette synthèse diminue (Chiang 2009, Russell 2009).

L'accumulation de cholestérol va déclencher une augmentation de la synthèse des acides biliaires. Des dérivés du cholestérol, les oxystérols, vont se fixer sur LXR α (Liver X Receptor α) qui, sous forme libre, va activer la transcription des gènes codant pour CYP7A1 et CYP8B1 et donc la synthèse des acides biliaires (Russell 2009) (Figure 13).

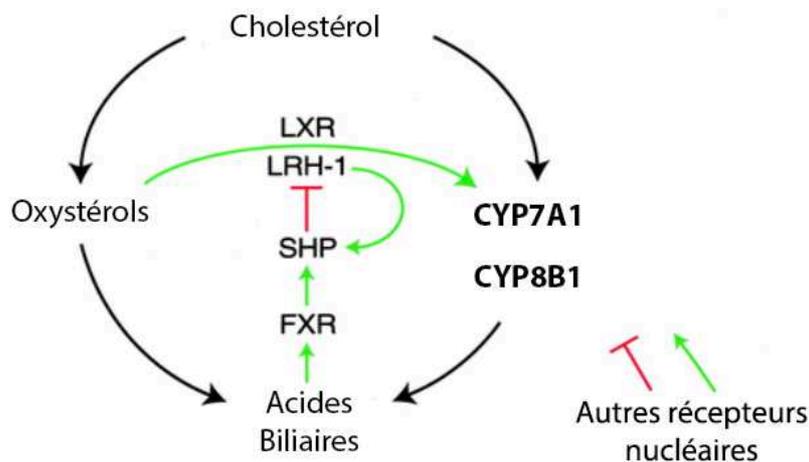


Figure 13 : Régulation de la synthèse des acides biliaires. Les flèches noires indiquent les voies de synthèse du cholestérol. En vert, sont représentées les régulations positives et en rouge les régulations négatives. LXR: Liver X Receptor; LRH-1: Liver Receptor Homologue-1; SHP: Short Heterodimer Partner; FXR: Farnesoid X Receptor. D'après (Russell 2003)

FXR comme LXR α doivent s'hétérodimériser avec un récepteur RXR (Retinoid X Receptor) pour réguler positivement ou négativement la transcription de gènes impliqués dans la synthèse des acides biliaires. D'autres gènes comme ceux des transporteurs impliqués dans la sécrétion des composants de la bile sont également sous le contrôle transcriptionnel de ces récepteurs (Chapitre III).

Le contrôle transcriptionnel de la synthèse des acides biliaires est donc étroitement lié au catabolisme du cholestérol et à la quantité d'acides biliaires. La circulation entéro-hépatique joue un rôle clé dans ce contrôle puisque 95% des acides biliaires sécrétés seront réacheminés de l'intestin jusqu'aux hépatocytes qui, sous l'effet de LXR, synthétiseront des acides biliaires *de novo* pour combler les 5% perdus dans les fèces (Hoffman 2009).

I.3.4. Formation des micelles mixtes

Les sels biliaires, les phospholipides et le cholestérol sont sécrétés par le foie pour former la bile puis stockés dans la vésicule biliaire sous forme de micelles mixtes en dehors des repas.

Différents types de micelles mixtes

Par définition, les micelles sont des agrégats de molécules amphiphiles sous forme sphéroïdale. L'un des facteurs régissant la formation des micelles est la Concentration Micellaire Critique ou CMC. La CMC dépend de la concentration en acides biliaires et du type d'acides biliaires présents (acide cholique, désoxycholique, lithocholique) (Madenci 2010).

Les acides biliaires peuvent s'auto-assembler, leurs faces hydrophobes se collant pour former des agrégats avec un noyau central hydrophobe et une surface hydrophile au contact de l'eau, ce sont des micelles simples, dites « primaires ». Les phospholipides (essentiellement la PC) et des molécules de cholestérol vont alors s'y ajouter, formant des micelles de taille plus importante, permettant ainsi d'augmenter la solubilité du cholestérol (Di Ciaula 2013). On retrouve deux types de structure : des micelles mixtes et des vésicules unilamellaires selon la concentration en acides biliaires et phospholipides. Si la concentration de phospholipides est élevée, on retrouve surtout des vésicules unilamellaires, contenant peu d'acides biliaires, mais lorsque la concentration en acides biliaires augmente, ces vésicules sont désagrégées au profit de la formation de micelles mixtes plus ou moins grandes (Figure 14). Ces structures, micelles mixtes ou vésicules lamellaires sont moins détergentes vis-à-vis des membranes que les micelles simples. Les micelles simples sont petites (3nm) et permettent de ne solubiliser qu'une petite quantité de cholestérol, contrairement aux micelles mixtes, plus grandes (4 à 8 nm de diamètre) qui peuvent solubiliser plus de cholestérol.

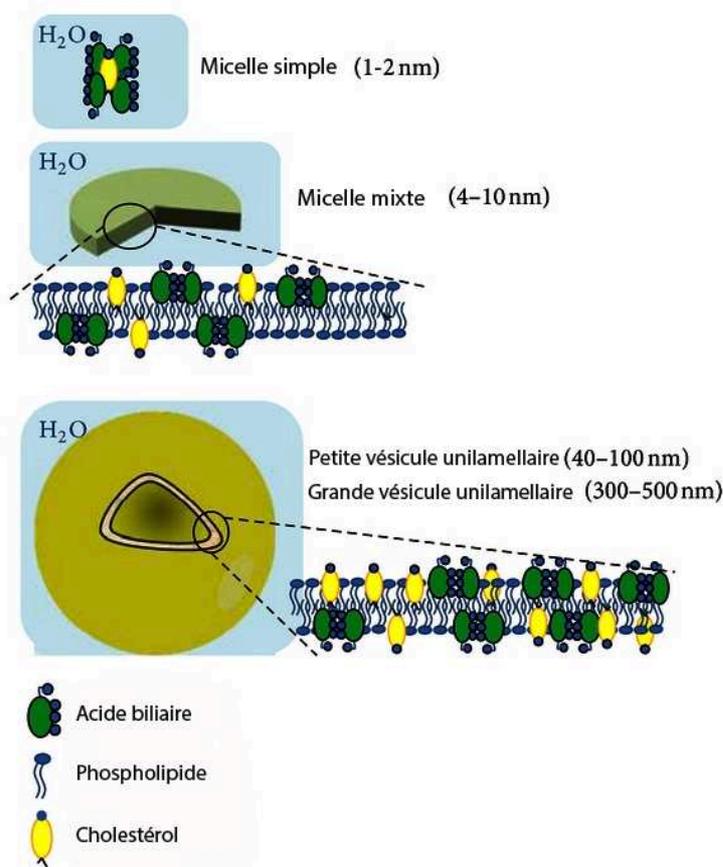


Figure 14 : Structures des types de micelles et vésicules présentes dans la bile. L'association des trois composants principaux de la bile permet de former des structures micellaires ou vésiculaires. Les micelles simples sont petites et ne peuvent solubiliser qu'une petite quantité de cholestérol. Les micelles mixtes, plus grandes, facilitent l'élimination du cholestérol. Les vésicules sont de grandes structures sphériques comprenant peu d'acides biliaires et beaucoup de phospholipides et cholestérol. D'après (Di Ciaula 2013)

La diagramme d'Admirand et Small

La formation de vésicules ou micelles mixtes stables n'est possible que si chaque composant est présent dans une proportion précise. Ces proportions ont été déterminées et décrites par les travaux d'Admirand et Small, dans les années 1960. Ils ont étudié la composition de la bile prélevée chez des patients souffrant de troubles biliaires ou de patients contrôles (Admirand 1968). Pour obtenir une bile physiologique « normale », avec une seule phase micellaire, il faut 80% d'acides biliaires, 15% de phospholipides (PC) et 5% de cholestérol. Cette composition correspond à la zone de solubilisation maximale du cholestérol. Selon le composant faisant défaut dans la composition biliaire, on peut décrire trois zones où la bile diffère (Figure 15). Dans chaque cas, ce déséquilibre donne lieu à la formation d'au moins deux phases dans la bile avec l'apparition de cristaux de cholestérol qui vont obstruer les voies biliaires. La bile est alors lithogène et on observe le développement de cholestases chez les patients.

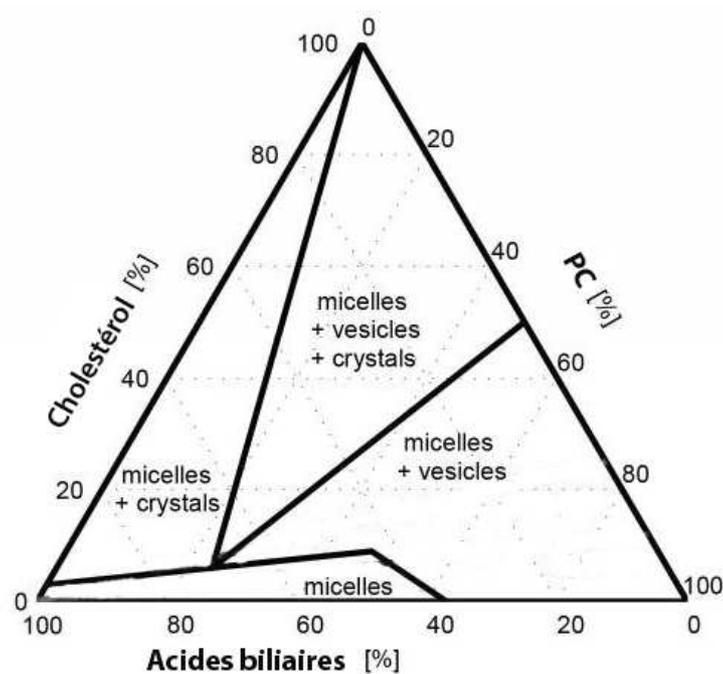


Figure 15 : Diagramme d'Admirand et Small. Ce diagramme montre les états possibles de la bile selon les proportions en cholestérol, acides biliaires et phosphatidylcholine (PC). Chaque côté du triangle correspond au pourcentage en cholestérol, acides biliaires ou PC. La bile normale contient 80% d'acides biliaires, 15% de phosphatidylcholine et 5% de cholestérol pour une solubilisation maximale du cholestérol. D'après (Eckstein 2018)

I.3.5. Devenir de la bile

Entre les repas, la bile est stockée dans la vésicule biliaire où elle subit ses dernières modifications. La vésicule biliaire est reliée au foie et au duodénum. Lors d'un repas, un muscle du canal cholédoque (reliant la vésicule biliaire au duodénum) appelé sphincter d'Oddi, se relâche. Lorsque le bol alimentaire arrive au niveau du duodénum, la vésicule biliaire va alors se contracter sous l'effet d'hormones intestinales telles que la cholecystokinine et le FGF15/19 entraînant le déversement de la bile dans le duodénum via le canal cholédoque (Figure 16).

En absorbant l'eau, les cellules épithéliales de la vésicule biliaire vont concentrer la bile jusqu'à dix fois. Elles peuvent également sécréter des mucines et des ions bicarbonates qui permettent de protéger les épithéliums du caractère détergent des acides biliaires (Housset 2016).

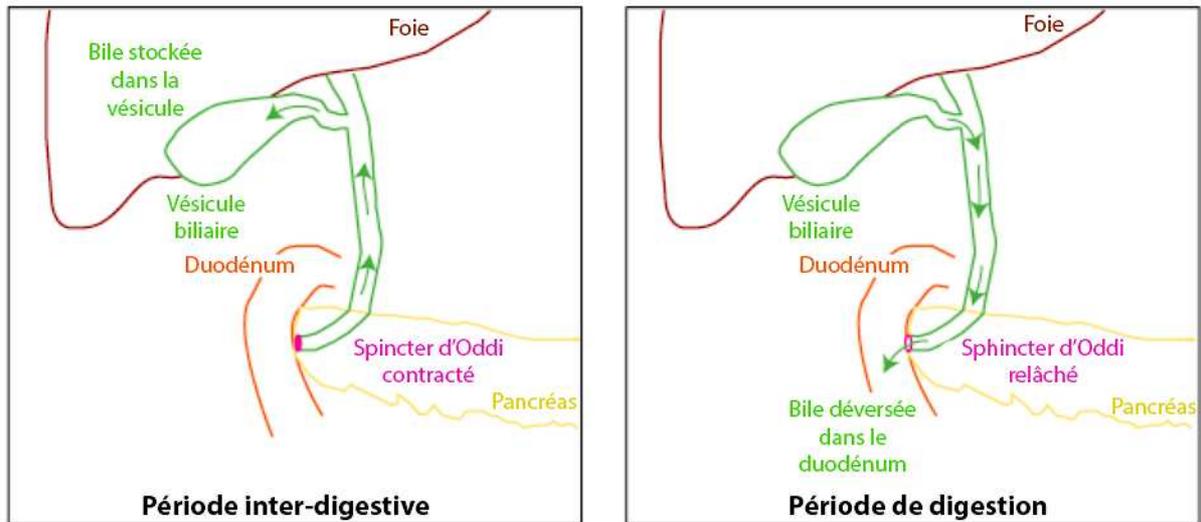


Figure 16 : Devenir de la bile en période de jeûne ou de digestion. Lorsque le sphincter d'Oddi est contracté, la bile reste stockée dans la vésicule biliaire où elle est concentrée. Suite à un repas, le Sphincter d'Oddi va se relâcher sous l'effet d'hormones, la bile est alors déversée au niveau du duodénum pour faciliter la digestion. D'après (<https://courses.washington.edu/conj/bess/bile/bile.html>)

Chapitre II – Transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire

Depuis plusieurs années, de nombreuses protéines de transport impliquées dans la sécrétion biliaires ont été identifiées. Ces transporteurs sont surtout exprimés dans les hépatocytes, répartis entre leurs membranes apicales et basolatérales.

II.1. Transporteurs hépatocytaires

II.1.1. Basolatéraux

Le pôle basolatéral ou sinusoidal des hépatocytes représente la surface de contact entre hépatocytes et sang. Il s'agit donc d'une importante zone d'échanges où les hépatocytes peuvent faire entrer de façon sélective différents composés, qui seront ensuite sécrétés dans la bile. La bile est également un lieu de sécrétion permettant d'éviter l'accumulation de substances toxiques dans les cellules. On retrouve principalement deux familles de transporteurs aux membranes basolatérales des hépatocytes, la famille des transporteurs SLC (Solute Carrier transporter) et la famille des transporteurs ABC (Figure 17).

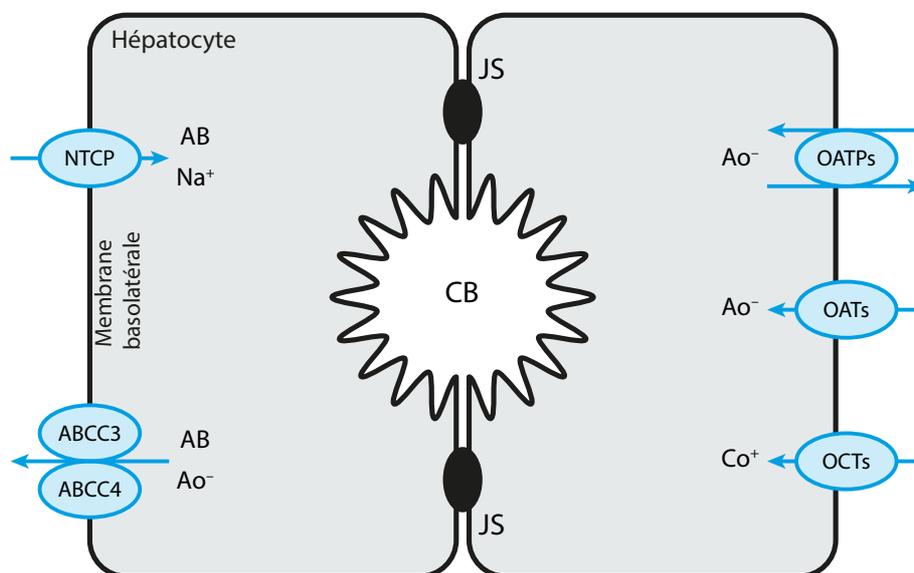


Figure 17 : Transporteurs hépatocytaires exprimés aux membranes basolatérales. Les transporteurs situés au pôle basolatéral des hépatocytes peuvent avoir un rôle d'import, NTCP : Sodium-Taurocholate Cotransporting Polypeptide ; OATPs : Organic Anion Transporting Polypeptides ; OATs : Organic Anion Transporters ; OCT1 : Organic Cation Transporter 1, ou d'export : OST α/β : Organic Solute Transporter ; ABCC3 : ATP Binding Cassette subfamily C member 3 et ABCC4 : ATP Binding Cassette subfamily C member 4. AB : Acides biliaires ; Ao⁻ : Anions organiques ; Co⁺ : Cations organiques ; CN : Canalicule biliaire ; JS : Jonctions serrées.

Les transporteurs SLC

La superfamille des transporteurs de solutés, ou SLC, est la deuxième plus grande famille de protéines. Elle comporte plus de 400 membres rassemblés en 52 sous-familles (Perland 2017). Ces transporteurs permettent le passage de nombreuses molécules indispensables à l'homéostasie au travers des membranes cellulaires.

Le transporteur des acides biliaries NTCP

Environ 95% des acides biliaries sécrétés dans la bile sont réabsorbés par les hépatocytes après avoir subi le cycle entéro-hépatique. Cette réabsorption se fait de façon contrôlée grâce au transporteur NTCP (Sodium-TauroCholate Transporter), qui est un transporteur actif secondaire de type symport, exclusivement exprimé aux membranes basolatérales des hépatocytes. Ce transporteur utilise l'énergie d'un flux entrant de Na^+ maintenu grâce à une pompe Na^+/K^+ ATPase, ce qui permet l'entrée des acides biliaries conjugués dans les hépatocytes où ils seront ensuite transportés jusqu'au canalicule biliaire pour être sécrétés dans la bile (Kosters 2008).

L'expression de NTCP est régulée par de nombreux signaux, on peut citer FXR-SHP pour l'inhibition de son expression et SHP, HNF-1 α , HNF-4 α pour sa régulation positive. Dans un contexte cholestatique, il a été montré que l'expression de NTCP pouvait être diminuée (Baghdasaryan 2014). Les premières variations de NTCP responsables de pathologies n'ont été publiées que très récemment, en 2015 (Vaz 2015). On observe principalement une élévation des acides biliaries sanguins, ou hypercholanémie, qui peut être accompagnée d'une jaunisse, d'une élévation des valeurs plasmatiques de la bilirubine conjuguée et des transaminases (Tan 2018, Vaz 2015).

Les transporteurs OATPs (famille SLC0)

Le premier transporteur OATP (Organic Anion Transporting Polypeptides) a été identifié en 1994 chez le rat (Jacquemin 1994). Depuis cette découverte, on compte 11 transporteurs OATPs répartis en 6 familles chez l'Homme. Les OATPs ont de nombreux substrats : anions organiques, xénobiotiques, composés endogènes... Au niveau des membranes basolatérales des hépatocytes, ils permettent de transporter les acides biliaries non conjugués, le glutathion (GSH), la bilirubine non conjuguée ou encore les ions bicarbonates de façon sodium-indépendante (Boyer 2013).

Les transporteurs OATs (famille SLC22)

Les transporteurs OATs (Organic Anion Transporter) transportent des composés de plus petits poids moléculaires que les OATPs. OAT2 est fortement exprimé dans le foie, exclusivement au niveau des membranes sinusoidales des hépatocytes. Il transporte essentiellement des anions organiques hydrophiles mais aussi des hormones stéroïdiennes (Lozano 2018).

Les transporteurs OCTs (famille SLC22)

A l'inverse des OATs, les OCTs (Organic Cation Transporter) transportent des cations. Au niveau des hépatocytes on trouve OCT1 et OCT3 exprimés au pôle basolatéral, où ils transportent des cations, des vitamines et certains xénobiotiques (Lozano 2018). L'expression de ces deux transporteurs est souvent diminuée dans le cadre de maladies cholestatiques.

Le transporteur OST α/β (famille SLC51)

Le transporteur OST α /OST β ne fonctionne que sous forme d'hétérodimère. Il est localisé aux membranes basolatérales des hépatocytes et des cholangiocytes. La sous-unité alpha doit être exprimée pour que la sous-unité bêta de l'hétérodimère trafique jusqu'à la membrane plasmique sinusoidale. De plus cette dimérisation augmente la stabilité du transporteur à la membrane (Li 2007). OST α/β excrète des acides biliaires et des stérols conjugués dans le sang. Au niveau transcriptionnel, ses sous-unités alpha et bêta sont régulées par FXR en fonction de la concentration intracellulaire en acides biliaires (en particulier l'acide cholique) (Zollner 2006). De plus, chez des patients atteints de cholangite biliaire primitive, OST α /OST β est surexprimé (Boyer 2006).

Les protéines d'export sinusoidales

Le transporteur ABCC3/MRP3

ABCC3 (ATP Binding Cassette subfamily C member 3), aussi appelé MRP3, est un transporteur actif primaire appartenant à la famille ABC exprimé à la membrane basolatérale des hépatocytes et des cholangiocytes. Il transporte entre autres la bilirubine et les acides biliaires glycoconjugués. ABCC3 a pour rôle de protéger les hépatocytes d'une accumulation toxique de certains composés en les sécrétant dans le sang. En contexte physiologique ce transporteur est peu exprimé mais son expression augmente lors de cholestases (Boyer 2009).

Le transporteur ABCC4/MRP4

ABCC4 (ATP Binding Cassette subfamily C member 4), aussi appelé MRP4, est également un membre de la famille ABC exprimé à la membrane basolatérale des hépatocytes. ABCC4 détient la même fonction qu'ABCC3 mais transporte les acides biliaires conjugués, en symport avec le GSH dans la circulation sanguine. Cela permet l'élimination rénale des acides biliaires conjugués et la protection des hépatocytes lorsqu'ils sont présents en quantité toxique (Rius 2006). Comme ABCC3, il est peu exprimé de façon basale mais surexprimé en contexte pathologique (Denk 2004).

II.1.2. Apicaux

Une fois entrés dans les hépatocytes, les acides biliaires, les ions et différents composés comme la bilirubine sont transportés jusqu'à la membrane apicale où différents transporteurs décrits ci-dessous assurent leur sécrétion dans le canalicule pour former la bile (Figure 18).

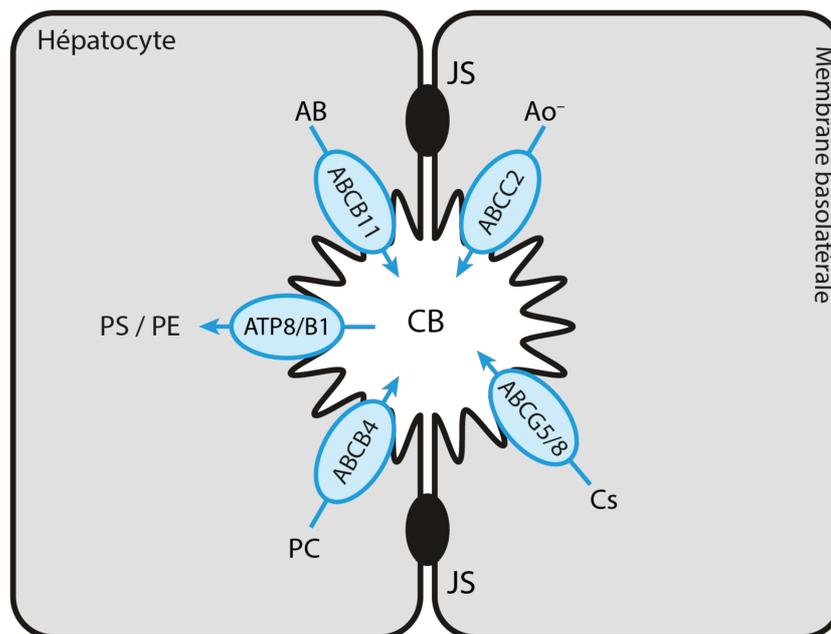


Figure 18 : Les principaux transporteurs hépatocytaires exprimés à la membrane apicale.

Les transporteurs ABCB4, ABCB11, ABCC2, ABCG5/G8 et la flippase ATP8/B1 assurent l'excrétion des phospholipides, acides biliaires, cholestérol et des anions organiques dans la bile au niveau du canalicule biliaire (en noir sur le schéma). ATP8/B1 flippe la PE et la PS. AB : Acides biliaires ; Ao⁻ : Anions organiques (bilirubine) ; Cs : Cholestérol ; PC : Phosphatidylcholine ; PE : Phosphatidyléthanolamine ; PS : Phosphatidylsérine ; CB : Canalicule biliaire ; JS : Jonctions serrées.

ABCB4 / MDR3

ABCB4 (ATP Binding Cassette subfamily B member 4), aussi appelé MDR3, est un transporteur actif exclusivement exprimé à la membrane canaliculaire des hépatocytes. Il contribue à la formation d'une bile homogène constituée de micelles mixtes en sécrétant de la phosphatidylcholine (PC) grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Bien qu'il ait une forte spécificité pour son substrat, la PC, il peut également sécréter certains xénobiotiques. ABCB4 montre une forte identité avec un autre transporteur ABC, ABCB1/MDR1, exprimé au niveau du canalicule (mais aussi dans d'autres type cellulaires) où il confère une résistance des cellules aux médicaments en sécrétant un très large groupe de substrats, cations, médicaments, toxines, hormones (Falguières 2014). ABCB4 sera vu en détails dans le Chapitre III.

ABCB11 / BSEP

ABCB11 est une glycoprotéine exprimée uniquement au niveau des canalicules. Ce transporteur ATP dépendant est responsable de la sécrétion des acides biliaires primaires au niveau du canalicule, à l'origine du flux biliaire dépendant des acides biliaires (BADFc). Plusieurs pathologies sont reliées à un défaut d'ABCB11. La plus sévère est la PFIC2 ou Cholestase Progressive Familiale de type 2 dont les symptômes apparaissent généralement dès la naissance, les nouveau-nés étant atteints d'une jaunisse et d'un prurit. La PFIC2 évolue vers l'insuffisance hépatique et/ou vers un carcinome hépatocellulaire (CHC). La transplantation hépatique reste le plus souvent la seule option pour les malades. La maladie biliaire BRIC2 (Cholestase Intrahépatique Récurrente Bénigne de type 2) fait également suite à un défaut d'ABCB11 mais son phénotype est atténué par rapport à la PFIC2. En fin de grossesse, des variations d'ABCB11 peuvent donner lieu à des cholestases gravidiques (Alrefai 2007).

ABCG5/8

L'hétérodimère ABCG5/ABCG8 permet de sécréter le cholestérol et les phytostérols au niveau du canalicule. Le cholestérol y formera des micelles mixtes avec la PC et les acides biliaires, permettant son élimination de l'organisme. Cet hétérodimère est aussi exprimé au pôle apical des entérocytes, où il limite l'absorption des stérols en les sécrétant de nouveau dans la lumière de l'intestin (Woodward 2011). Des souris avec une extinction des gènes codant pour ABCG5 et ABCG8 montrent une accumulation de cholestérol dans le foie et une diminution drastique (70% à 90%) du cholestérol biliaire (Yu 2002). Chez l'Homme, la mutation d'un des deux gènes, ABCG5 ou ABCG8 est associée à des lithiases et à une pathologie appelée sitosterolémie

dans laquelle une concentration anormalement élevée de stérols végétaux est retrouvée dans le plasma des patients (Lambert 2001).

[ABCC2 / MRP2](#)

C'est un transporteur unidirectionnel exprimé à la membrane apicale de différents types cellulaires, dont les hépatocytes. Il transporte de nombreux substrats comme des anions inorganiques, en particulier la bilirubine conjuguée qui sera éliminée grâce à la bile, évitant ainsi son accumulation toxique. Les défauts d'ABCC2 se caractérisent par le syndrome de Dubin-Johnson auquel est liée une hyper bilirubinémie chronique (Talaga 2019).

[ATP8/B1 / FIC1](#)

ATP8/B1 est une flippase ATP dépendante de la famille des P4-ATPases. Elle ne transporte pas de composant biliaire mais permet le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique en transloquant la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine (PS et PE) du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane du canalicule. Ce transfert d'un feuillet vers l'autre permet de compenser l'asymétrie due à la sécrétion de PC par ABCB4 et de stabiliser la membrane plasmique pour faire face au caractère détergent des acides biliaires. Deux maladies sont associées à des variations génétiques d'ATP8/B1, la PFIC1 (Cholestase Progressive Familiale de type 1) et la BRIC1 (Cholestase Intrahepatique Récurrente Bénigne de type 1) (Nicolaou 2012).

II.2. Autres transporteurs

[ABCC7/CFTR](#)

Le canal chlorure CFTR est exprimé à la membrane apicale des cholangiocytes. Il contribue à modifier la composition de la bile ductulaire (Cohn 1993). En réponse à une hormone, la sécrétine, l'AMPc va activer le canal chlore CFTR permettant la sécrétion des ions bicarbonates qui vont alcaliniser la bile. Des maladies du foie sont d'ailleurs liées à des défauts de CFTR et de nombreux patients atteints de mucoviscidose présentent des troubles hépatiques comme une inflammation ductulaire due au dysfonctionnement du canal d'ions chlorures (Fiorotto 2016).

II.3. Régulation de l'expression des transporteurs hépatocytaires impliqués dans la sécrétion biliaire

La sécrétion biliaire est contrôlée grâce à la régulation de l'expression des différents transporteurs hépatocytaires. Différents facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de ces transporteurs et détaillés ci-dessous dans le Tableau 1. Le récepteur nucléaire des acides biliaires FXR est très impliqué dans ces mécanismes de régulation (Alrefai 2007, Geier 2007, Karpen 2002). Par exemple, pour ABCB11, FXR forme un hétérodimère avec RXR qui se lie sur l'élément de réponse de FXR appelé IR-1 (Inverse Repeat 1) du promoteur d'ABCB11 (Alrefai 2007). L'augmentation de la concentration intracellulaire en acides biliaires, en particulier les acides choliques et chénodésoxycholiques, va activer FXR et donc la synthèse d'ABCB11. D'autres facteurs de transcription sont impliqués comme le récepteur nucléaire LRH-1, également un activateur de la transcription d'ABCB11 (Baghdasaryan 2014). Les mécanismes de régulation de l'expression membranaire et de l'activité des transporteurs hépatocytaires sont donc très variés et résumés dans le Tableau 1.

De nombreux mécanismes post-traductionnels peuvent aussi réguler l'expression membranaire et l'activité des transporteurs hépatocytaires. Ceux concernant les transporteurs ABC canaliculaires seront détaillés dans le Chapitre V.

	Transporteur	Facteur de transcription	Ligands	Type de régulation	Implication physiologique
Transporteurs Basolatéraux	NTCP	HNF1 α	--	+	↑ Absorption hépatocytaire acides biliaires
		HNF3 β	--	+	
		HNF4 α	--	+	
		GR	Glucocorticoïdes	+	
		STAT5	Prolactine	+	
		RAR α	Rétinoïdes	+	
			IL-1	-	
		FXR	Ac. Biliaires	-	↓ Absorption hépatocytaire acides biliaires
		SHP	Activé / FXR Inhibe LRH1	-	
	CAR	--	-		
	OATs	HNF1 α	--	+	--
		HNF4 α	--	+	
	OCTs	HNF1 α	--	+	--
		HNF4 α	--	+	
		SHP	Activé / FXR	-	--
		CAR	--	-	
	OATPs	HNF1	--	+	↑ Absorption hépatocytaire acides biliaires
		HNF4 α	--	+	
		FXR	Ac. Biliaires	+	
		SHP	Activé / FXR	-	↓ Sécrétion acides biliaires
	OST α/β	FXR	Ac. Biliaires	+	↑ Sécrétion acides biliaires
		LXR	Oxystérols	+	
		LRH1	Phospholipides	+	
	ABCC3/MRP3	LRH1	Phospholipides	+	↓ acides biliaires intracellulaires //
		RAR α	Rétinoïdes	+	
		VDR	Vitamine D	+	↑ export acides biliaires
		CAR	Bilirubine	+	
PPAR α		Fibrates	+		
ABCC4/MRP4	FXR	Ac. Biliaires	+	↓ acides biliaires intracellulaires //	
	CAR	Bilirubine	+		
	PPAR α	Fibrates	+		
					↑ export acides biliaires

Transporteurs Apicaux	ABCB4/MDR3	LXR	Oxystérols	+	↑ Sécrétion PC donc sécrétion biliaire
		PPAR α	Fibrates	+	
		THR β 1	T3	+	
		FXR	Ac. Biliaires	+	↓ Sécrétion PC et cholestase
	Progestérone		-		
	ABCB11/BSEP	FXR	Ac. Biliaires	+	↑ Sécrétion acides biliaires
		LRH1	Potentiateur de l'activation de FXR	+	
		Nrf2	--	+	
		CAR	--	+	
		SHP	Activé / FXR	-	↓ Sécrétion acides biliaires
	ABCC2/MRP2	FXR	Ac. Biliaires	+	↑ Sécrétion biliaire
		RAR α	Rétinoïdes	+	
			IL-1	-	DILI, DJS
		CAR	Bilirubine	+	↑ Sécrétion biliaire
	ABCG5/G8	LXR	Oxystérols	+	↑ Élimination du cholestérol // ↑ flux biliaire
		FXR	Ac. Biliaires	+	

Tableau 1 : Facteurs de transcription impliqués dans la régulation des transporteurs hépatocytaires. Les transporteurs impliqués dans l'export sont représentés en vert, ceux impliqués dans l'import en rouge. D'après (Alrefai 2007, Geier 2007, Halilbasic 2013, Jung 2003, Karpen 2002, Klaassen 2010, Lu 2000, O'Brien 2013).

Chapitre III – Superfamille des transporteurs ABC

III.1. Structure et motifs conservés

La superfamille des transporteurs ABC est la plus vaste famille de protéines transmembranaires d'import et d'export commune au vivant (procaryotes, eucaryotes, plantes). Chez l'Homme, on recense 48 transporteurs ABC dont la majorité correspond à des exporteurs qui transportent le substrat de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Les transporteurs ABC sont classés en 7 familles de ABC-A à G et possèdent une structure commune. Ils utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter une importante diversité de substrats au travers des membranes cellulaires (Ford 2019).

Les transporteurs ABC ont un rôle fondamental dans de nombreux événements cellulaires : signalisation cellulaire, entrée de nutriments, détoxification (Dean 2002, Dean 2005, Higgins 1992). De nombreuses mutations dans ces transporteurs sont à l'origine de pathologies telles que la mucoviscidose (ABCC7), le syndrome de Dubin-Johnson (ABCC2), la résistance au cancer (ABCB1), la maladie de Stargardt (ABCA4), les cholestases (ABCB4, ABCB11), etc. (Dean 2002) (Tableau 1 Annexe).

III.1.1. Les transporteurs ABC : Une structure commune

Les transporteurs ABC sont classiquement constitués d'une unique chaîne polypeptidique divisée en quatre domaines. Certains transporteurs sont présents sous forme d'hémi-transporteurs et peuvent s'hétérodimériser pour assurer leur fonction, comme le tandem ABCG5/G8.

Les transporteurs ABC ont une structure de base commune composée de (Figure 20) :

- Deux domaines transmembranaires ou TMDs (pour TransMembrane Domain)
- Deux domaines de liaison à l'ATP ou NBDs (pour Nucleotide Binding Domain)

Chaque TMD est fortement hydrophobe car constitué de 6 à 11 hélices α transmembranaires qui sont reliées entre elles par des boucles extra- et intra-cytoplasmiques. Les TMDs forment le site spécifique de reconnaissance et de liaison du substrat, ils sont donc très variables selon le transporteur ABC. Il existe des exceptions dans les familles ABC-E et -F qui ne possèdent pas de TMDs.

Les NBDs sont quant à eux situés dans le cytoplasme. Ils se dimérisent pour former deux sites de liaison à l'ATP où celui-ci sera hydrolysé, fournissant ainsi l'énergie nécessaire à la

translocation du substrat. Il existe néanmoins des exceptions : CFTR ne possède qu'un site fonctionnel d'hydrolyse de l'ATP, l'autre site est dit « dégénéré ». L'ATP peut s'y lier mais ne sera pas hydrolysé (Aleksandrov 2001, Aleksandrov 2018).

La partie centrale reliant les deux « moitiés » (TMD1-NBD1 avec TMD2-NBD2) du transporteur est appelée domaine linker. Il s'agit d'une courte séquence impliquée dans le trafic intracellulaire, la stabilité membranaire, la dégradation ou la régulation de l'activité des transporteurs ABC (Ferreira 2013, Kolling 1997, Macalou 2016).

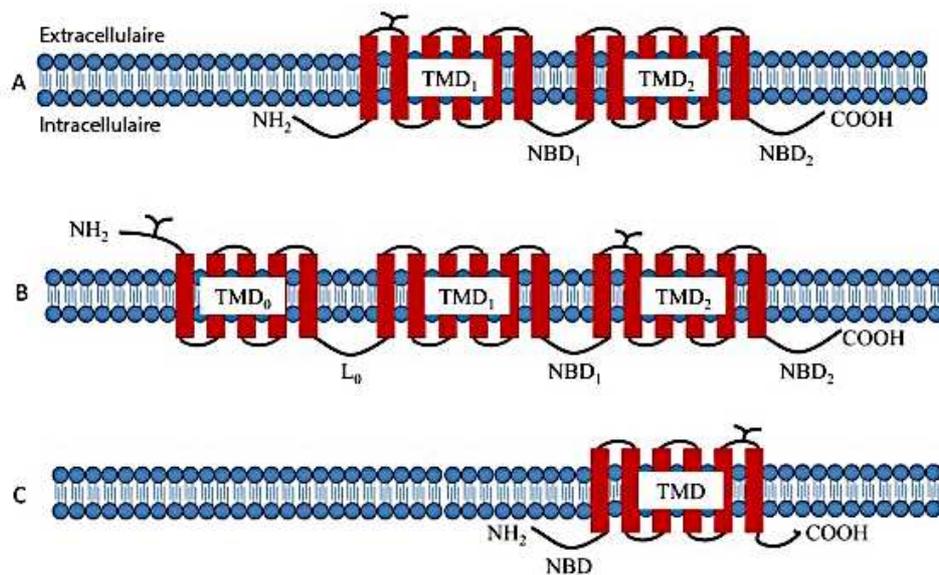


Figure 20 : Modèles d'organisation des transporteurs ABC. (A) Structure des transporteurs de sous familles ABCA, ABCB. (B) Certains membres des sous-familles ABCC et ABCB possèdent un domaine transmembranaire supplémentaire, TMD0. (C) Structure de transporteur de la famille ABCG qui sont des hémis-transporteurs dont le NBD est en N-terminal. D'après (Chen 2016)

Des transporteurs ont des domaines additionnels comme certains membres de la famille ABCC (ABCC-1, 2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12) dans laquelle les transporteurs ont un domaine transmembranaire supplémentaire en N-terminal appelé TMD0, nécessaire au trafic et à la régulation de l'activité (Deeley 2006) (Figure 20). Ce domaine TMD0 est aussi présent chez des membres de la famille ABCB, comme les transporteurs lysosomaux ABCB2, ABCB3, ABCB9, qui ont besoin de ce domaine pour être correctement localisés au niveau des lysosomes (Demirel 2010). ABCC7 / CFTR possède pour sa part un domaine supplémentaire appelé « domaine R » qui, lorsqu'il est phosphorylé par différentes kinases (PKA, PKC), régule l'ouverture du canal chlorure et permet le passage des ions Cl^- (Csanady 2019).

III.1.2. Les transporteurs ABC : Des domaines conservés

Les deux domaines de liaison à l'ATP situés dans les NBDs sont constitués de plusieurs motifs hautement conservés dans la famille ABC (Locher 2016) (Figure 21). On retrouve :

- **La signature ABC** avec la séquence consensus « **LSGGQ** » qui précède une longue hélice alpha. Les deux sites de liaison à l'ATP sont formés par des interactions entre le Walker A du NBD1 avec la signature du NBD2 (site 1) et la signature du NBD1 avec le Walker A du NBD2 (site 2). La signature épingle et oriente l'ATP au cours de son hydrolyse.
- **A-loop** : Elle contient un résidu aromatique conservé (généralement une tyrosine) dont la chaîne latérale aide à positionner l'ATP par stacking avec l'anneau de l'adénine.
- **Walker A / P-loop** : (**GXXGXGK-S/T**) il s'agit d'une boucle de liaison au phosphate qui contient un résidu lysine très conservé et où X est un acide aminé quelconque. La lysine forme un réseau d'interactions avec les β - et γ -phosphates de l'ATP.
- **Walker B** : (**$\Phi\Phi\Phi\Phi$ DE**, Φ étant un acide aminé hydrophobe) l'aspartate établit une liaison covalente avec le Mg^{2+} et le glutamate. Ce motif détient un rôle décisif dans l'hydrolyse de l'ATP.
- **D-loop** : Elle est située directement après le Walker B. Des changements de conformation dans cette boucle affectent la géométrie du site catalytique, aidant à former le site de liaison à l'ATP. Elle joue un rôle dans le couplage « hydrolyse de l'ATP / transport du substrat ».
- **H-loop** : Elle contient un résidu histidine fortement conservé qui interagit avec l'aspartate de la D-loop, le résidu glutamate du Walker B et le γ -phosphate de l'ATP. Cette histidine aide au positionnement de l'ion Mg^{2+} et à l'hydrolyse de l'ATP et stabilise le changement de conformation.
- **Q-loop** : Des résidus de cette boucle connectent les deux domaines de liaison à l'ATP et font le lien entre NBD et TMD.

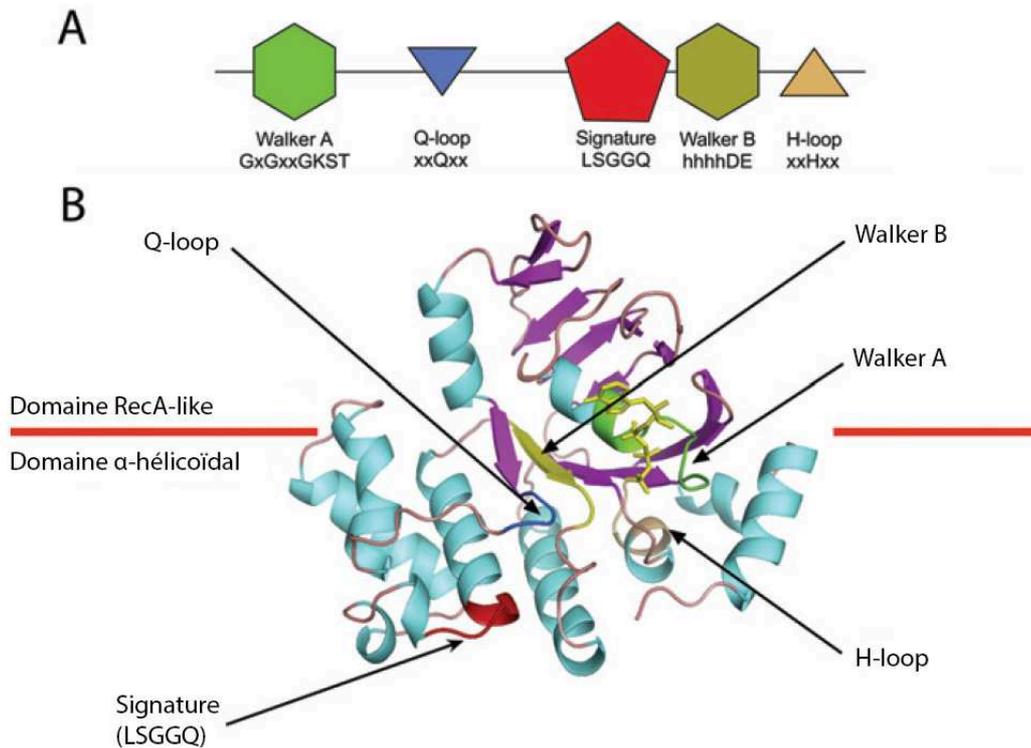


Figure 21 : Motifs conservés des transporteurs ABC. (A) Représentation linéaire des motifs caractéristiques des transporteurs ABC. Les polygones verts représentent les Walker A et B qui forment le domaine pour la liaison de l'ATP. Le pentagone rouge correspond à la signature dont la séquence « LSGGQ » est unique aux transporteurs ABC, et qui interagit aussi avec l'ATP. Les triangles sont équivalents à d'autres motifs conservés caractéristiques constitués d'un unique résidu, comme la Q-loop et la H-loop. (B) Localisation des motifs conservés d'un transporteur ABC. D'après (Dassa 2011)

III.1.3. Les transporteurs ABC : La fonction de transport

Selon les familles, différents mécanismes de transport sont à l'œuvre. Si l'on prend l'exemple de la famille B, on peut décrire ainsi le cycle de transport modélisé grâce à ABCB1 (Linton 2007, Locher 2016) (Figure 22) :

- Le transporteur est sous forme « inward-facing » les NBDs séparés, sans ATP ni substrat, la poche de liaison au substrat -ou cavité interne- est ouverte.
- Le substrat se fixe au niveau de son site de reconnaissance formé par les TMDs.
- Cette fixation induit un changement de conformation permettant d'augmenter l'affinité des NBDs pour l'ATP.
- Deux molécules d'ATP peuvent alors se fixer au niveau des sites de liaison à l'ATP.
- Les NBDs sont sous forme de dimères fermés ce qui génère de l'énergie nécessaire à la reconfiguration des TMDs.

- Les deux ATPs peuvent alors être hydrolysés : l'énergie de cette hydrolyse et la modification de la conformation du dimère fermé associées à la précédente reconfiguration des TMDs permettent la sécrétion du substrat.
- Les produits de l'hydrolyse, l'Adénosine Di-Phosphate (ADP) et le phosphate inorganique (Pi) sont libérés dans le cytoplasme, retour à la conformation « inward facing » ou dimère ouvert.

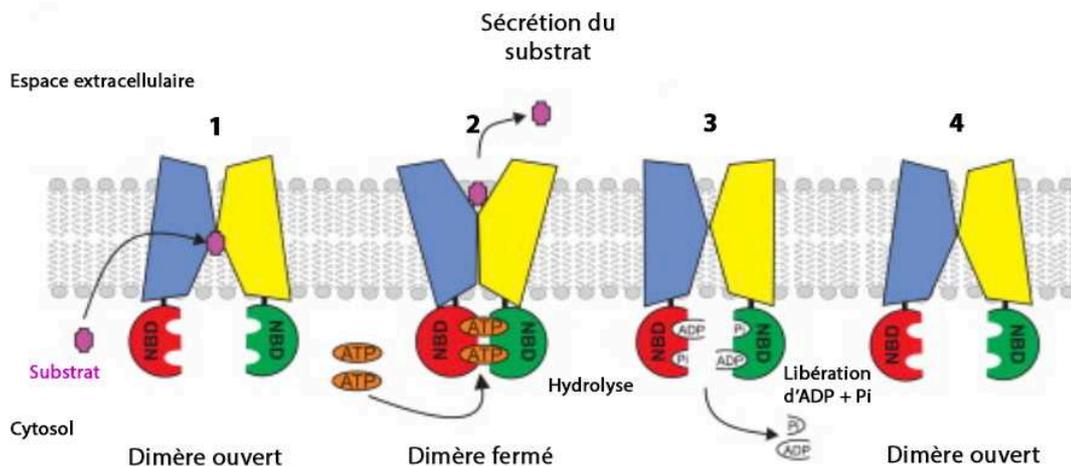


Figure 22 : Modèle illustrant le mécanisme de fonctionnement des transporteurs ABC. (1) Liaison du substrat au TMD en conformation ouverte ou « inward facing ». (2) Liaison de l'ATP aux sites 1 et 2. Fermeture des NBDs qui sont alors dimérisés et sécrétion du substrat dans l'espace extracellulaire. (3) Hydrolyse de l'ATP et ouverture du dimère fermé. Libération du pyrophosphate et de l'ADP (4) Retour à la conformation ouverte « inward facing » avec possibilité de liaison d'un nouveau substrat. D'après (Dermauw 2014)

Pour certains transporteurs, un mécanisme alternatif type « outward-facing » a été proposé, il pourrait s'appliquer à ABCB4. Dans ce modèle, la phosphatidylcholine serait directement transférée dans la cavité interne du transporteur dans une conformation « outward-facing », s'en suivrait l'hydrolyse de l'ATP avec libération d'ADP et Pi, et la sécrétion du ligand (Locher 2016).

III.2. Sous-familles de transporteurs ABC

La superfamille des transporteurs ABC est divisée en 7 sous-familles classées de A à G selon une classification phylogénétique prenant en compte l'identité des séquences pour les acides aminés et les nucléotides des domaines de liaison à l'ATP. Cette classification a permis d'identifier 48 gènes dispersés dans le génome codant pour 48 transporteurs ABC avec une importante diversité de fonction chez l'Homme (Dean 2005).

III.2.1. Familles de transporteurs ABC impliqués dans la sécrétion biliaire

La sous-famille ABCB

La sous-famille ABCB est unique chez les mammifères. Elle contient onze membres, à la fois des transporteurs « entiers » et des hémi-transporteurs (un seul NBD, un seul TMD), qui s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent pour assurer leurs fonctions. On retrouve les protéines de type MDR (MultiDrug Resistance), et TAP (Transporter associated with Antigen Processing).

Il y a quatre transporteurs entiers dont trois, ABCB1/MDR1, ABCB4/MDR3, ABCB11/BSEP, sont exprimés au niveau des membranes canaliculaires des hépatocytes. ABCB2 et ABCB3 (TAP) forment des hétérodimères au niveau du réticulum endoplasmique où ils transportent les peptides antigéniques dans le RE, permettant leur association aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (Dean 2002).

ABCB1 / MDR1 est la première protéine de type MDR identifiée comme responsable du phénotype de résistance aux drogues, à l'origine de nombreux échecs de traitement des cancers par chimiothérapie. Il est le premier transporteur ABC à avoir été cloné chez l'Homme et reste le mieux caractérisé à l'heure actuelle. Sa structure a été résolue par cristallisation, faisant de lui un modèle pour l'étude de nombreux transporteurs ABC (Figure 23).

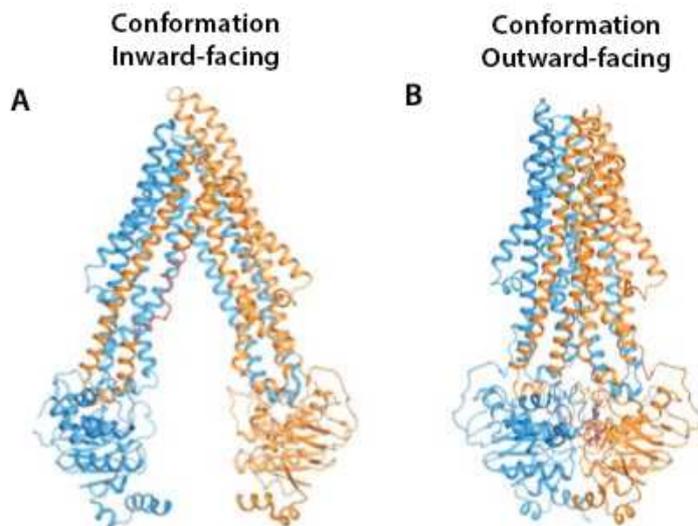


Figure 23 : Différentes conformations d'ABCB1. (A) Structure d'ABCB1 de souris en conformation « inward-facing ». (B) Structure d'ABCB1 humain en conformation « outward-facing ». D'après (Kim 2018)

La famille ABCB compte aussi des hémi-transporteurs : ABCB6, ABCB7, ABCB8, ABCB9 et ABCB10 exprimés au niveau des lysosomes ou des mitochondries sous forme d'hémi-transporteurs (Dean 2005).

ABCB11 et ABCB4 sont les deux membres de la famille ABCB impliqués dans la sécrétion biliaire, puisqu'ils permettent respectivement d'excréter des acides biliaires et de la phosphatidylcholine qui sont deux des composants majeurs de la bile. Des mutations dans ces transporteurs entraînent le développement de maladies biliaires comme la cholestase et les PFIC (Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis) (Davit-Spraul 2009).

La sous-famille ABCC

La sous-famille ABCC contient douze transporteurs aux fonctions variées. Le plus connu est ABCC7/CFTR, un canal d'ions chlorure responsable de la mucoviscidose (Zielenski 1995). CFTR joue également un rôle dans la sécrétion biliaire puisqu'il est exprimé dans les voies biliaires par les cholangiocytes où il régule les sécrétions de Cl⁻ et bicarbonate, contribuant ainsi à modifier la composition de la bile (Chapitre I). ABCC8 et ABCC9 sont génétiquement très proches mais sont exprimés dans différents tissus, le pancréas pour ABCC8, les muscles squelettiques pour ABCC9. ABCC8 est associé à un canal potassium impliqué dans la modulation de la sécrétion de l'insuline par les cellules pancréatiques.

ABCC2, ABCC3 et ABCC4 sont importants pour la sécrétion biliaire. Ils sont exprimés aux membranes canaliculaires ou sinusoidales des hépatocytes, où ils sécrètent la bilirubine dans le canalicule pour ABCC2, et des acides biliaires, glutathion etc. dans la circulation sanguine pour ABCC3 et ABCC4 (Chapitre II). Des défauts du transporteur ABCC6 sont à l'origine d'une pathologie appelée PXE pour Pseudoxanthome élastique, dans laquelle les tissus conjonctifs sont minéralisés (Borst 2019).

La sous-famille ABCG / White

La famille ABCG ne comporte que des hémi-transporteurs dont la particularité est la position du NBD en N-terminal. Cinq transporteurs composent cette famille. ABCG1 permet l'efflux de cholestérol des macrophages sous forme d'homodimère, alors que l'hétérodimère ABCG5/G8 assure l'excrétion du cholestérol dans les voies biliaires. Le rôle d'ABCG4 n'est pas encore clairement établi mais il est exprimé dans le cerveau et montre une importante similarité de séquence avec ABCG1, suggérant un rôle équivalent dans le transport du cholestérol (Koshiba 2008).

Dans le cerveau, ABCG4 et ABCG1 pourraient former un hétérodimère impliqué dans les mécanismes d'apoptose (Hegyí 2016).

In vitro, ABCG2 a de nombreux substrats et est impliqué dans la résistance cellulaire aux médicaments. Ce n'est que récemment que son substrat *in vivo* a été identifié. En effet ABCG2 est un transporteur de l'urée et favorise son élimination rénale. Des mutations de son gène sont associées avec une maladie chronique appelée la goutte (Woodward 2011).

III.2.2. Autres familles de transporteurs ABC

La sous-famille ABCA

La famille ABCA compte douze membres que l'on peut diviser en deux sous-groupes :

- Le premier groupe contient ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA4, ABCA7 et ABCA12, dont les sept gènes sont répartis sur six chromosomes différents (Annexe, Tableau 1)
- Le second groupe, avec ABCA5, ABCA6, ABCA8, ABCA9 et ABCA10 dont les gènes sont répartis en cluster sur le chromosome 17.

ABCA1 et ABCA4 sont les membres les plus étudiés de cette famille. ABCA1 est responsable de la maladie de Tangier caractérisée par une absence de lipoprotéines à haute densité (HDL) dans le plasma et associée à des risques cardiovasculaires, de l'athérosclérose, des dépôts de cholestérol dans de nombreux tissus y compris les lymphocytes et monocytes. En effet, ABCA1 permet le transport « reverse » du cholestérol (RCT) des tissus périphériques vers le foie, ce qui aide à son élimination (Dean 2005).

ABCA4 est exprimé exclusivement dans les photorécepteurs de la rétine, où il facilite le transport de dérivés de la vitamine A. Des mutations de ce transporteur ont pour conséquence l'accumulation de ces substrats dans l'épithélium rétinien et la perte partielle ou totale de la vision (Sabirzhanova 2015).

ABCA2 est majoritairement exprimé dans le cerveau mais sa fonction reste à déterminer. ABCA3 serait impliqué dans la sécrétion de lipides au niveau de l'épithélium pulmonaire (Dean 2002). La fonction et les substrats des autres transporteurs ABCA n'ont pas encore été déterminés.

La sous-famille ABCD

La famille ABCD est formée de quatre hémi-transporteurs exprimés au niveau des peroxysomes, à l'exception d'ABCD4 exprimé au niveau du réticulum endoplasmique. Ils sont

impliqués dans le transport des acides gras à très longue chaîne (AGTLC) et participent à la synthèse des acides biliaires et de lipides essentiels au cerveau.

Une déficience dans la fonction d'ABCD1 conduit à un défaut de β -oxydation des AGTLC au niveau du peroxysome dans le cerveau. L'accumulation cytosolique de ces AGTLC provoque de nombreux symptômes cérébraux, pouvant mener à une paraplégie et à la mort chez les patients (Dean 2002).

Bien qu'ABCD2 et ABCD3 puissent compenser un défaut d'ABCD1 par leur surexpression, ils ne semblent pas avoir exactement la même fonction ni les mêmes substrats. En effet, ABCD3 est par exemple impliqué dans la synthèse *de novo* des acides biliaires alors qu'ABCD2, encore mal caractérisé, serait impliqué dans la synthèse et la dégradation d'un acide gras essentiel au fonctionnement de la rétine et du cerveau (Geillon 2012).

ABCD4 est exprimé au niveau de la membrane du RE et est transloqué dans les lysosomes grâce à une interaction avec une protéine lysosomale, il transporterait alors de la cobalamine du lysosome vers le cytoplasme (Kawaguchi 2016).

La sous-famille ABCE

A ce jour, un seul gène a été identifié dans la famille ABCE. ABCE1 est particulier dans la superfamille des transporteurs ABC puisqu'il possède deux NBDs mais aucun TMD, de plus ce n'est ni une protéine transmembranaire, ni un transporteur puisqu'il est exprimé dans le cytoplasme en réponse à une infection virale (Dean 2002).

La sous-famille ABCF

Comme ABCE1, les trois membres de la famille ABCF seraient cytosoliques et ne comportent pas de TMD. ABCF2 et ABCF3 codent pour des protéines aux fonctions inconnues. Chez l'Homme, ABCF1 serait, comme chez la levure, associé aux ribosomes et impliqué dans la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 (Paytubi 2008).

III.3. Modifications co- et post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles des transporteurs ABC sont nombreuses (Figure 24) : glycosylation, palmitoylation, ubiquitinylation, phosphorylation... et impliquées dans le trafic intracellulaire, l'activité, le repliement ou encore le turnover des transporteurs (Czuba 2018).

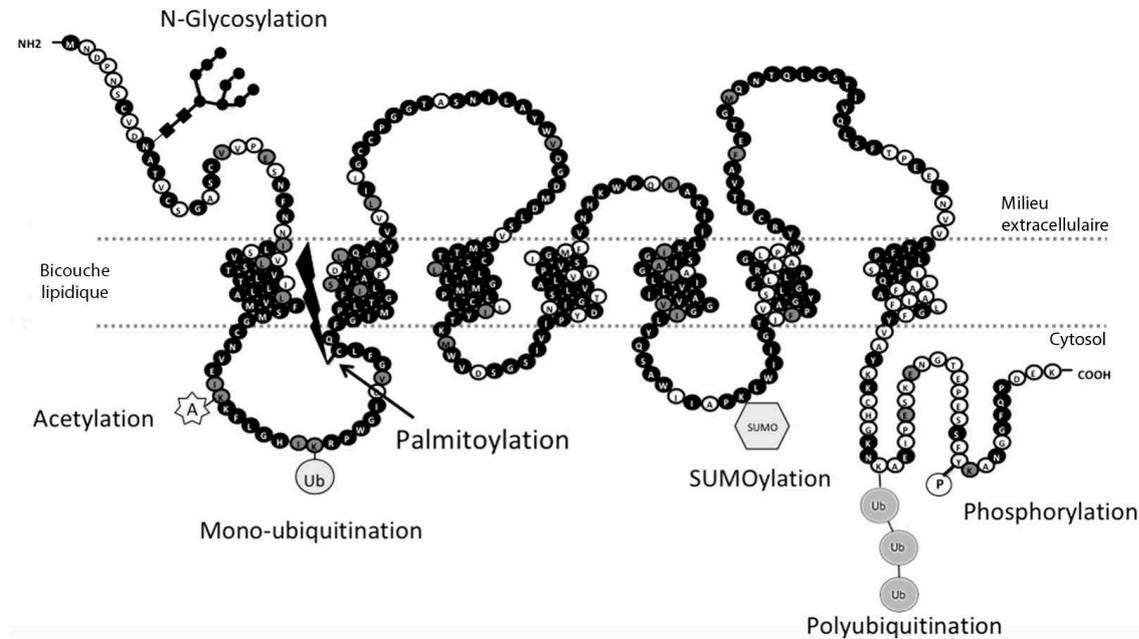


Figure 24 : Représentation d'une protéine transmembranaire avec des modifications post-traductionnelles classiques. La plupart des modifications post-traductionnelles ont lieu sur les résidus situés face cytosolique. La palmitoylation a lieu proche de l'interface lipides-protéines. La N-glycosylation est une modification des résidus extracellulaires. D'après (Czuba 2018).

III.3.1. Glycosylation

La glycosylation consiste en l'ajout de résidus glucidiques sur des peptides, des lipides et a lieu dans le RE (N-glycosylation) ainsi que dans l'appareil de Golgi (O-glycosylation). Les transporteurs ABC possèdent de nombreux sites de glycosylation susceptibles d'affecter l'activité, la stabilité et l'adressage des protéines. La N-glycosylation aura lieu au niveau de motifs Asn-X-Thr/Ser, où X peut être n'importe quel acide aminé à l'exception de la proline. ABCB1 possède trois sites prédictifs de glycosylation dans sa première boucle extracellulaire. La mutation de ces sites consensus de glycosylation n'affecte pas l'activité du transporteur ABCB1 mais son adressage jusqu'à la membrane plasmique et sa stabilité membranaire (Schinkel 1993). En présence d'un inhibiteur de la glycosylation, ABCB1 est également dégradé plus rapidement (Schinkel 1993, Zhang 2004). Pour ABCC7/CFTR, la glycosylation n'affecte pas la sortie du RE, ni l'activité du canal chlore mais son inhibition diminue la stabilité membranaire du canal et augmente sa dégradation (Chang 2008).

ABCG2 est aussi N-glycosylé sur un résidu conservé (Asn596) de l'une de ses boucles extracellulaires. Une diminution de l'expression d'ABCG2 a été rapportée lorsque ce résidu est muté, conduisant à un défaut de glycosylation. Néanmoins, une fois encore, ni l'adressage membranaire, ni l'activité du transporteur ne sont perturbés. Lorsque la N-glycosylation de la forme sauvage d'ABCG2 est inhibée, la protéine est dégradée de façon plus importante (Nakagawa 2009). Le rôle de la N-glycosylation a été étudiée pour les transporteurs canaliculaires ABCB1, ABCC2 et ACG2 dans des « sandwichs » d'hépatocytes de rat en culture. Cette étude montre que ces trois transporteurs doivent être N-glycosylés pour être adressés aux canalicules et actifs (Draheim 2010).

III.3.2. Palmitoylation

La palmitoylation est une réaction post-traductionnelle qui a lieu dans le cytoplasme. Elle consiste en l'ajout d'acides gras, essentiellement l'acide palmitique, sur les résidus cystéines de protéines membranaires et est nécessaire à leur adressage correct. ABCA1 contient plusieurs cystéines qui sont palmitoylées. Lorsque ces acides aminés sont mutés, empêchant la palmitoylation du transporteur, son expression membranaire est diminuée, tout comme son activité (Singaraja 2009). Les mêmes résultats ont été obtenus pour ABCG1 (Gu 2013).

III.3.3. Ponts disulfures

Le RE est le lieu de nombreuses modifications post-traductionnelles, la formation de liaisons covalentes sous forme de ponts disulfures entre deux résidus cystéines en fait partie. ABCG2 contient des ponts disulfures qui permettent de relier entre elles les deux sous-unités du transporteur exprimé à la membrane apicale sous forme d'homodimère. Ces liaisons sont aussi formées au niveau de la boucle extracellulaire d'ABCG2 et semblent indispensables au repliement et à la stabilité membranaire du transporteur (Wakabayashi-Nakao 2009).

III.3.4. Phosphorylation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle qui concernerait un tiers des protéines chez l'Homme. Elle consiste en l'addition réversible d'un phosphate sur un résidu sérine ou thréonine (et plus rarement tyrosine). La phosphorylation est impliquée dans la régulation des transporteurs ABC à différents niveaux : adressage membranaire, activité, endocytose.

Le transporteur ABCC1 possède deux domaines linker, dont l'un contenant des sérines phosphorylables par les kinases PKA et PKC. La phosphorylation de ces sérines est impliquée dans la régulation de l'interaction d'ABCC1 avec la tubuline et est probablement nécessaire à son trafic intracellulaire. La substitution de ces résidus sérines *in vitro* conduit à l'abolition de l'interaction d'ABCC1 avec la tubuline (Ambadipudi 2017).

Pour CFTR, la phosphorylation du domaine de régulation (domaine R) par la kinase PKC mais aussi la PKA joue un rôle primordial dans la régulation de l'activité du canal chloride. En effet, CFTR adopte des structures très différentes selon son statut de phosphorylation. Lorsque le domaine R est phosphorylé, la conformation du transporteur est modifiée, laissant la possibilité à l'ATP de se fixer et facilitant la dimérisation des NBDs puis l'ouverture du canal CFTR (Zhang 2017). Pour ABCB4, notre équipe a montré que la phosphorylation de résidus de son domaine N-terminal est nécessaire à une activité optimale du transporteur de PC (Gautherot 2014).

Il a été montré que la sérine/thréonine kinase Pim-1 phosphoryle deux transporteurs ABC : ABCG2, favorisant sa dimérisation et son expression membranaire, et ABCB1 sur la Ser683. Lorsque la kinase Pim-1 est inhibée, l'expression d'ABCB1 est diminuée, mais également sa stabilité (Xie 2010).

La phosphorylation des transporteurs ABC peut aussi influencer sur leur endocytose. ABCB11 a un motif tyrosine en C-terminal nécessaire à son endocytose. La mutation de ce résidu inhibe l'internalisation du transporteur (Lam 2012). Des résultats similaires ont été obtenus pour CFTR (Prince 1999).

III.3.5. Ubiquitination

L'ubiquitination des protéines par le système ubiquitine/protéasome est un processus indispensable à l'homéostasie cellulaire. Les protéines mal conformées ou dont la quantité doit être régulée seront prises en charge pour être dégradées par le système ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated protein Degradation). On peut décrire la protéolyse de façon simplifiée par deux grandes étapes :

- L'ubiquitination des protéines sur des résidus lysines permet de marquer les protéines devant subir la dégradation.
- La dégradation des protéines ubiquitinylées par le protéasome.

Plusieurs variations identifiées chez des patients dans la séquence d'ABCG2 sont à l'origine d'un niveau d'expression très faible du transporteur. Il a été montré que ces variants, comme le

variant Q141K, sont dégradés par le système ubiquitine/protéasome dès leur sortie du RE conduisant à une diminution de l'expression apicale du transporteur avec pour conséquence l'apparition de pathologies comme la goutte (Nakagawa 2008, Nakagawa 2011, Nakagawa 2009). L'importance de l'ubiquitination a également été mise en évidence pour ABCB11 et ABCC2. L'inhibition de l'ubiquitination bloque l'internalisation d'ABCB11 contrairement à ABCC2 qui peut être internalisé mais ne peut plus être dégradé (Aida 2014).

Chapitre IV - ABCB4

Il y a plus de trente ans, une protéine montrant une forte homologie avec ABCB1 a été identifiée dans une banque d'ADNc hépatique. Il s'agit d'ABCB4, nommée MDR3 (MultiDrug Resistance protein 3) lors de sa découverte (Van der Bliek 1987).

IV.1. Découverte

Dans les années 70, le groupe du professeur Victor Ling étudie le phénotype de résistance multiple aux anti-cancéreux, ou phénomène « MDR » (MultiDrug Resistance), dans des lignées cellulaires de hamster résistantes aux drogues. Cette étude permet de mettre en évidence un transporteur ATP-dépendant responsable du phénotype « MDR », la Pgp (Permease glycoprotein), plus tard appelée MDR1 puis ABCB1 (Gros 1986, Ling 1975). Suite à cette découverte, une sonde dérivée de l'ADN de hamster permet l'identification de membres très proches chez la souris, les gènes *mdr1* et *mdr2*, puis chez plusieurs espèces. On recense ainsi trois gènes chez le hamster (*pgp1* à *3*), trois chez la souris (*mdr1* à *3*), deux chez l'Homme (*MDR1* et *MDR2*) et le primate. Chez l'Homme, il n'existe pas d'équivalent à la *pgp2*, *MDR2* étant plus proche de la *pgp3* du hamster, le gène est renommé *MDR3*. Ces gènes sont alors classés selon leur homologie dans trois classes, la classe III n'étant à l'époque pas impliquée dans le phénotype « mdr » contrairement aux deux autres (Tableau 2).

Gènes associés avec les P-glycoprotéines			
Espèce	Classe I	Classe II	Classe III
Hamster	<i>pgp1</i>	<i>pgp2</i>	<i>pgp3</i>
Souris	<i>mdr3</i> / <i>mdr1a</i>	<i>mdr1</i> / <i>mdr1b</i>	<i>mdr2</i>
Homme	<i>MDR1</i>	-	<i>MDR3</i>

Tableau 2: Classification des gènes *mdr*. Les gènes des classes I et II sont impliqués dans le phénotype de résistance aux drogues et anticancéreux, ce qui n'est pas le cas de ceux de la classe III. D'après (Lincke 1991)

Chez l'Homme, ABCB4 présente 76% d'identité de séquence avec ABCB1. Contrairement à ABCB1, ABCB4 n'est à l'époque pas impliqué dans la résistance multiple aux anti-cancéreux (Raymond 1990). Néanmoins, d'après plusieurs études ABCB4 peut transporter des xénobiotiques et son expression est modifiée dans différents cancers (Kiehl 2014, Smith 2000).

Les gènes ABCB4 et ABCB1 sont très liés, puisqu'ils sont situés sur le même chromosome 7q21.1 (Figure 25) (Tableau 1 Annexe) et possèdent la même organisation interne introns/exons avec 27 introns et 28 exons (Lincke 1991).

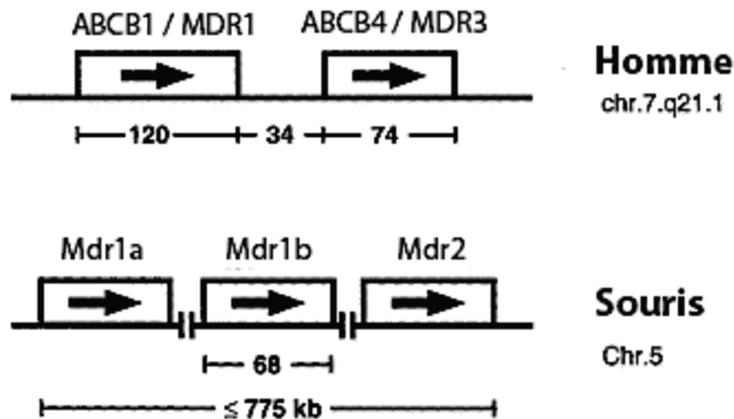


Figure 25 : Les gènes humains et murins *mdr*. Les gènes *ABCB1* et *ABCB4* sont situés sur le même chromosome. D'après (Borst 2000).

IV.2. Expression cellulaire et tissulaire

IV.2.1. Distribution

A l'inverse d'*ABCB1*, *ABCB4* n'est pas exprimé dans de nombreux tissus. Ses ARN messagers (ARNm) et protéines ont été quantifiés dans différents organes. On retrouve majoritairement *ABCB4* dans le foie, où des immunomarquages ont permis de montrer que la protéine est exclusivement exprimée aux membranes canaliculaires des hépatocytes (Buschman 1992, Smit 1994). *ABCB4* est faiblement exprimé dans d'autres tissus puisque l'on retrouve des transcrits ARNm dans les muscles striés, les amygdales, l'utérus, la rate... (Chin 1989, Smit 1994) (Figure 26). Néanmoins, aucune expression protéique n'est détectée par western blot dans ces tissus. Chez le rat, on trouve également une expression d'*ABCB4* dans d'autres tissus comme le cerveau et les testicules (Zhang 2016). Chez la souris on retrouve des ARN messagers d'*ABCB4* dans le cerveau et le cœur (Cui 2009).

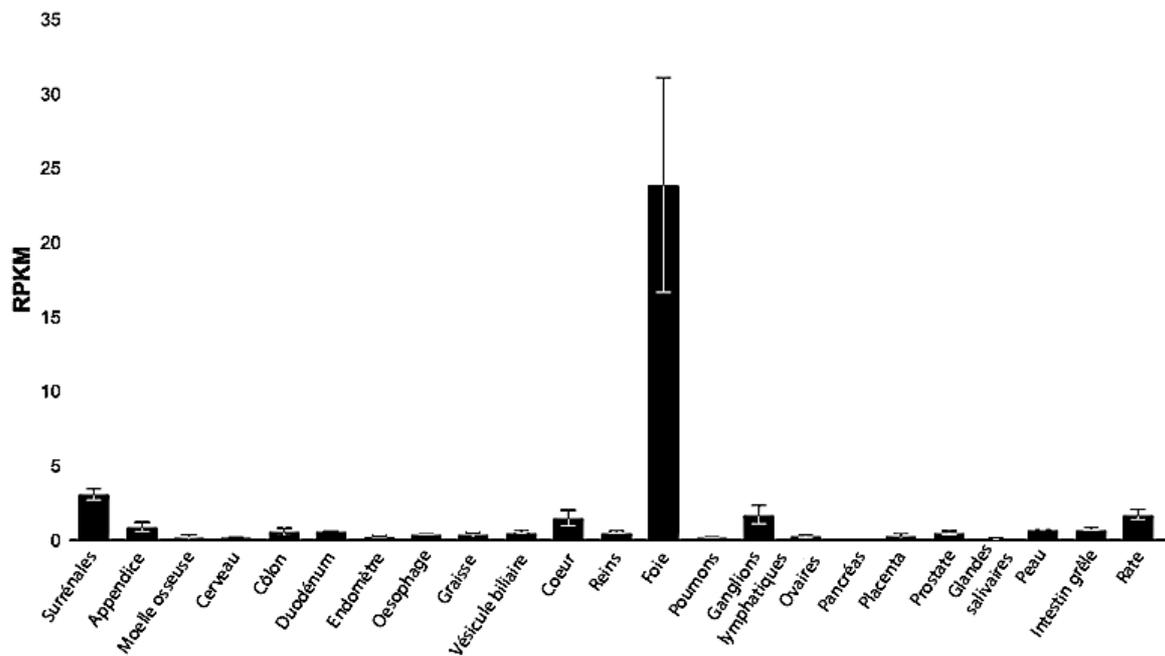


Figure 26 : Expression tissulaire d'ABCB4 chez l'Homme. Des expériences de RNA-seq ont été réalisées dans des échantillons de tissus humains provenant de 95 sujets. Informations disponibles dans « NCBI / Gene », Gene ID: 5244.

IV.2.2. Épissage alternatif

Le transcrite du gène ABCB4 humain comporte 4100 nucléotides. Le criblage d'une banque de foie humain a mis en évidence trois ADNc correspondant à ABCB4. Il s'agit de trois transcrits produits par l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager. Ces trois transcrits donnent trois isoformes :

- L'isoforme A, qui est prédominante et comporte 1279 acides aminés.
- L'isoforme B, qui a un insert de sept acides aminés au niveau du second NBD (1286 acides aminés).
- L'isoforme C, qui a une délétion de 47 acides aminés, correspondant à l'intégralité de la première hélice α transmembranaire (1232 acides aminés).

La protéine correspondant à l'isoforme A est détectée dans le foie, celles équivalentes aux isoformes B et C n'ont pour l'instant jamais été mises en évidence au niveau physiologique (Van der Bliik 1987). Néanmoins, les effets de l'expression de chacun de ces variants d'épissage ont été étudiés dans des modèles de souris *Abcb4* *-/-* et l'isoforme A reste la plus fonctionnelle des trois dans ce modèle de souris (Siew 2019).

IV.3. Structure

ABCB4 est une protéine de la superfamille ABC dont la structure caractéristique a été décrite précédemment (Chapitre II). ABCB4 est constitué de douze hélices alpha transmembranaires (TMH), divisées en deux domaines transmembranaires TMD1 et TMD2, et de deux domaines de liaison à l'ATP, NBD1 et NBD2. Entre les hélices alpha TMH1 et TMH2, la séquence correspondant à la boucle extracellulaire possède deux résidus qui peuvent être N-glycosylés : N91 et N97 (Schinkel 1993). Bien que l'on ait montré le rôle de la glycosylation pour de nombreux transporteurs ABC, que ce soit pour l'adressage membranaire, la régulation de l'activité du transporteur ou leur stabilité membranaire, il n'a pas encore été déterminé pour ABCB4.

Les extrémités N- et C-terminales du transporteur sont localisées dans le cytoplasme. D'après les logiciels de prédiction, le domaine N-terminal d'ABCB4 comporte environ 54 acides aminés. Ce domaine n'est pas du tout conservé avec d'autres transporteurs ABC comme ABCB1 et son rôle reste peu étudié (Figure 27). Il contient plusieurs sérines et thréonines potentiellement phosphorylables ainsi qu'une région chargée positivement riche en lysines et arginines qui pourrait constituer une zone d'interaction avec des partenaires protéiques. En 2014, notre groupe a étudié des résidus sérine (S49) et thréonines (T34 et T44) et montré que la phosphorylation de résidus du N-terminal d'ABCB4 est nécessaire à la régulation de l'activité du transporteur (Gautherot 2014). De plus, plusieurs variants ont été identifiés chez des patients atteints de PFIC3 ou du syndrome LPAC dans cette extrémité N-terminale, attestant de l'importance de cette région.

```
ABCB1  1  MDLE  GDRNGGAKK----KNFFKLNKSEKDKKEKKPT--VSVFSMFRYSNWLDK  48
ABCB4  1  MDLE  AAKNGTAWRP TSAEGDFELG I SSKQKRKKTKTVM IGVLTLFRYS DWQDK  54
```

Figure 27 : Alignement des séquences peptidiques N-terminales d'ABCB1 et ABCB4. Les domaines N-terminaux d'ABCB1 et ABCB4 sont peu conservés suggérant des rôles et partenaires bien spécifiques pour chaque transporteur.

Le domaine C-terminal est composé de 46 acides aminés placés en aval du NBD2. Sa séquence est quasi identique à celle du domaine C-terminal d'ABCB1, seuls les trois derniers acides aminés diffèrent. Un travail de thèse réalisé dans notre équipe a permis de montrer que cette séquence finale composée des acides aminés -Q (Glutamine) -N (Asparagine) -L (Leucine) est impliquée dans la régulation de la stabilité membranaire d'ABCB4 par son interaction avec la protéine d'échafaudage EBP50 (Venot 2016).

IV.4. Fonction d'ABCB4 : sécrétion de phospholipides biliaires

L'expression exclusive d'ABCB4 au niveau des membranes canaliculaires des hépatocytes est le témoin d'une fonction métabolique bien spécifique. La transfection d'ABCB4 dans des lignées cellulaires n'a pas permis de comprendre sa fonction. C'est l'établissement d'une lignée de souris homozygotes pour la délétion d'*Abcb4* qui a permis de déterminer la fonction du transporteur et la nature de son substrat. La caractérisation de cette lignée murine met en évidence les paramètres suivants : dans le sérum des souris *Abcb4*^{-/-} on observe une augmentation de la bilirubine conjuguée, de la phosphatase alcaline, et des transaminases (ALAT et ASAT), indiquant d'importants dommages hépatiques. Au niveau cellulaire, une dilatation des canalicules biliaires et une perte des microvillosités sont observées. Chez les souris *Abcb4*^{-/-} on constate une absence totale de phosphatidylcholine dans la bile. Les souris hétérozygotes pour *Abcb4* (*Abcb4*^{-/+}) ont quant à elles un taux de PC diminué de moitié. La fonction du transporteur ABCB4 a donc été déterminée : il s'agit d'une floppase qui assure le transport de la PC dans la bile (Smit 1993).

Cette fonction a plus tard été confirmée chez la levure et dans des lignées cellulaires (van Helvoort 1996). Pour doser la PC sécrétée par ABCB4, l'ADN murin du transporteur a été exprimé dans des vésicules sécrétoires de levures, et un analogue fluorescent de la PC a été utilisé. Ce dosage *in vitro* révèle qu'en présence d'ABCB4, la PC est transloquée de façon ATP-dépendante d'un feuillet à l'autre des vésicules sécrétoires (Ruetz 1994).

Les canalicules biliaires de foies de souris *Abcb4*^{-/-}, *Abcb4*^{+/-} ou wild-type (WT) ont été observés en microscopie électronique. Chez les souris WT, de nombreuses vésicules constituées de phospholipides sont observées dans la lumière du canalicule. La quantité de vésicules tombe à 55% pour les souris hétérozygotes *Abcb4*^{+/-} et à 12% pour les homozygotes *Abcb4*^{-/-}. Lorsque ces lignées sont « restaurées » grâce à l'insertion du gène *ABCB4* humain, le nombre de vésicules augmente pour atteindre quasiment le même nombre que dans les canalicules de souris WT. Cette augmentation va de pair avec une augmentation de la quantité de PC sécrétée chez les souris « restaurées » (Crawford 1997).

La sécrétion de PC permet de protéger les membranes cellulaires de l'effet détergent des acides biliaires. L'activité de sécrétion de PC d'ABCB4 est donc stimulée par la présence d'acides biliaires au niveau du canalicule. Ce constat a été fait *in vitro*, dans des cellules HEK (Human Embryonic Kidney) exprimant stablement ABCB4 après une transfection. Une augmentation de la sécrétion de PC est mesurable après traitement de ces cellules avec du taurocholate, qui

favorise la formation de micelles mixtes avec les acides biliaires, et donc l'élimination du cholestérol (Morita 2007).

Pour la sécrétion de PC, deux modèles ont été proposés (Boyer 2013, Crawford 1997, Reshetnyak 2013) (Figure 28) :

1. ABCB4 permet à la PC de passer du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique, au niveau de laquelle les acides biliaires vont interagir avec la PC et l'extraire.
2. En exerçant son activité de floppase, ABCB4 crée des microdomaines riches en PC dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Des vésicules riches en PC seraient alors formées dans la lumière du canalicule, auxquelles s'associeraient les acides biliaires présents (Crawford 1997).

Pour contrebalancer l'action de floppase d'ABCB4 et éviter que la membrane plasmique ne soit déstabilisée, ATP8/B1 flippe la PS du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane (Groen 2011).

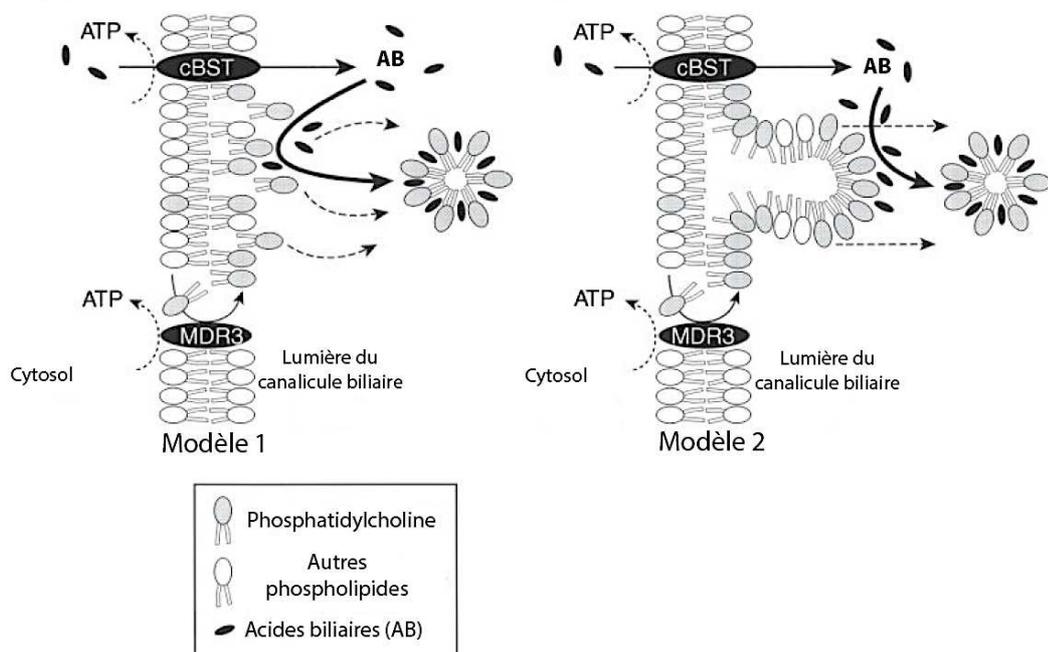


Figure 28 : Mécanismes de transport de la phosphatidylcholine par ABCB4. Deux modèles ont été proposés pour la sécrétion de la PC dans le canalicule biliaire : (1) Les acides biliaires viennent extraire la PC du feuillet externe de la membrane plasmique. (2) Des vésicules de PC sont secrétées dans le canalicule et des acides biliaires vont interagir avec elles pour former des micelles mixtes. D'après (Boyer 2013)

IV.5. Régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle

L'expression d'ABCB4 peut être modulée à différents niveaux : transcriptionnel, mais aussi après sa traduction en régulant la quantité de protéines disponible à la membrane canaliculaire ou encore l'activité du transporteur.

IV.5.1. Régulation de la transcription du gène ABCB4

Bien que de plus en plus étudiés, les mécanismes de régulation de la transcription d'ABCB4 restent peu connus. Dans des hépatocytes de rat traités avec des doses croissantes d'acides biliaires, on observe une augmentation des transcrits ARN messagers d'ABCB4 conjointement à une augmentation de l'expression de la protéine en western blot. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* lorsque des rats sont nourris avec un régime riche en acides biliaires tauroconjugués, le taurocholate (TCA) étant le plus efficace. Au contraire, une alimentation riche en cholestérol diminue l'expression d'ABCB4 (Gupta 2000).

Ces résultats démontrent une implication du récepteur nucléaire FXR dans la régulation transcriptionnelle d'ABCB4. En effet, dans le promoteur d'ABCB4, on retrouve des éléments de réponse au récepteur nucléaire FXR (Huang 2003). Comme décrit dans le Chapitre I, FXR forme un hétérodimère avec RXR. Cette association va réguler positivement l'expression d'ABCB4, activer la synthèse d'ABCB11 et inhiber la synthèse *de novo* des acides biliaires. Ce rôle de FXR a été confirmé par le traitement d'hépatocytes de rat avec un agoniste de FXR, le GW4064, qui induit également la transcription d'ABCB4 (Liu 2003).

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont mis en évidence l'implication de PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha) dans la régulation de l'expression d'ABCB4. PPAR α se lie à des éléments de réponse spécifiques dans le promoteur d'ABCB4, ce qui a pour effet d'augmenter l'expression du transporteur (Ghonem 2014).

Chez la femme, des pathologies liées à un défaut d'ABCB4 se manifestent dans des contextes hormonaux particuliers, par exemple lors de la grossesse ou suite à un traitement hormonal contraceptif. Ces éléments suggèrent une régulation de l'expression d'ABCB4 par les œstrogènes et la progestérone. Peu d'études ont été réalisées pour démontrer ce lien. Des mutations d'ABCB4 ou de d'ABCB11 ont été identifiées dans 5 à 15% des cholestases gravidiques ou ICP (Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy). Cette pathologie apparaît au cours du troisième trimestre de grossesse et est caractérisée par un prurit important et une élévation des acides biliaires circulants. Lors d'une grossesse, les niveaux de progestérone circulante sont

augmentés et le sont d'autant plus dans le cadre d'une ICP, suggérant une contribution de cette hormone dans les mécanismes de la pathologie (Glantz 2008). En effet, une étude a montré que le traitement d'hépatocytes avec des métabolites de la progestérone inhibe l'activité de FXR qui est un activateur de l'expression d'ABCB4 et ABCB11. De plus, les niveaux de transcrits d'ABCB11 et la quantité de protéines sont diminués de façon dose-dépendante (Abu-Hayyeh 2013). Ces résultats ont été confirmés *in vivo*, puisque des souris traitées avec ces mêmes métabolites de la progestérone développent des cholestases (Abu-Hayyeh 2015).

Récemment, le rôle de l'hormone thyroïdienne T3 via le récepteur THR β 1 a été mis en évidence dans la régulation d'ABCB4. En effet, le traitement de lignées cellulaires ou de souris avec l'hormone T3 ou des agonistes entraîne une augmentation de l'expression d'ABCB4 et de la sécrétion de PC dans la bile, justifiant ainsi la présence des éléments de réponse au récepteur THR β 1 identifiés dans le promoteur d'ABCB4 (Gautherot 2018).

IV.5.1. Régulation post-translationnelle

L'expression et l'activité d'ABCB4 dépendent de son trafic intracellulaire, sa stabilité à la membrane ou encore sa dégradation.

Régulation du trafic intracellulaire

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle des microtubules et du cytosquelette d'actine dans l'adressage des transporteurs ABC jusqu'à la membrane canaliculaire (Chan 2005, Gatmaitan 1997, Kipp 2001, Rost 1999). Chez des rats traités avec du taurocholate ou de l'AMPc, une rapide augmentation de l'adressage des transporteurs ABCB4 et ABCB1 est observée à la membrane apicale (Gatmaitan 1997, Kipp 2001). Lorsque les hépatocytes sont traités avec un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, la colchicine, cette augmentation membranaire n'est plus observée prouvant l'implication du réseau de microtubules dans l'adressage des transporteurs ABC.

Un crible en double-hybride a permis l'identification d'un partenaire commun à ces trois transporteurs ABC : la chaîne légère de myosine MLC2. Cette protéine est nécessaire à l'adressage d'ABCB11 au canalicule. Elle forme un complexe avec les chaînes lourdes de myosine et est impliquée dans le trafic vésiculaire, démontrant un rôle indirect du cytosquelette d'actine dans le trafic intracellulaire des transporteurs ABC (Chan 2005). Le rôle de son interaction avec ABCB4 sera présenté dans la partie Résultats.

Pour de nombreuses protéines apicales hépatocytaires, une voie indirecte a été mise en évidence : la transcytose. Les protéines synthétisées vont du réseau trans-Golgien à la membrane basolatérale pour être internalisées par endocytose et rejoindre la membrane canaliculaire par diffusion (Schell 1992). Néanmoins, des études de pulse chase réalisées *in vivo* chez le rat ont démontré que les transporteurs ABCB4, ABCB1 et ABCB11 n'empruntaient pas cette voie puisqu'ils sont directement adressés du Golgi à la membrane apicale (Kipp 2000, Slimane 2003). ABCB4 est donc synthétisé dans le réticulum endoplasmique, traverse l'appareil de Golgi pour être ensuite adressé à la membrane canaliculaire. ABCB11 rejoint le canalicule plus lentement qu'ABCB1 et ABCB4 puisqu'il est séquestré dans un réservoir intracellulaire sous-membranaire positif pour la protéine Rab11 avant d'être adressé à la membrane apicale (Wakabayashi 2004) (Figure 29).

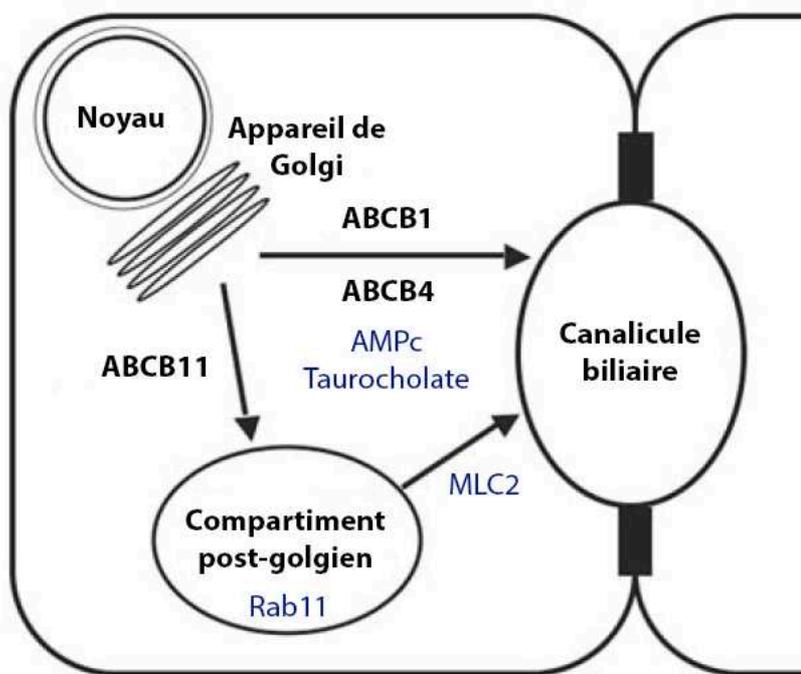


Figure 29 : Schéma récapitulatif de l'adressage des transporteurs ABC néo-synthétisés au canalicule. ABCB1 et ABCB4 sont directement adressés de l'appareil de Golgi au canalicule. ABCB11 transite par un compartiment post-golgien positif pour la protéine Rab11 avant de rejoindre le canalicule. Le compartiment post-golgien est exclusivement défini par sa localisation entre la citerne de l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Différents partenaires protéiques et voies de signalisations sont impliqués dans l'adressage de ces transporteurs. Le cytosquelette d'actine et les microtubules sont également impliqués. D'après (Wakabayashi 2009)

Stabilité, recyclage et dégradation de la protéine

ABCB4 est une protéine N-glycosylée sur deux résidus mais le rôle de cette glycosylation n'a pas encore été étudié pour ce transporteur. On sait cependant que la perte de glycosylation affecte la stabilité et la dégradation d'ABCB1 et de CFTR.

Des partenaires protéiques comme HAX-1 et RACK1 sont impliqués dans la stabilité et le recyclage d'ABCB4. Ils ont été identifiés par crible double-hybride et seront détaillés dans le Chapitre V.

Les expériences de Gatmaitan et al. ont non seulement permis de montrer l'implication des microtubules dans le recrutement des transporteurs ABC mais aussi mis en évidence l'existence d'un compartiment sous membranaire au rôle de réservoir. En effet, ils traitent des vésicules de membrane canaliculaire extraites à partir de foie de rat avec du taurocholate ou de l'AMPc et observent une forte augmentation de la quantité de transporteurs à la membrane (jusqu'à trois fois plus), dont ABCB4. Cette observation va de pair avec une augmentation du flux biliaire *in vivo* lorsque du taurocholate ou de l'AMPc sont administrés aux rats. L'adressage des transporteurs ABC au canalicule est donc induit par l'AMPc et le taurocholate en réponse à un besoin accru de sécrétion biliaire. Si les rats sont prétraités avec de la cycloheximide (un inhibiteur des phases d'initiation et d'élongation de la synthèse protéique), l'augmentation de l'adressage canaliculaire des transporteurs ABC suite à l'administration de taurocholate ou d'AMPc a toujours lieu. Ainsi, cette augmentation ne fait pas suite à une expression protéique *de novo* mais résulte du recrutement d'un pool de transporteurs disponibles dans la cellule. La demi-vie de ces transporteurs est plus ou moins de cinq jours ce qui suggère qu'ils suivent plusieurs cycles entre les réservoirs intracytoplasmiques et la membrane apicale avant d'être dégradés (Kipp 2001). Les stimulations de l'adressage des transporteurs ABC par le taurocholate et l'AMPc ont des effets additifs, révélant la probable existence de deux réservoirs intracellulaires stimulés de façon différentielle par l'AMPc et le taurocholate (Gatmaitan 1997). Par ailleurs, lorsque des rats sont traités avec un inhibiteur de la PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase), une enzyme impliquée dans de nombreuses voies de régulation du métabolisme, une diminution de la sécrétion biliaire est observée. Cette diminution est directement liée à une baisse de la quantité de transporteurs ABC à la membrane apicale des hépatocytes. A l'inverse, la stimulation de ces rats avec du taurocholate augmente l'activité de la PI3K et l'adressage membranaire des transporteurs (Misra 1998).

L'administration de phalloïdine, un inhibiteur de la dépolymérisation du cytosquelette d'actine, conduit au développement rapide de cholestases chez des rats, causé par une diminution du flux

biliaire et une rétention des transporteurs ABC dans des compartiments sous-membranaires (Rost 1999).

Toutes ces données montrent que le flux biliaire est régulé par un recyclage rapide des transporteurs ABC qui trafiquent d'un ou plusieurs compartiments intracellulaires à la membrane canaliculaire sous l'effet de nombreux signaux régulateurs et par l'intermédiaire des microtubules et du cytosquelette d'actine.

D'autres part, différentes hormones sont impliquées dans la ré-internalisation de transporteurs ABC canaliculaires mais leur implication dans la régulation de l'expression canaliculaire d'ABCB4 n'a toujours pas été démontrée (Zucchetti 2011).

Le protéasome et le système lysosomal sont impliqués à différents niveaux dans la dégradation des transporteurs ABC, mais aucune étude n'a pour le moment été réalisée pour ABCB4.

Activité du transporteur et sécrétion de phosphatidylcholine

Notre équipe a identifié plusieurs résidus sérines et thréonines phosphorylables dans le domaine N-terminal d'ABCB4. Plusieurs patients atteints de syndrome LPAC, ICP ou de DILI (Drug Induced Liver Injury) sont porteurs de la mutation T34M. En l'absence de phosphorylation de cette thréonine 34 ou d'autres résidus du domaine N-terminal (Thr44, Ser49), l'adressage d'ABCB4 au canalicule reste inchangé mais l'activité de sécrétion de PC est diminuée. De plus, le traitement de cellules exprimant ABCB4-WT avec des activateurs des PKA et PKC augmente la sécrétion de PC alors que la présence d'inhibiteurs de ces kinases la diminue. Le domaine N-terminal d'ABCB4 est donc impliqué dans la régulation de l'activité du transporteur (Gautherot 2014). Il s'agit de la première étude montrant un rôle du domaine N-terminal d'ABCB4, et l'implication de la phosphorylation dans la sécrétion de PC.

IV.6. Pathologies liées à ABCB4

De nombreuses mutations du gène *ABCB4* identifiées chez des patients sont à l'origine de plusieurs pathologies hépatiques progressives ou chroniques (résumées Tableau 3. page 68). La plus sévère est la Cholestase Familiale Intra-hépatique de type 3 ou PFIC3 qui se développe tôt chez l'enfant. Deux syndromes de l'adulte sont également liés à des mutations d'ABCB4 : le syndrome de lithiase intra-hépatique cholestérolique (ou LPAC) et la cholestase gravidique (appelée ICP).

IV.6.1. Cholestase Intrahépatique Familiale de type 3 (PFIC3)

La PFIC3 est la pathologie la plus sévère liée à un défaut d'ABCB4. Elle appartient à un groupe de maladies appelées PFIC pour Cholestases Intrahépatiques Progressives Familiales. La prévalence des PFIC est estimée entre 1/50 000 et 1/100 000 et la PFIC3 représenterait un tiers des cas de PFIC (orphanet). Ces pathologies se déclarent dès l'enfance selon un mode de transmission autosomique récessif. Les patients sont généralement homozygotes ou hétérozygotes composites. Les PFIC se caractérisent par des altérations dans l'élaboration d'une bile homogène avec pour conséquence des atteintes hépatiques allant de la fibrose à la cirrhose et conduisant à l'insuffisance hépatique avant l'âge adulte. D'un point de vue clinique, les premières manifestations sont généralement observées au cours de la première année de vie et caractérisées par une jaunisse, un prurit, une stéatorrhée ou encore une malabsorption des vitamines liposolubles (Nicolaou 2012).

Depuis la description de la PFIC1 en 1969, quatre autres PFIC ont été décrites et classées de 1 à 5 :

- **PFIC1** : Elle est la conséquence de mutations du gène d'ATP8/B1, qui est une flippase exprimée à la membrane apicale des hépatocytes et cholangiocytes. Cette protéine transloque la PS et la PE du feuillet externe au feuillet interne de la membrane plasmique, permettant le maintien de l'intégrité de la bicouche lipidique (Bull 1998). En l'absence d'activité d'ATP8/B1, le feuillet externe de la membrane plasmique, en contact avec la lumière des canalicules, est plus exposé aux effets détergents des acides biliaires (Paulusma 2006).

Les patients doivent être supplémentés en vitamines et avoir un apport calorique suffisant pour compenser leurs nombreuses carences. Il n'existe pas de traitement ciblé. Les patients atteints de PFIC1 sont essentiellement traités avec de l'UDCA (acide ursodésoxycholique) pour diminuer le prurit et améliorer les symptômes de cholestase de façon générale. Lorsque la thérapie pharmacologique est insuffisante, des solutions chirurgicales permettant le bypass de la bile existent. En dernier recours, la transplantation hépatique reste la seule thérapie efficace pour certains patients. Néanmoins, celle-ci peut aussi échouer, certains patients développant des stéatoses et de la fibrose hépatique suite à la greffe (Henkel 2019).

- **PFIC2** : Elle est la résultante de mutations du gène *ABCB11*. Plus de 200 mutations ont été identifiées à ce jour. Ce transporteur ABC assure le relargage des acides biliaires

dans la bile. Son développement est souvent plus précoce que celui des PFIC1 et des complications de type CHC ou cholangiocarcinome peuvent survenir. En l'absence de sécrétion des acides biliaires, le flux biliaire est diminué et une accumulation toxique des acides biliaires a lieu dans les hépatocytes. Chez les patients atteints de PFIC2, un prurit accompagné d'une jaunisse sont très fréquemment retrouvés les mois suivant la naissance. Des défauts de croissance dus à une malabsorption des graisses et des vitamines liposolubles sont souvent observés. Avant l'âge adulte, la pathologie évolue vers une cirrhose et une insuffisance hépatique, rendant la transplantation indispensable. A l'instar des patients atteints de PFIC1, ceux atteints de PFIC2 sont initialement traités avec de l'UDCA. Les médecins ont également recours à la dérivation biliaire pour repousser la transplantation hépatique chez ces enfants. Au niveau pharmacologique, un composé issu du repositionnement de molécules thérapeutiques a montré son efficacité. Il s'agit du 4-phénylbutyrate de sodium (4-BP) qui agit comme chaperonne moléculaire et permet d'augmenter l'adressage canaliculaire d'ABCB11. Le traitement avec du 4-PB de patients atteints de PFIC2 et porteurs de certaines mutations faux sens a montré une amélioration de leur fonction hépatique et paramètres biologiques ainsi qu'une diminution de leur prurit (Gonzales 2015, Naoi 2014).

- **PFIC3** : Des variations du gène *ABCB4* entraînent une réduction du transport de PC dans la bile. Par leur caractère détergent, les acides biliaires vont devenir toxiques pour les membranes cellulaires, ce qui sera à l'origine d'une réaction ductulaire, conduisant à une inflammation des voies biliaires et une prolifération des cholangiocytes (Jacquemin 2012). Le cholestérol ne pouvant être intégré efficacement dans des micelles mixtes, des cristaux de cholestérol se forment dans les voies biliaires. La PFIC3 se déclare généralement plus tardivement que les PFIC1 et 2. Elle se caractérise par un léger prurit, une concentration en acides biliaires normale, et contrairement aux PFIC1 et 2, une élévation de γ -GT dans le sérum des patients. Cette pathologie évolue vers la cirrhose puis l'insuffisance hépatique avant l'âge adulte. Certains patients peuvent également développer un cholangiocarcinome ou un CHC.

Le seul traitement disponible pour les patients atteints de PFIC3 est l'administration d'UDCA. Cet acide biliaire plus hydrophile diminue la toxicité de la bile en l'absence de PC, ce qui permet de protéger l'épithélium biliaire. Néanmoins, seuls 25% des patients répondent à ce traitement et la transplantation hépatique reste nécessaire dans

la majorité des cas, d'où la nécessité de développer de nouveaux traitements (Jacquemin 1997).

- **PFIC4** : Décrite en 2014, la PFIC4 est causée par des mutations du gène *TJP2* (Tight junction protein 2). Cette protéine participe aux jonctions cellules-cellules. Des mutations de *TJP2* entraînent une déstabilisation des « tight junctions » au niveau des membranes canaliculaires et entraînent un écoulement de la bile vers le parenchyme hépatique. En plus des atteintes hépatiques, ces patients développent des symptômes neurologiques et respiratoires (Sambrotta 2015). Le traitement est identique aux autres PFIC : de l'UDCA et des vitamines liposolubles pour améliorer les symptômes des patients et différer la transplantation hépatique (Ge 2019).
- **PFIC5** : Des mutations du gène *NR1H4* sont à l'origine de cette cholestase. *NR1H4* code pour le récepteur nucléaire FXR, qui régule l'expression d'ABCB11 et ABCB4. Des biopsies hépatiques montrent qu'en l'absence de FXR, le transporteur ABCB11 n'est plus exprimé à la membrane apicale des hépatocytes tandis qu'ABCB4 montre une expression normale. Les patients développent une cholestase sévère ainsi que des défauts de coagulation qui progressent rapidement vers une insuffisance hépatique. Certains d'entre eux répondent bien à un traitement avec de l'UDCA et à la dérivation biliaire. Néanmoins, comme pour l'ensemble des PFIC, même s'ils permettent une amélioration des symptômes et une diminution de la progression de la maladie, ce ne sont pas des traitements curatifs et ils ne représentent pas une alternative à la transplantation hépatique (Davit-Spraul 2012, Gomez-Ospina 2016).

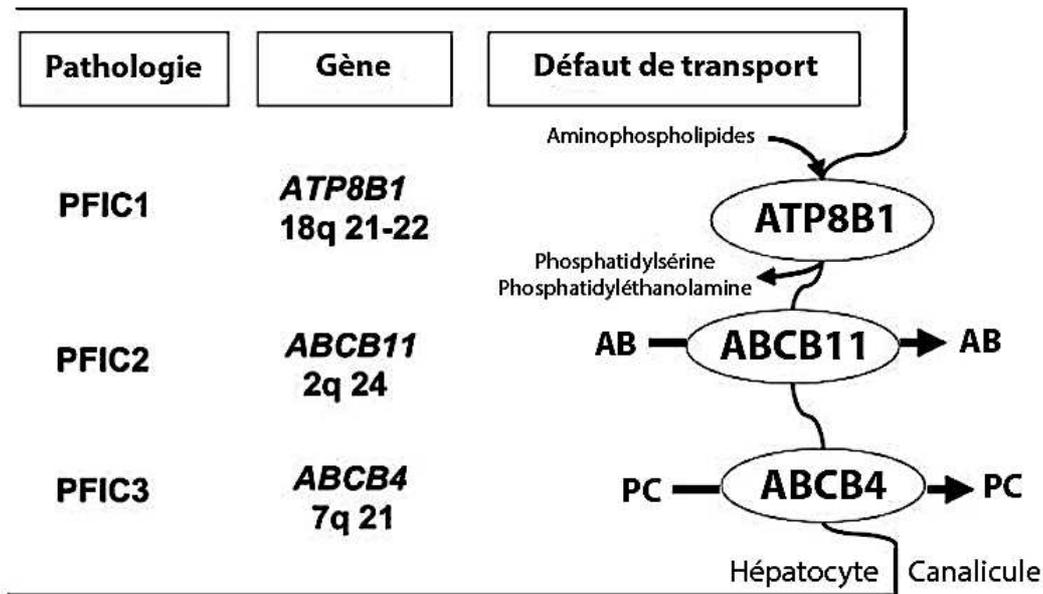


Figure 30 : Les PFIC1 à 3 sont dues à des défauts de protéines canaliculaires. Les gènes et défauts de transport impliqués sont représentés schématiquement sur un hépatocyte. AB : Acides Biliaires ; PC : Phosphatidylcholine. D'après (Davit-Spraul 2009)

IV.6.2. Le syndrome LPAC

Le syndrome LPAC survient chez le jeune adulte (avant 40 ans), il résulte de mutations généralement hétérozygotes d'*ABCB4* (Rosmorduc 2001, Rosmorduc 2007). Il s'agit d'une forme rare de lithiase intrahépatique cholestérolique. Le rapport cholestérol/phospholipides est anormalement élevé, ce qui conduit à l'apparition de cristaux de cholestérol dans les voies biliaires. À l'échographie, de nombreux calculs de cholestérol intra-hépatiques sont apparents expliquant les douleurs biliaires dont souffrent les patients. Ils peuvent également développer une angiocholite (infection bactérienne de la bile) ou une pancréatite. De plus une prolifération ductulaire et une inflammation portale peuvent se manifester. Ces atteintes persistent après cholécystectomie (Goubault 2019). Les patients souffrant du syndrome LPAC répondent bien au traitement par l'UDCA qui prévient la réapparition des symptômes en augmentant le pool hydrophile des acides biliaires (Angulo 2002).

IV.6.3. La cholestase gravidique (ICP)

La cholestase gravidique ou ICP (Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy) est une autre pathologie associée à des mutations d'*ABCB4*. Les patientes ont un important prurit, une élévation de la γ -GT sérique et une augmentation des sels biliaires plasmatiques pendant les deuxième et troisième trimestres de la grossesse. Les symptômes disparaissent quelques semaines après l'accouchement, néanmoins il existe un risque de naissance prématurée, de

souffrance fœtale due à la cholestase, et même de mort in utero. Le traitement à l'UDCA permet d'améliorer ces symptômes dès trois semaines de traitement et de mener la grossesse à terme (Angulo 2002, Berkane 2000).

Fréquemment, les femmes souffrant d'ICP développent une cholestase lorsqu'elles sont sous traitement hormonal pour leur contraception, cette pathologie est appelée Cholestase Induite par la Contraception (CIC) et la réponse à l'UDCA est également bonne (Ganne-Carrie 2003, Pasmant 2012). Il a de plus été montré que des rats mâles traités avec des œstrogènes développent une cholestase (Bossard 1993, Fiorucci 2005). Ces données suggèrent qu'œstrogènes et progestérone sont impliqués dans la régulation de l'activité ou de la transcription d'ABCB4. Le fait que les symptômes de l'ICP apparaissent au troisième trimestre de grossesse, lorsque les taux de progestérone et œstrogènes sont les plus élevés, renforce cette hypothèse.

	PFIC3	Syndrome LPAC	ICP/CIC
Transmission	Autosomique récessive	Autosomique récessive ou dominante	Multifactorielle et multigénique
Apparition	Enfance à jeune adulte	Avant 40 ans	Adulte
Ratio (homme/femme)	1	1/3	0/1
Prévalence	1 / 100 000	Inconnue	0,1% à 15% selon les origines ethniques
Description clinique	Prurit modéré, ictère. Réaction ductulaire, cholangite, lithiase biliaire. Évolution vers une cirrhose biliaire, une insuffisance hépatique. Hypertension portale.	Lithiase cholestérolique, épisodes de cholecystite, cholangite, calculs intrahépatiques.	Apparition de prurit aux second et troisième trimestres de la grossesse. Taux d'acides biliaires élevé dans le sérum.
Activité γ -GT sérique	Élevée	Élevée	Élevée
Phospholipides	Bas	Bas	Non dosés
Traitements actuels	UDCA en première intention. Transplantation hépatique.	UDCA	UDCA

Tableau 3 : Récapitulatif des caractéristiques de la PFIC3, du syndrome LPAC et de l'ICP. D'après Orphanet, (Berkane 2000, Colombo 2011, Davit-Spraul 2010, Degiorgio 2015, Gonzales 2009, Goubault 2019, Rosmorduc 2007)

IV.6.4. Autres pathologies

Des mutations d'*ABCB4* ont été associées à des cholestases chroniques inexplicées chez des patients adultes ou adolescents. Ces patients ne présentent pas d'ictère contrairement à la majorité des patients atteints de cholestases. Les foies des patients présentent souvent un état fibrotique et des lésions des canaux biliaires. Des infiltrats inflammatoires au niveau portal et parfois une réaction ductulaire sont également observés (Kano 2004, Ziol 2008). Des patients avec des cirrhoses biliaires primitives (Lucena 2003) ou souffrant de ductopénie (atrésie des voies biliaires) souffrent également de mutations d'*ABCB4* (Gotthardt 2008).

La prise de drogues, de médicaments (antibiotiques, anti-inflammatoires) ou la consommation de diverses plantes influent sur le fonctionnement de certains variants d'*ABCB4* avec pour effet l'apparition de DILI (Drug Induced Liver Injury). Dans la plupart des cas, les symptômes disparaissent après l'arrêt de la prise du composé impliqué (Lang 2007, Sundaram 2017).

Des mutations d'*ABCB4* ont été associées à des cholangiocarcinomes (Tougeron 2012) mais de plus en plus d'études se focalisent sur l'expression d'*ABCB4* dans d'autres types de cancers. Il en ressort que suite à des modifications épigénétiques l'expression d'*ABCB4* peut être inhibée dans certains cancers (Kiehl 2014) ou qu'il est surexprimé et confère des phénotypes de résistance à divers médicaments anti-cancéreux. Par exemple, dans le cancer du sein, des cellules tumorales en culture deviennent résistantes à la doxorubicine ou au paclitaxel (Huang 2018, Nemcova-Furstova 2016). De plus, des mutations d'*ABCB4* chez des patients constituent un marqueur de mauvais pronostic vital dans le cancer de la prostate (Sissung 2016).

IV.6.5. Mutations identifiées

À l'heure actuelle, plus de 500 mutations associées à l'une des trois principales pathologies (PFIC3, LPAC, ICP) ont été identifiées dans *ABCB4*. Elles sont retrouvées dans toutes les régions de la protéine, sans existence de hot spots. En 2016, l'équipe d'accueil a proposé une classification fonctionnelle des variants identifiés chez les patients (Delaunay 2016).

Les différentes classes de mutations

Toutes les mutations d'*ABCB4* n'ont pas été étudiées mais l'étude de nombreux variants identifiés chez des patients a permis de proposer une classification comprenant 5 catégories selon leurs phénotypes. On peut retrouver une partie des mutations identifiées dans des bases de données (LOVD, HGMD). La majorité des mutations caractérisées correspond à des mutations faux-sens mais on retrouve aussi des insertions/délétions ou des mutations non-sens

qui donnent lieu à une protéine tronquée. La sévérité des pathologies dépend du type de mutation et du statut génétique, qui peut être homozygote ou hétérozygote chez le patient. Les patients homozygotes pour des mutations non-sens développent le phénotype le plus sévère avec une PFIC3 précoce dès la naissance. Lors d'immunomarquages sur coupe de foie, la protéine n'est généralement pas détectée. Dans le cas de mutations faux-sens, la gravité de la maladie dépend de la classe de mutations. S'il reste une activité résiduelle d'ABCB4, la pathologie peut se déclarer tardivement et le patient peut répondre à un traitement à l'UDCA. Pour les patients atteints de PFIC3, la sévérité des symptômes dépend donc des mutations faux-sens et de leur statut homozygote ou hétérozygote composite. Pour le syndrome LPAC et l'ICP, les patients sont généralement hétérozygotes composites avec un allèle codant pour une protéine WT fonctionnelle, atténuant la gravité de la maladie (de Vree 1998, Jacquemin 2001). Les différentes mutations peuvent être répertoriées ainsi (Tableau 4) :

- **Classe I** : Cette classe regroupe les mutations non-sens, les délétions et insertions qui entraînent l'apparition de codons stop. Les ARNm contenant un codon stop prématuré peuvent être dégradés précocement par une voie spécifique appelée NMD (nonsense-mediated decay) (Kellermayer 2006). Ces mutations donnent lieu à une absence totale ou partielle de la protéine. La protéine tronquée traduite est alors souvent associée à une perte de fonction.
- **Classe II** : Les variants de classe 2 affectent le trafic d'ABCB4 avec une rétention partielle ou totale des mutants dans le réticulum endoplasmique due à un défaut de repliement. La protéine n'est pas adressée à la membrane canaliculaire mais sera dégradée.
- **Classe III** : Ces mutants sont matures et correctement exprimés au niveau du canalicule mais présentent un défaut d'activité. La capacité d'ABCB4 à transporter la PC dans la bile sera réduite ou absente.
- **Classe IV** : Cette classe comprend des mutants dont la stabilité d'ABCB4 à la membrane apicale est diminuée, alors que son adressage et son activité ne sont pas touchés.
- **Classe V** : Cette dernière classe rassemble les variants identifiés chez des patients mais pour lesquels aucun défaut de maturation, activité ou stabilité de la protéine n'a été détecté.

	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V
Défaut	Synthèse protéique (Codon stop)	Maturation	Activité	Stabilité	Pas de défaut apparent
Variants caractérisés	Nonsens, Décalage du cadre de lecture, Délétions	I490T I541F L556R Q855L	T34M R47G S346I F357L G535D G536R P726L T775M G954S S1076C S1176L G1178S	T424A N510S	T175A R625G
Thérapie potentielle	Translecteurs	Correcteurs, Chaperonnes pharmacologiques (Cyclosporines, analogues de Roscovitine)	Potentiateurs (VX-770)	Agonistes de récepteurs nucléaires, statines, Stabilisateurs	-

Tableau 4 : Classification des variations d'ABCB4 associées avec la PFIC3, le syndrome LPAC ou l'ICP. D'après (Bruneau 2017, Delaunay 2016)

IV.6.6. Traitements

UDCA, transplantations hépatiques et diversions biliaires : les thérapies actuelles

L'acide ursodésoxycholique (UDCA) est un acide biliaire aux propriétés hydrophiles. Il a été cristallisé au Japon en 1927 dans la bile d'ours où il est présent en grande quantité. La bile de l'Homme n'en contient qu'une faible proportion (environ 4%). L'UDCA sera synthétisé et utilisé dès les années 60 au Japon comme traitement pour dissoudre des calculs de cholestérol et pour traiter plusieurs pathologies biliaires sans effets secondaires notoires (Hagey 1993, Nakagawa 1977).

Les patients atteints de syndrome LPAC ou d'ICP sont traités avec l'UDCA et répondent très bien au traitement (Angulo 2002, Rosmorduc 2007). L'UDCA est également utilisé pour traiter d'autres pathologies telles que la cirrhose biliaire primitive, la cholangite sclérosante primitive, les hépatites chroniques, la NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, stéatose hépatique non alcoolique), ainsi que pour traiter les troubles hépatiques liés à la mucoviscidose (Boberg 1997, Paumgartner 2002, Podda 1989, Reardon 2016).

L'UDCA agit à différents niveaux. Il diminue l'hydrophobie du pool d'acides biliaires en réduisant la proportion d'acides chénodésoxycholique, cholique et désoxycholique (hépatotoxiques). Il diminue la réabsorption intestinale des acides biliaires et favorise leur élimination (Paumgartner 2002). Enfin, il a un rôle cytoprotecteur vis à vis des cellules hépatiques et des voies biliaires, et possède des propriétés anti-inflammatoires (Angulo 2002). L'UDCA est donné comme thérapie initiale pour les patients atteints de PFIC3 afin de réduire la toxicité des acides biliaires et de faciliter l'élimination du cholestérol. Il n'est cependant efficace que pour peu de patients. Lorsqu'il reste une activité résiduelle d'ABCB4, la PFIC3 est moins sévère et l'UDCA peut être bénéfique. Mais quand la sécrétion de phosphatidylcholine est absente ou très réduite, il n'améliore pas les symptômes des patients. Des méthodes chirurgicales de dérivation biliaire sont parfois utilisées en complément des traitements pharmacologiques. Elles permettent de diminuer la réabsorption des acides biliaires via la circulation entérohépatique. Selon les patients, elles peuvent améliorer le prurit des patients et retarder la transplantation hépatique mais aussi avoir des effets secondaires comme la malabsorption de vitamines (Henkel 2019).

La transplantation hépatique reste souvent la seule alternative thérapeutiques (Davit-Spraul 2009, Jacquemin 1997). Néanmoins, elle n'est pas sans risques, les patients peuvent rejeter le greffon et doivent suivre un traitement immunosuppresseur qui est à l'origine de nombreux effets secondaires sur le long terme (Calmus 2009). C'est pour ces raisons qu'il est indispensable de développer de nouvelles.

Récemment plusieurs études ont suggéré d'utiliser d'autres acides biliaires plus hydrophobes, comme les tauroursodésoxycholate (TUDC) la forme conjuguée de l'UDCA et le taurohyodésoxycholate (THDC) qui provient de la bile de rat. Ils stimulent la sécrétion de PC de façon plus efficace que l'UDCA dans des cellules exprimant ABCB4-WT mais n'ont pas encore été testés chez l'Homme (Alpini 2002, Ikeda 2019).

Nouvelles thérapies et pharmacothérapie ciblée

Le développement de thérapies alternatives est lié aux classes de mutations. Pour chaque classe, on peut proposer une ou plusieurs molécules, seule ou en combinaison « sur mesure » selon les mutations identifiées chez le patient, c'est le principe de la thérapie ciblée. La médecine personnalisée permettrait ainsi d'optimiser l'efficacité des traitements pharmacologiques. Cette démarche est employée pour les patients atteints de mucoviscidose qui peuvent bénéficier de plusieurs combinaisons de molécules : chaperonnes, potentiateurs, stabilisateurs... (Davies 2018, Keating 2018, Veit 2018) (Figure 31).

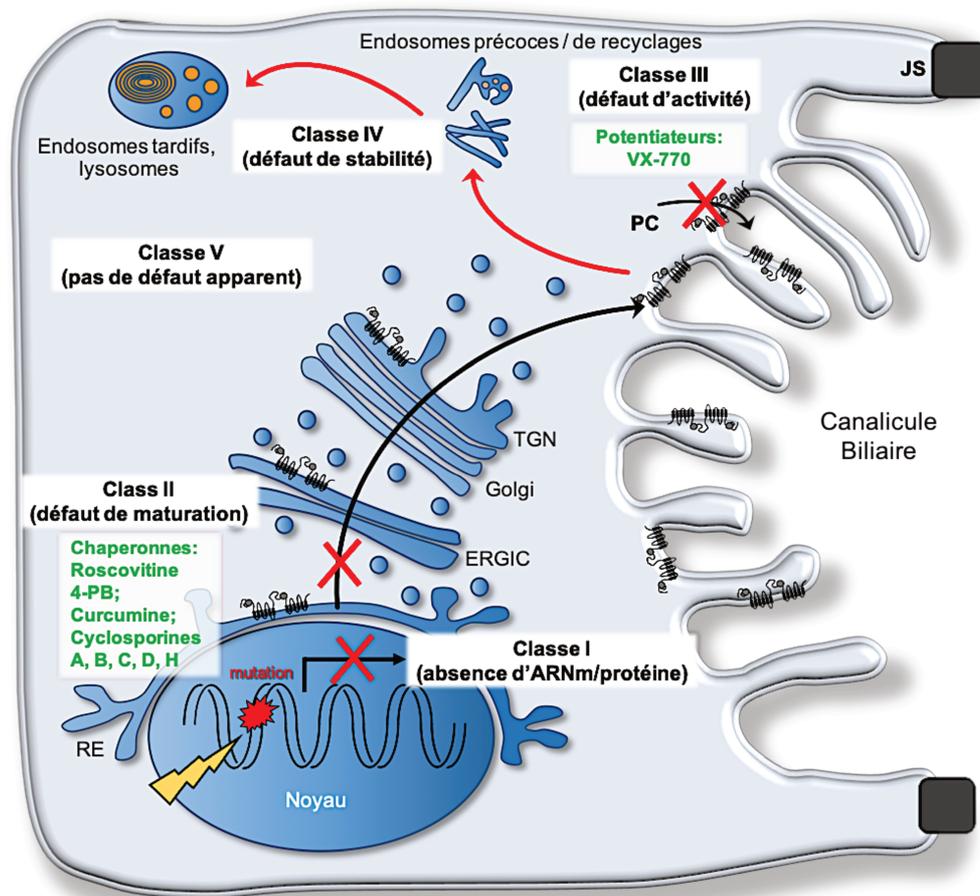


Figure 31 : Pharmacothérapie ciblée pour la PFIC3. JS : Jonctions serrées ; PC : Phosphatidylcholine ; RE : Reticulum endoplasmique ; ERGIC : ER-Golgi Intermediate Compartment ; TGN : Trans Golgi Network. D'après (Vauthier 2017)

Le rétablissement partiel de l'expression d'une protéine fonctionnelle pourrait suffire à ce que les patients atteints de PFIC3 répondent au traitement à l'UDCA et ainsi retarder ou même éviter la transplantation hépatique.

Thérapies géniques

Deux études récentes ont montré qu'il est possible de restaurer l'expression d'ABCB4 dans les foies de souris *Abcb4* ^{-/-} et de mesurer une sécrétion de PC dans la bile suffisante pour corriger le phénotype pathologique de ces souris. Dans les deux cas, la restauration de l'expression d'ABCB4 est capable de persister sur le long terme dans les cellules transduites grâce à l'utilisation d'un vecteur viral adéno-associé (AAV). Ce vecteur a déjà été utilisé avec succès en thérapie génique hépatique pour l'hémophilie B (Nathwani 2014) et des études cliniques avec ce vecteur sont en cours pour diverses pathologies. L'utilisation du vecteur AAV en thérapie génique serait une alternative très prometteuse à la transplantation pour soigner les patients atteints de PFIC3 (Aronson 2019, Siew 2019).

Mutations de classe I : Translecteurs

Les mutations de classe I induisent des codons stop prématurés à l'origine d'une protéine tronquée dégradée prématurément. Pour ce type de mutations, la translecture apparaît comme une solution encourageante dans le cadre de la médecine personnalisée pour traiter nombre de patients atteints de diverses pathologies. S'il n'y a pas de modification du cadre de lecture, il est même possible de restaurer une protéine fonctionnelle complète grâce à la translecture.

Les aminoglycosides ou aminosides sont des antibiotiques à l'activité anti-bactérienne dirigée contre des bacilles Gram négatifs. Ils ont la capacité d'interférer avec la traduction eucaryote en se fixant sur la petite sous-unité ribosomale impliquée dans la reconnaissance des ARNt. Ils permettent d'augmenter l'affinité de l'ARNt mais perturbent sa spécificité, ce qui facilite l'incorporation d'un acide aminé à la place du codon stop laissant la transcription se poursuivre (Pranke 2018).

L'efficacité de la translecture dépend de plusieurs facteurs :

- Le type de codon stop, le codon UGA répond le plus favorablement à la translecture (UAA < UAG < UGA).
- La séquence nucléotidique adjacente, par exemple un uracile en position -1 ou une cytidine en position +4 assurent une réponse optimale à la translecture (Floquet 2012).
- L'activité de la voie NMD.

La translecture représente une bonne initiative thérapeutique puisque de nombreux essais cliniques ont été réalisés ou sont en cours pour soigner des patients atteints de mucoviscidose. Sur huit études cliniques, on détecte une restauration partielle de l'activité de CFTR pour

environ 60% des patients (Clancy 2001, Clancy 2007, Kerem 2008, Pranke 2018, Sermet-Gaudelus 2010, Welch 2007, Wilschanski 2000, Wilschanski 2011).

Parmi les molécules favorisant la translecture chez les patients, on trouve la gentamicine et le G418 qui font partie de la famille des aminoglycosides. Néanmoins leur utilisation *in vivo* est limitée par leur caractère néphrotoxique. L'amikacine a l'avantage d'être moins toxique pour les reins que la gentamicine, elle est plus efficace que celle-ci à des doses administrables à l'Homme. Elle pourrait être le meilleur candidat parmi les aminoglycosides en tant que thérapie pour la translecture (Du 2006).

Un criblage à haut débit a permis l'identification d'un composé, le PTC124, une molécule translectrice efficace à des doses inférieures à celles utilisées pour la gentamicine (Sermet-Gaudelus 2010, Welch 2007). Hélas, le développement de cette molécule s'est arrêté en phase 3 d'essai clinique puisqu'aucun bénéfice respiratoire n'a réellement pu être démontré chez les patients atteints de mucoviscidose (Kerem 2014).

L'incorporation d'un acide aminé de façon arbitraire lors de la translecture peut aboutir à une protéine certes complète, mais mal repliée, non fonctionnelle ou dont la stabilité est diminuée. Il faut donc envisager des co-thérapies pour corriger le ou les défauts (repliement, activité...) engendrés par la translecture (Hagemeyer 2018).

Des travaux évaluant l'intérêt de la translecture pour la correction de mutations de classe I d'ABCB4 sont actuellement en cours dans notre équipe.

Mutations de classe II : Correcteurs

L'utilisation de chaperonnes pharmacologiques

Les mutations faux-sens peuvent induire un défaut de repliement de la protéine qui sera retenue sous forme immature dans le RE avant d'être dégradée sans être adressée à la membrane plasmique. C'est le cas pour la mutation I541F identifiée chez un patient atteint de PFIC3, et située dans le NBD1 d'ABCB4. L'abaissement de la température à 27°C ou le traitement *in vitro* avec des chaperonnes comme les cyclosporines permet de restaurer le trafic du mutant dans des cellules en culture (Delaunay 2009, Delaunay 2016, Gautherot 2012).

La cyclosporine A est un substrat d'ABCB1 (Saeki 1993) qui restaure le trafic de mutants d'ABCB1 montrant des défauts de maturation et d'adressage en diminuant leur association avec la chaperonne cellulaire Hsp70 (Kapoor 2013). Elle est hydrophobe et peut diffuser à travers les membranes jusqu'au RE. Notre équipe a publié des travaux montrant que la cyclosporine A et plusieurs de ses analogues (B, C, D, H) permettent d'adresser plusieurs variants de classe II

d'ABCB4 identifiés chez des patients, I541F, L556R, Q855L, mais inhibent leur activité (Delaunay 2016).

L'utilisation de chaperonnes pharmacologiques pour la correction des défauts de maturation dus à des variations dans des transporteurs ABC est très répandue dans la littérature. Grâce à des études de screening à haut débit, de nombreux correcteurs ont été identifiés pour la correction de la mutation $\Delta F508$ de CFTR. Ils sont de plus en plus utilisés pour restaurer le trafic d'autres protéines, à l'instar d'ABCG2, ABCA4 ou ABCA3 (Kinting 2018, Sabirzhanova 2015, Woodward 2013).

Le 4-phenylbutyrate (4-PB), une chaperonne à l'origine utilisée pour corriger le trafic du $\Delta F508$ de CFTR permet de corriger un mutant d'ABCG2 et plusieurs mutants d'ABCB11 et d'ABCB4 (Gordo-Gilart 2016, Hayashi 2007, Rubenstein 1997, Woodward 2013). L'utilisation du 4-PB *in vitro* comme *in vivo* permet d'augmenter l'adressage d'ABCB11 à la membrane canaliculaire et la sécrétion d'acides biliaires chez les rats traités. Ces résultats particulièrement encourageants ont été confirmés avec succès lorsque le 4-PB a été administré à des patients souffrants de PFIC2 (Gonzales 2012, Gonzales 2015).

Le VRT-325 (ou CFcor-325) peut induire 20 à 30% de maturation pour le variant $\Delta F508$ de CFTR, et a démontré son efficacité sur des mutants d'ABCB1 (Van Goor 2006, Wang 2007).

La roscovitine, une molécule inhibitrice des CDKs (Cyclin-Dependent Kinase) a été identifiée lors d'un screening d'une librairie de composés dont l'objectif était de découvrir de nouvelles molécules permettant la correction du mutant $\Delta F508$ de CFTR. La roscovitine perturbe l'interaction entre la calnexine et le variant $\Delta F508$, facilitant ainsi la sortie de CFTR- $\Delta F508$ du réticulum endoplasmique et son adressage à la membrane plasmique où le canal d'ions chlorures est actif (Norez 2014). L'utilisation de cette molécule est actuellement en phase II d'essai clinique chez des patients homozygotes pour la mutation $\Delta F508$. (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02649751>) Notre équipe a montré que la roscovitine restaure également l'adressage du variant ABCB4-I541F (Classe II) mais qu'elle inhibe la sécrétion de phosphatidylcholine. C'est pour cette raison que des analogues de la roscovitine ont été synthétisés et testés, certains permettant de restaurer l'adressage de plusieurs variants de classe II d'ABCB4 : I541F, I490T et L556R. Après traitement, ces mutants retenus sont retrouvés sous forme mature en western blot et au canalicule en immunofluorescence. Le plus intéressant est qu'une fois à la membrane, ces variants ont une activité résiduelle suffisante pour envisager une réponse à l'UDCA pour les patients porteurs de ces mutations (Vauthier 2019) (Annexe 2).

La modulation de chaperonnes endogènes

Plutôt que d'utiliser des molécules agissant comme chaperonnes pharmacologiques, une possibilité serait de moduler l'activité des chaperonnes endogènes impliquées dans la rétention. La Hsc70 est une chaperonne cellulaire impliquée dans le repliement des protéines et dans la dégradation de celles montrant des défauts de repliement. La Hsc70 interagit avec les formes WT et $\Delta F508$ de CFTR mais avec une affinité plus importante pour le variant $\Delta F508$. Lorsque cette interaction Hsc70-CFTR $\Delta F508$ a lieu, la protéine CHIP - en se liant au niveau du C-terminal de Hsc70 - catalyse la poly-ubiquitination du mutant qui sera dégradé au niveau du protéasome. Une molécule, l'apoptozole, inhibe l'activité de la Hsc70, réduisant ainsi l'efficacité du contrôle qualité et permettant la maturation et l'adressage membranaire du mutant $\Delta F508$ (Cho 2011).

Le ciblage de la calnexine, une autre chaperonne endogène, avec la N-butyldeoxynojirimycine (ou miglustat) entrave l'interaction de cette chaperonne avec le mutant CFTR- $\Delta F508$. Ce traitement permet de restaurer un mutant fonctionnel à la membrane (Norez 2006).

L'identification des chaperonnes impliquées dans le repliement d'ABCB4, en particulier pour ses mutants de classe II, permettrait de les cibler pour moduler leur activité et aider les mutants à échapper au contrôle qualité réalisé dans le RE afin qu'ils soient adressés à la membrane canaliculaire des hépatocytes plutôt que dégradés prématurément.

Mutations de classe III : Potentiators

De plus en plus de publications montrent que des molécules correctrices identifiées pour CFTR peuvent être efficaces pour la correction de défauts équivalents pour d'autres transporteurs ABC (Hayashi 2007, Rubenstein 1997, Sabirzhanova 2015, Vauthier 2019, Woodward 2013). De nombreuses molécules ont été proposées pour la correction des mutations de classe II d'ABCB4. Cependant la majorité des variations étudiées affectent aussi son activité (Delaunay 2016) et il n'existe aucun traitement pour corriger les défauts d'activité d'ABCB4 à ce jour.

Cinq mutations situées dans les motifs conservés, Walker A, Walker B et signatures ont été identifiées chez des patients atteints de PFIC3, ICP ou de syndrome LPAC. Des alignements de séquence nous ont permis de mettre en évidence que trois de ces mutations sont homologues de mutations de CFTR retrouvées chez des patients atteints de mucoviscidose. Ce sont des mutations affectant la conductance du canal chlore, ce qui conduit à une absence de sécrétion d'ions Cl⁻. Ce défaut d'activité de CFTR peut être corrigé par une molécule dite « potentiatrice » appelée VX-770 ou Ivacaftor qui est cliniquement approuvée et utilisée pour traiter des patients

pour une dizaine de mutations de classe III et IV de CFTR (Yu 2012). Nous avons montré que ces cinq mutations identifiées dans des domaines conservés sont impliquées dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP et entraînent des défauts de sécrétion de PC. Dans ces travaux, le VX-770 permet de restaurer partiellement l'activité d'ABCB4 pour ces cinq mutants. C'est la première molécule identifiée qui corrige un défaut de fonction d'ABCB4. Ces effets seront détaillés dans la partie Résultats (Bruneau*, Delaunay* 2017).

D'après nos observations, le VX-770 ne permet pas de corriger toutes les mutations de classe III d'ABCB4, d'autres potentiateurs doivent donc être testés sur les variants n'y répondant pas. Le GLPG1837, un autre potentiateur récemment découvert assure une meilleure efficacité que le VX-770 pour la correction du variant G551D de CFTR, qui est l'équivalent d'un variant d'ABCB4 (Yeh 2017). Il serait donc intéressant de tester ce nouveau potentiateur sur des variants de classe III d'ABCB4.

Mutations de classe IV

Les mutants de classe IV sont matures, correctement adressés, et actifs mais leur stabilité est diminuée. Deux stratégies peuvent être proposées pour corriger des défauts engendrés par ces variants : augmenter leur expression, ou les stabiliser à la membrane.

Augmenter l'expression d'ABCB4

L'augmentation de l'expression des transporteurs ABC canaliculaires pour moduler la sécrétion biliaire a été proposée comme traitement des cholestases (Zollner 2009). L'expression d'ABCB4 est régulée au niveau transcriptionnel par des récepteurs nucléaires, dont FXR régulé par les acides biliaires, particulièrement l'acide chénodésoxycholique. Le GW4064 et l'acide 6-éthyl chénodésoxycholique (6-ECDCA) sont deux analogues chimiques pouvant activer FXR. Une fois activé, FXR diminue la synthèse d'acides biliaires ainsi que leur réabsorption au pôle basal et augmente leur sécrétion via ABCB11 tout en stimulant celle de la PC en activant la transcription d'ABCB4 (Fiorucci 2005, Jung 2007). L'activation de PPAR α par le bezafibrate permet aussi d'augmenter l'expression d'ABCB4 dans des cultures cellulaires et possède par ailleurs des effets anti-cholestatiques chez des malades atteints de cholangite biliaire primitive (Honda 2013).

Augmenter la stabilité à la membrane d'ABCB4

Deux mutations d'ABCB4 identifiées chez des patients atteints de PFIC3 affectent la stabilité membranaire de la protéine. Pour les variants T424A et N510S, l'expression de la protéine en western blot est très inférieure à celle d'ABCB4-WT et ce malgré une quantité équivalente d'ARNm. Des expériences ont confirmé que ces deux mutants sont 20 à 30% moins stables que la protéine WT (Delaunay 2016).

Plutôt que d'augmenter l'expression de ces mutants de façon transcriptionnelle, on peut augmenter leur stabilité à la membrane. Aucune molécule n'a pour le moment été proposée pour ABCB4. Néanmoins, de récents travaux de notre équipe ont démontré l'importance d'un motif Q-N-L dans le domaine C-terminal d'ABCB4 dans la stabilité de la protéine au canalicule. Au niveau de ce motif, une interaction a lieu avec EBP50, une protéine à motif PDZ. L'extinction par ARN interférent de ce partenaire diminue la présence d'ABCB4 à la membrane apicale, puisque l'absence d'EBP50 entraîne une internalisation plus rapide d'ABCB4 (Venot 2016). La modulation de cette interaction avec EBP50 pourrait constituer un moyen d'augmenter l'expression d'ABCB4 à la membrane canaliculaire des hépatocytes.

Pour la protéine CFTR, plusieurs mécanismes impliqués dans la stabilité membranaire de la protéine ont été mis en évidence. Une étude a montré que l'extinction de deux partenaires de CFTR, l'ubiquitine ligase CHIP et DAB2 (une protéine impliquée dans l'endocytose de nombreuses protéines transmembranaires) augmente la stabilité du mutant $\Delta F508$ -CFTR une fois adressé à la membrane (Fu 2015). Parmi les nombreux partenaires protéiques identifiés pour CFTR, on trouve la GTPase Cdc42 et son effecteur N-WASP. L'inhibition pharmacologique de ces deux protéines a pour conséquence une diminution de la quantité de CFTR à la membrane plasmique due à une endocytose accrue. Mais l'extinction par ARN interférence de Cdc42 a des effets inverses avec une augmentation de la stabilité membranaire de CFTR. Les auteurs expliquent ces différences par les effets divergents de ces deux méthodes sur le cytosquelette d'actine. En effet, l'extinction de Cdc42 par siRNA ne modifie pas l'organisation du cytosquelette d'actine contrairement aux autres méthodes. Les inhibiteurs pharmacologiques perturbent le réseau d'actine corticale, CFTR serait alors moins bien « ancré » à la membrane et plus facilement internalisé par endocytose (Ferru-Clement 2015).

Un screening à haut débit a mis en évidence le rôle d'une vingtaine de kinases dans la régulation de la stabilité de CFTR. Des auteurs ont montré qu'il est possible d'augmenter l'expression membranaire du mutant $\Delta F508$ -CFTR en utilisant des ARN interférents dirigés contre ces kinases en combinaison avec le VX-809 (lumacaftor). Dans cette étude, ils ciblent les kinases

CAMKK1 et RAF1 qui favorisent le plus l'expression de surface du mutant Δ F508-CFTR (Perkins 2018).

IV.6.7. Modèles d'étude des pathologies liées à ABCB4

Il existe des souris invalidées pour ABCB4, les souris *Abcb4* *-/-*. Elles ont permis de découvrir le rôle d'ABCB4 dans la sécrétion biliaire et de mettre en évidence le substrat transporté, la phosphatidylcholine (Smit 1993). Hélas, elles ne représentent pas le meilleur modèle pour l'étude de la PFIC3 ou du syndrome LPAC. En effet, la composition de leur bile diffère de celle de l'Homme et est plus hydrophile (Li 2019). Elles développent donc des cholestases moins sévères que l'Homme et sont généralement utilisées comme modèle d'étude des cholangites sclérosantes, de la fibrose et de cancer du foie (CHC) (Fickert 2004, Ikenaga 2015, Mariotti 2018, Mauad 1994, Popov 2005).

Plusieurs équipes ont cherché à développer un modèle de souris humanisée exprimant ABCB4 humain dans les hépatocytes de souris *Abcb4* *-/-*. Un premier modèle de souris exprimant ABCB4-WT a été mis au point. L'expression d'ABCB4 humain aux canalicules permet de restaurer la sécrétion de PC dans la bile des souris (Smith 1998). Récemment, un modèle de souris exprimant ABCB4 de façon stable dans le temps a été mis au point en utilisant des vecteurs adénovirus (Aronson 2019, Siew 2019). Ce modèle pourrait s'avérer très utile en recherche puisqu'il serait possible d'exprimer ABCB4 muté dans le foie des souris, et permettrait enfin d'avoir un outil pour tester des molécules pharmacologiques développées selon la classe de mutation pour le traitement des patients atteints de PFIC3, et ce dans une optique de médecine personnalisée.

Chapitre V – Mécanismes impliqués dans l'expression membranaire des transporteurs ABC hépatocytaires

Ces dernières années, la réalisation de cribles en double-hybride dans des banques de foie a permis d'identifier de nombreux partenaires protéiques des transporteurs ABC exprimés au canalicule biliaire. Certains partenaires impliqués dans l'adressage, la stabilité membranaire ou le recyclage pourraient constituer d'intéressantes cibles dans le cadre de thérapies personnalisées.

La sécrétion biliaire doit être régulée de façon précise dans le temps. L'expression des transporteurs canaliculaires à la membrane plasmique est donc un bon moyen de moduler la sécrétion biliaire à court terme. Cette régulation se fait sur différents niveaux : disponibilité des substrats (acides biliaires, cholestérol), hormones, composés qui vont entraîner soit l'adressage membranaire des transporteurs soit leur endocytose avec une dégradation ou une rétention dans des compartiments sous-membranaires. Ces différents médiateurs de l'expression des transporteurs ABC s'expriment souvent par l'intermédiaire de voies de signalisation et par l'activation de partenaires protéiques (kinases, ubiquitine ligases), permettant une réponse rapide (quelques minutes) du foie, par exemple pour un besoin accru d'acides biliaires après un repas (Haussinger 2000, Roma 2000).

Le cytosquelette joue un rôle clé dans ces adressages et endocytoses. Il a été montré pour l'échangeur canaliculaire d' $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ mais aussi pour ABCB1, ABCB4, ABCB11 et ABCC2 que des traitements avec de la colchicine (inhibiteur de la polymérisation des microtubules) et de la phalloïdine (inhibiteur du remodelage du cytosquelette d'actine) empêchent leur recrutement à la membrane canaliculaire (Benedetti 1994, Gatmaitan 1997, Kipp 2001, Rost 1999).

V.1. ABCB1

V.1.1. MLC2

Un screening en double hybride dans une banque d'ADN de foie de rat a mis en évidence un partenaire commun à plusieurs transporteurs hépatiques : la chaîne légère de myosine II non musculaire que l'on retrouve sous différents noms, MLC2, MRLC, MYL12, MYL9. C'est une petite protéine qui interagit directement avec les domaines linker d'ABCB1, ABCB4 et ABCB11 (Bajaj 2010, Chan 2005). Des expériences de GST-pulldown avec la protéine tronquée ont montré que c'est la région N-terminale de MLC2 qui est impliquée dans

l'interaction avec le linker d'ABCB1 et que la 3^{ème} boucle de MLC2 permet de stabiliser cette interaction. La phosphorylation de deux résidus du N-terminal de MLC2 diminue l'interaction de cette protéine avec le linker d'ABCB1. De plus, lorsque la phosphorylation de ces deux acides aminés est inhibée, l'activité d'ABCB1 augmente (Bajaj 2010).

V.1.2. Kinases

Depuis la découverte de sites de phosphorylation dans la séquence d'ABCB1, de plus en plus de kinases susceptibles de réguler son trafic intracellulaire ou son activité ont été identifiées. La PKA et les PKC phosphorylent chacune trois résidus situés dans le linker d'ABCB1, néanmoins le rôle de ces phosphorylations reste controversé. De nombreuses études ont montré que l'activation de l'AMPc stimule l'adressage canaliculaire de plusieurs transporteurs ABC dans des lignées hépatocytaires et *in vivo* dans le foie de rats (Park 2012, Roelofsen 1998, Zucchetti 2011). La PKA est l'un des effecteurs de l'AMPc, et son inhibition régule l'adressage canaliculaire d'ABCB1 dans des hépatocytes. La PKA serait en effet impliquée dans l'adressage direct d'ABCB1 de l'appareil de Golgi à la membrane apicale. Cependant lors de l'inhibition de la PKA, le transporteur pourrait toujours accéder au canalicule par transcytose via la membrane basolatérale (Wojtal 2006).

La PKC phosphoryle plusieurs résidus au niveau de séquence consensus dans le linker d'ABCB1. Certains de ces résidus peuvent être phosphorylés *in vitro* par la PKA comme par la PKC (Chambers 1994, Chambers 1993). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques dirigés contre PKC peut inhiber le phénotype de résistance conféré aux cellules par ABCB1 en diminuant modérément son activité de sécrétion. (Castro 1999) De plus, la substitution de ces sites de phosphorylation n'a aucun effet sur l'adressage ou l'activité du transporteur (Germann 1996). Le rôle de l'interaction d'ABCB1 avec la PKC reste donc incertain. La famille des PKC comprenant plusieurs isoformes, on peut supposer que l'utilisation d'inhibiteurs plus spécifiques pourrait avoir un effet plus important sur l'expression et ou l'activité d'ABCB1 et permettrait de comprendre le rôle de l'interaction d'ABCB1 avec les PKC.

L'utilisation d'inhibiteurs de MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase), une kinase faisant partie de la voie de signalisation des MAPK, diminue l'expression d'ABCB1 sans modification de la quantité de ses transcrits. De plus, la surexpression de différentes protéines intervenant dans la voie des MAPK, dont MEK, augmente la quantité d'ABCB1 à la membrane apicale (Katayama 2014).

Au début des années 2000, l'implication de la PI3K dans le trafic intracellulaire de plusieurs protéines membranaires a été démontrée (Misra 1998, Misra 1999, Misra 2003, Sai 1999). Une étude a décrit un rôle équivalent de la PI3K dans l'adressage de plusieurs transporteurs ABC : ABCB1, ABCB4 et ABCB11. L'administration de taurocholate à des souris augmente le recrutement et l'activité de la PI3K, ainsi que l'expression membranaire de ces trois transporteurs. A l'inverse, la perfusion de foie de rats avec un inhibiteur de la PI3K, la wortmannin, diminue l'activité de ces transporteurs suggérant une baisse de leur adressage à la membrane canaliculaire des hépatocytes, et ce malgré un traitement avec du taurocholate (Misra 1998).

Une autre kinase, plus atypique, a été étudiée pour sa participation au trafic d'ABCB1. Il s'agit de Pim-1, qui co-immunoprécipite avec ABCB1 et la phosphoryle. L'extinction de l'expression de Pim-1 par shRNA ou siRNA diminue la forme mature d'ABCB1 en western-blot. Pim-1 stabilise donc ABCB1 à la membrane et prévient sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome (Xie 2010).

V.1.3. Phosphatase

A l'instar des kinases, le complexe de phosphatases PP5/PPP2R3C interagit avec ABCB1 et régule son expression membranaire et sa fonction. Les deux sous-unités de ce complexe co-immunoprécipitent avec ABCB1. Ce complexe déphosphoryle ABCB1 au niveau des sites de phosphorylation des kinases PKA et PKC. L'extinction de PP5/PPP2R3C ou d'une des sous-unités de ce complexe augmente l'expression membranaire d'ABCB1 ainsi que son activité. Les phosphatases, comme les kinases sont donc impliquées dans la régulation de l'expression d'ABCB1 à la membrane plasmique (Katayama 2014).

V.1.4. Rab 4 et 5

De l'endocytose au ré-adressage à la membrane, les protéines Rab sont impliquées dans de nombreuses étapes du trafic intracellulaire des transporteurs ABC (Figure 32) (Schroeder 2009).

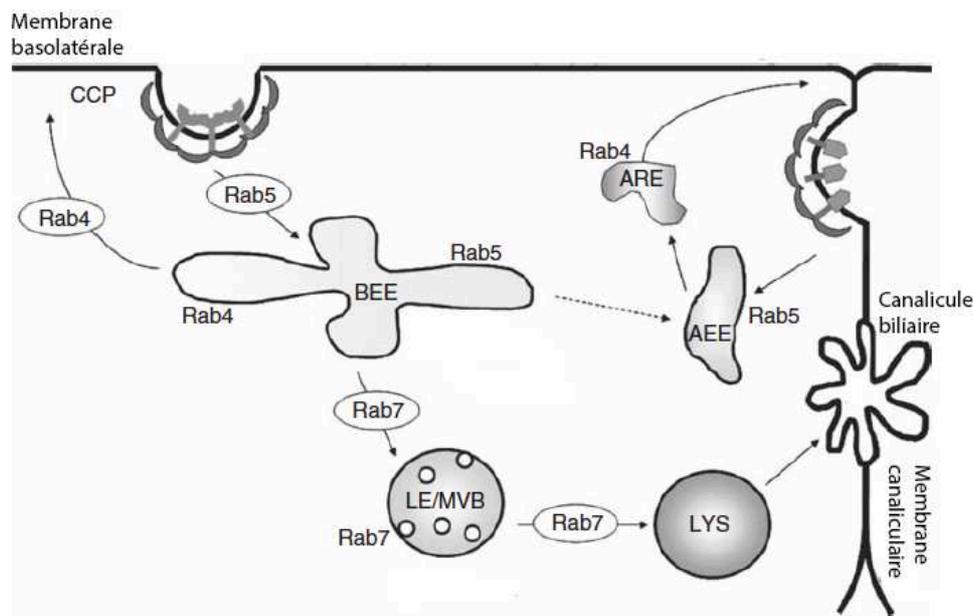


Figure 32 : Distribution des protéines Rab4, 5 et 7 dans les différents compartiments intracellulaires des hépatocytes. Les GTPases Rab contribuent à la régulation du trafic vésiculaire vers les endosomes précoces (Rab5) et tardif (Rab7) ainsi qu'au recyclage vers la membrane plasmique (Rab4). Un compartiment post-Golgien positif pour Rab11 est aussi impliqué dans l'adressage membranaire d'ABCB11, il n'est pas représenté sur ce schéma. D'après (Schroeder 2009)

L'implication de Rab5 dans le recyclage de différentes protéines ayant été montrée, des auteurs ont voulu déterminer son rôle dans l'endocytose d'ABCB1 en surexprimant Rab5 dans des modèles de cellules cancéreuses. Ils ont observé une augmentation de l'endocytose du transporteur dans les cellules transfectées avec Rab5-WT ainsi qu'une diminution de la présence d'ABCB1 à la membrane plasmique lors de cette surexpression. La surexpression de Rab5 diminue ainsi la capacité des cellules à développer un phénotype de résistance aux drogues et diminue leur survie face à des traitements par chimiothérapie (Kim 1997). Un autre groupe a montré que suite à l'utilisation d'un dominant négatif de Rab5, ABCB1 est majoritairement exprimé dans un des compartiments intracellulaires identifiés comme étant des endosomes de recyclage et des endosomes tardifs. De façon logique, suite à cette rétention, les auteurs observent une accumulation de substrats d'ABCB1 dans les cellules transfectées avec le dominant négatif de Rab5 (Fu 2007).

Un screening double hybride avec le domaine C-terminal d'ABCB1 et une banque de protéines de cerveau a identifié Rab4 comme partenaire. Cette protéine Rab4 est essentiellement exprimée au niveau des endosomes précoces et des endosomes de recyclage. La surexpression de Rab 4 provoque une augmentation de la fraction intracellulaire d'ABCB1, qui colocalise alors avec le marqueur des endosomes précoces EEA1, ainsi qu'une accumulation

intracellulaire de substrat d'ABCB1 témoignant d'une diminution de son activité sécrétrice. A l'inverse, l'extinction de l'expression de Rab4 par ARN interférent augmente l'expression membranaire d'ABCB1 ainsi que son activité. La petite GTPase Rab4 joue donc un rôle dans l'endocytose d'ABCB1 (Ferrandiz-Huertas 2011).

Les petites GTPases de la famille Rab sont impliquées dans les phénomènes d'endocytose et d'exocytose du transporteur ABCB1. La modulation de leur expression est donc proposée comme solution thérapeutique pour diminuer l'expression d'ABCB1 dans des tumeurs (Ferrandiz-Huertas 2011, Fu 2007).

V.1.5. Bap29varP

Un crible double hybride avec le domaine N-terminal d'ABCB1 a révélé l'existence d'un nouveau partenaire, la protéine Bap29varP. Cette isoforme de la protéine Bap29 appartient à une famille de protéines du réticulum endoplasmique. Les Bap29/Bap31 sont impliquées dans le contrôle qualité de plusieurs protéines membranaires et leur sortie du RE, comme la protéine CFTR (Quistgaard 2013). La région C-terminale de Bap29varP co-immunoprécipite avec ABCB1 et colocalise avec ce transporteur dans le RE. Les auteurs ont montré que dans une lignée cellulaire n'exprimant pas Bap29varP, ABCB1 est retenu dans le RE alors que dans une lignée cellulaire exprimant Bap29varP, ABCB1 est exprimé à la membrane plasmique. Ces résultats suggèrent que Bap29varP joue un rôle dans la sortie du RE d'ABCB1 et son adressage membranaire (Rao 2008). Des résultats similaires ont été obtenus pour CFTR lorsque l'expression de la protéine Bap31 est invalidée par ARN interférent (Lambert 2001).

V.2. ABCC2

V.2.1. Kinases

Comme pour ABCB1, plusieurs études ont montré l'implication des PKC dans l'adressage d'ABCC2. Lorsque des lignées de cellules hépatocytaires ou des foies isolés de rats sont traités avec du PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), un activateur des kinases suivantes : PKC α , PKC β 1 et β 2, PKC γ , PKC δ , PKC ϵ , et PKC ξ , le nombre de canalicules positifs pour ABCC2 diminue et un marquage à la membrane basolatérale apparaît (Kubitz 2001). Une autre étude montre que suite à l'administration de TUDCA dans des foies perfusés de rat, l'isoforme α de la kinase PKC est relocalisée et ABCC2 est adressé à la membrane canaliculaire (Beuers 2001). Au contraire, la PKC ϵ , activée par l'acide tauroolithocholique, entraîne l'endocytose d'ABCC2 (Schonhoff 2013).

La PKA, suite à son activation par l'AMPc, est également impliquée dans l'adressage d'ABCC2 à la membrane canaliculaire après le recrutement d'un pool intracellulaire (Roelofsen 1998). Par ailleurs, l'endocytose du transporteur ABCC2 a lieu suite à l'activation de la kinase Fyn appartenant la famille des kinases Src (Cantore 2011).

V.2.2. Protéines de la famille ERM, Ezrine et Radixine

Des co-immunoprécipitations réalisées avec des lysats de foies humains ont mis en évidence l'interaction d'ABCC2 avec l'ezrine, une protéine de la famille ERM (Ezrin Radixin Moesin) qui interagit avec l'actine pour organiser des structures comme le cortex d'actine sous-membranaire ou les microvillosités (Bretscher 1997). Cette interaction a lieu lorsque l'ezrine est phosphorylée sur l'une de ses thréonines, ce qui a pour conséquence une diminution de l'expression d'ABCC2 à la membrane apicale. L'expression d'un dominant négatif de l'ezrine montre une augmentation d'ABCC2 à la membrane plasmique alors qu'une construction constitutivement active diminue de moitié son expression membranaire. Trois isoformes de PKC, α , δ , et ϵ sont surexprimées dans des foies cholestatiques de patients et co-immunoprécipitent avec l'ezrine. Suite à l'expression d'un mutant constitutivement actif de la PKC α , la phosphorylation de l'ezrine augmente et l'expression membranaire d'ABCC2 diminue drastiquement (Chai 2015) (Figure 33).

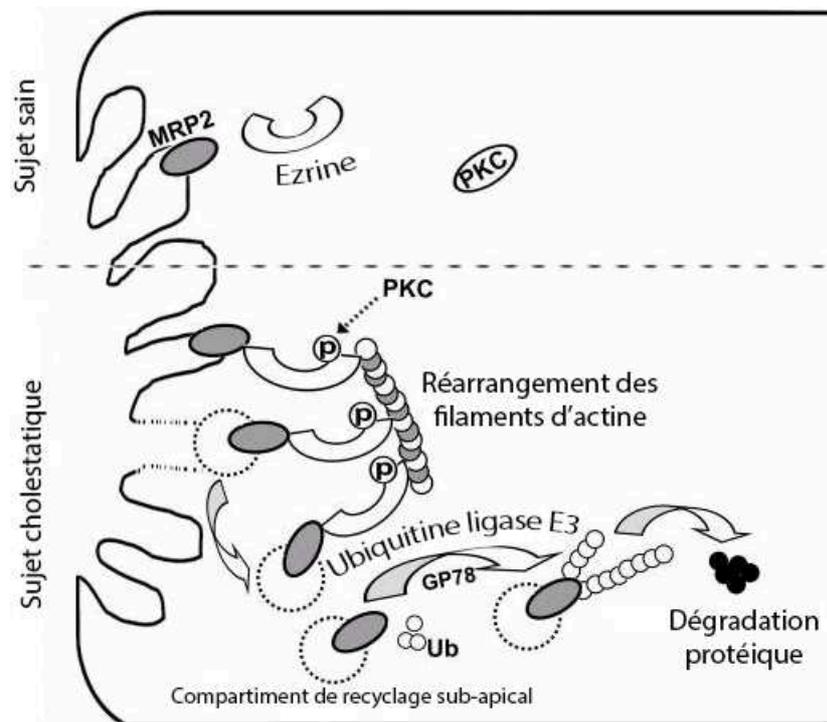


Figure 33 : Modèle de régulation de l'expression canaliculaire d'ABCC2 chez des sujets sains ou atteints de cholestase.

L'augmentation de l'activité catalytique de PKC conduit à une phosphorylation accrue de l'ezrine sur sa Thr567. L'augmentation de la phosphorylation de l'ezrine entraîne une augmentation de l'internalisation d'ABCC2 dans un compartiment cytosolique sub-apical, puis sa dégradation. D'après (Chai 2015)

Une autre protéine de la famille ERM interagit avec ABCC2, la radixine. Des souris invalidées pour la radixine développent un phénotype équivalent au syndrome Dubin-Johnson, à cause d'une sévère réduction de l'expression de la protéine ABCC2 au canalicule, sans modification de ses ARNm. Cet effet est spécifique puisque les expressions d'autres protéines canaliculaires ne sont pas affectées par cette invalidation de la radixine. L'interaction a été confirmée in vitro par GST-pulldown (Kikuchi 2002).

V.2.3. Protéines à domaines PDZ : EBP50/NHERF-1, PDZK1, CAL

ABCC2 interagit directement avec EBP50 (aussi appelée NHERF-1) via son motif de liaison aux protéines à domaine PDZ situé en C-terminal. ABCC2 et EBP50 colocalisent à la membrane apicale des hépatocytes dans des foies de rats. Dans des foies de souris knock-out pour *EBP50*, la quantité de transcrits pour ABCC2 ne varie pas, alors que l'expression de la protéine est diminuée de moitié chez les souris *EBP50* *-/-* par rapport aux WT. Cette diminution de l'expression d'ABCC2 dans les foies de souris *EBP50* *-/-* est associée à une diminution du flux biliaire et de sécrétion de GSH. EBP50 semble donc impliquée dans la stabilité d'ABCC2 à la membrane plasmique puisque son absence n'empêche pas l'adressage canaliculaire du transporteur mais diminue son expression membranaire. De plus, EBP50 joue un rôle dans la régulation de la sécrétion de GSH par ABCC2, d'où une diminution de sa sécrétion dans la bile chez les souris *EBP50* *-/-* (Li 2010).

Une autre protéine à domaine PDZ appelée PDZK1 a été identifiée par crible double-hybride. Lorsqu'un mutant dominant négatif de PDZK1 est exprimé, l'expression d'ABCC2 à la membrane canaliculaire est réduite et on observe son accumulation dans des compartiments intracellulaires (Emi 2011, Kocher 1999).

A l'inverse d'EBP50, CAL, une autre protéine à domaine PDZ, régule négativement l'expression d'ABCC2. Cette protéine est localisée au niveau du réseau trans-golgien dans les hépatocytes de rat. Son expression est augmentée dans le foie des souris *EBP50* *-/-*. Dans des cellules co-transfectées avec la protéine CAL, la quantité de la forme mature d'ABCC2 est diminuée. Ce nouveau partenaire d'ABCC2 régule donc sa sortie de l'appareil de Golgi en l'y retenant sous forme d'un complexe CAL-ABCC2 (Li 2017).

V.3. ABCB11

V.3.1. HAX-1

HAX-1, une petite protéine exprimée abondamment dans le foie et réorganisant l'actine corticale, a été identifiée comme partenaire du domaine linker d'ABCB11, mais également de ceux d'ABCB1 et ABCB4. La protéine HAX-1 est très exprimée au niveau des membranes apicales où elle colocalise avec ABCB11. Suite à la réduction de son expression par ARN interférent, on observe une augmentation de l'expression d'ABCB11 au pôle apical et une stabilité accrue de la protéine à la membrane. Ces effets sont reproduits en bloquant l'endocytose et par transfection d'un dominant négatif de la cortactine, suggérant que HAX-1 est impliquée dans l'endocytose clathrine-dépendante d'ABCB11 (Ortiz 2004).

V.3.2. MLC2

Comme décrit pour ABCB1, MLC2 est une protéine partenaire de la région linker d'ABCB11. Il a été montré que MLC2 est enrichi à la membrane canaliculaire des hépatocytes sur des coupes de foies de rats et dans des lignées cellulaires hépatocytaires. Elle co-immunoprécipite avec ABCB11 dans la fraction isolée des vésicules membranaires canaliculaires. L'expression d'un mutant dominant négatif de MLC2, non phosphorylable sur des résidus de son domaine N-terminal, entraîne une diminution de l'expression apicale d'ABCB11 sans modifier son expression totale. Les mêmes résultats sont obtenus lorsque l'activité ATPasique de la myosine II endogène est inhibée avec de la blebbistatine. MLC2 est donc impliquée dans le transport vésiculaire d'ABCB11 le long des microfilaments d'actine entourant le canalicule. Lorsqu'elle est inactive ABCB11 est retenu dans des compartiments cytosoliques (Chan 2005). Le rôle de cette interaction reste à déterminer pour ABCB4.

V.3.3. Rab11 et Myosine-Vb

L'existence de réserves intra-cytoplasmiques d'ABCB11 a été démontrée mais la nature de ces compartiments est longtemps restée inconnue (Kipp 2001). Rab11 et Myosine Vb ont été identifiés comme partenaires impliqués dans la régulation du recyclage de plusieurs protéines membranaires, y compris de protéines apicales dans des cellules polarisées (Lapierre 2001). En étudiant le trafic intracellulaire d'ABCB11 taguée avec de la YFP, sa présence a été identifiée dans des compartiments endosomaux positifs pour Rab11. ABCB11 circule continuellement entre la membrane canaliculaire des hépatocytes et des endosomes positifs pour Rab11. Cet échange permet de réguler la quantité de transporteurs à la membrane apicale. Il est inhibé

lorsque les microtubules ou le cytosquelette d'actine sont perturbés (Wakabayashi 2004). L'expression d'un mutant dominant négatif de Rab11 dans une lignée cellulaire hépatocytaire confirme ces résultats, puisque l'adressage apical d'ABCB11 dans ces cellules est considérablement ralenti. De plus, l'extinction de Rab11 montre sa fonction déterminante dans la formation des canalicules puisque, suite à son « knock-down », moins de 20% des cellules forment des canalicules et ABCB11 est retenu dans des compartiments intracellulaires sans aucun adressage à la membrane plasmique. Les mêmes observations ont lieu après l'expression d'un dominant négatif de Myosine Vb, démontrant le rôle du tandem Rab11/Myosine Vb dans la mise en place de la polarité des hépatocytes (Wakabayashi 2005).

V.3.4. Kinases

A l'instar d'ABCB1 et ABCC2, plusieurs kinases sont impliquées dans l'adressage au canalicule d'ABCB11.

La PI3K est une kinase nécessaire au trafic d'ABCB11 comme d'ABCB1. En effet, lorsque celle-ci est inhibée à l'aide de la wortmannin, une diminution de la sécrétion d'acides biliaires est constatée. Au contraire, lorsqu'elle est activée, l'adressage d'ABCB11 au canalicule est stimulé et la sécrétion d'acides biliaires augmente (Misra 1998).

L'ajout d'un acide biliaire, le TUDC, dans une culture d'hépatocytes de rats ou en perfusion de foies isolés de rats induit l'activation de la MAP kinase p38 et de Erk-2. Suite à cette activation, une hausse de la sécrétion de taurocholate dans la bile est observée, et cette augmentation est bloquée lors de l'ajout d'un inhibiteur de la MAP kinase p38. Les auteurs expliquent cette augmentation de sécrétion par un recrutement et une insertion d'ABCB11 à la membrane canaliculaire suite à l'ajout de TUDC, et ce de façon p38 dépendant puisqu'en présence d'un inhibiteur de cette kinase ils n'observent plus de recrutement d'ABCB11 au canalicule (Kurz 2001).

Ces résultats ont été confirmés dans une lignée de cellules hépatocytaires humaines formant des pseudo-canalicules, les HepG2. L'inhibition de la p38 MAP kinase diminue l'adressage canaliculaire d'ABCB11 suite à l'ajout de TUDC, qui induit son trafic en condition contrôle. Un résultat identique est observé avec un inhibiteur de plusieurs isoformes de PKC, PKC δ et PKC ϵ qui semblent répondre également au TUDC. Ces différentes kinases régulent donc de façon positive le trafic d'ABCB11 au canalicule suite à l'ajout de TUDC (Kubitz 2004).

LKB1 est une sérine-thréonine kinase dont la fonction dans la formation de la polarité a été démontrée pour de nombreux types cellulaires, y compris les hépatocytes. L'extinction

hépatique de LKB1 chez la souris induit de nombreuses anomalies : augmentation des acides biliaires circulants, hypercholestérolémie, hyperbilirubinémie, altérations de l'architecture des voies biliaires, et la rétention intracellulaire d'ABCB11 (Woods 2011). LKB1 est un activateur de la kinase AMPK. Dans les sandwichs d'hépatocytes *LKB1*^{-/-}, l'adressage canaliculaire d'ABCB11 est fortement diminué et l'administration de taurocholate n'a aucun effet, alors qu'il permet d'augmenter l'adressage d'ABCB11 dans les sandwichs contrôles. De plus dans les cellules *LKB1*^{-/-} la fraction d'AMPK phosphorylée, donc active, est diminuée mais pas son expression totale, indiquant l'implication de cet effecteur dans le trafic du transporteur des acides biliaires. Cette même étude a montré qu'un mécanisme indépendant de la voie LKB1/AMPK permet de restaurer l'adressage à la membrane apicale dans les sandwichs d'hépatocytes *LKB1*^{-/-}, c'est la voie AMPc/PKA, déjà mise en évidence pour ABCC2 (Homolya 2014).

V.4. ABCB4

V.4.1. HAX-1

HAX-1 est une protéine partenaire commune à plusieurs transporteurs ABC canaliculaires dont ABCB4, puisqu'elle co-immunoprécipite avec leurs domaines linker. Elle est impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine d'ABCB11 mais le rôle de son interaction avec ABCB4 n'a jamais été étudié. En considérant son implication dans l'endocytose de plusieurs protéines, on peut supposer qu'elle contribue également à la régulation de l'internalisation d'ABCB4 (Ortiz 2004).

V.4.2. RACK-1

Un criblage en double- hybride avec le linker d'ABCB4 a identifié RACK1 (Receptor for Activated C-Kinase 1) comme partenaire. Cette protéine cytosolique peut activer l'isoforme $\beta 2$ de la PKC, et est impliquée dans la stabilité membranaire de plusieurs protéines. Suite à l'extinction de RACK1 par ARN interférence, l'expression de la protéine est diminuée et ABCB4 n'est plus exprimé à la membrane mais majoritairement retenu dans des compartiments cytosoliques (Ikebuchi 2009).

V.4.3. EBP50

ABCB4 possède un motif de liaison aux protéines à domaine PDZ dans son domaine C-terminal. Notre équipe a été montrée que ce motif lui permet d'interagir avec la protéine EBP50 grâce au domaine PDZ de celle-ci, régulant la stabilité et l'expression membranaire d'ABCB4 au canalicule. En l'absence de cette interaction, soit par délétion du motif situé dans le domaine C-terminal d'ABCB4, soit par diminution de l'expression d'EBP50 par ARN interférent, ABCB4 est moins exprimé au canalicule et est retenu dans des compartiments cytosoliques. Ces résultats indiquent le rôle clé de cette interaction avec EBP50 dans l'adressage et la stabilité au canalicule d'ABCB4 (Venot 2016).

V.4.4. Rab11 et Myosine-Vb

L'implication de ce complexe dans l'adressage d'ABCB11 a été étudiée mais rien n'a été démontré pour ABCB4 (Wakabayashi 2004). Néanmoins, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire sont similaires à ceux obtenus pour le transporteur des acides biliaires. L'expression de dominants négatifs de la myosine-Vb ou de Rab11 ne modifie ni l'expression ni la maturation d'ABCB4, néanmoins il est retenu dans un compartiment cytoplasmique sous-membranaire, suggérant un rôle de la myosine-Vb et Rab11 dans l'endocytose d'ABCB4.

V.4.5. MLC2

MLC2 est impliquée dans le transport des vésicules contenant ABCB11 le long des filaments d'actine mais le rôle de son interaction dans le trafic d'ABCB4 n'a pas été étudié (Chan 2005). L'étude de cette interaction fera l'objet de la troisième partie de mon travail de thèse présentée dans les Résultats.

Chapitre VI - MLCII et MRCK α

VI.1. La chaîne légère de myosine II non musculaire MLC2 : un partenaire d'ABCB4

La protéine MLC2 a été identifiée comme partenaire des domaines linker de plusieurs transporteurs ABC hépatocytaires : ABCB1, ABCB4 et ABCB11. Le rôle de cette interaction n'a été étudié que pour ABCB11 et est détaillé dans le Chapitre V. Concernant ABCB4, il a été montré par GST-pulldown que cette interaction est directe (Chan 2005). Pour ABCB1, le N-terminal de MLC2 permet la liaison avec son linker (Bajaj 2010). Le linker n'est malheureusement que peu conservé parmi ces trois transporteurs (Figure 33), il est donc difficile de se fonder sur les études réalisées pour ABCB1 et ABCB11 pour spéculer quant au rôle de l'interaction de MLC2 et ABCB4. Dans la littérature, le linker d'ABCB4 est décrit comme une séquence d'environ 80 acides aminés allant de la phénylalanine 620 à la valine 700 (Ikebuchi 2009, Ortiz 2004). Il est intéressant de noter qu'une vingtaine de mutations faux-sens identifiées chez des patients sont présentes dans cette zone, dont huit chez des patients atteints de PFIC3 (Données non publiées) (Figure 34).

ABCB11	VQEVLSKIQHGTIIISVAHRLSTVRAADTIIGFEHGTAVERGTHEELLE	RKGVYFTLVTL	656	
ABCB4	VQAALDKAREGRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGFEDGVIVEQGSHELMR	KEGVYFKLVNM	630	
ABCB1	VQVALDKARKGRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGFDDGVIVEKGNHDELMR	KEGIYFKLVTM	628	
ABCB11	QSQGNQALNEEDIKDATIEDDMLARTFSRGSYQDS-LRASIRQRSKS	QLSYLVHEPPLAVV	715	
ABCB4	QTSGSQIQSEEFELN---DEKAATRMAPNGWKSRLF	FRHST-QKN-----L	671	
ABCB1	QTAGNEVELENAADESK-SEIDALEMSSNDSRSSLIRKRSTRRS	-----V	672	
ABCB11	DHKSTYEEDRDKDIPVQEEVEPAPVRRILKFS	SAPEWPYMLVGSVGAAVNGTVTPLYAFL	775	
ABCB4	KNSQMCQKSLDVEDDGLLEANVPPVSFLKVLKLNKTEWPYFVVG	TVCAIANGGLQPAF SVI	731	
ABCB1	RGSQAQ-DRKLSLTKALDESIPPVSFWRI	MKLNLEWPYFVVG	VFCAIINGGLQPAFAII	731

Figure 34 : Le linker d'ABCB4. Alignement des séquences des domaines linker d'ABCB11, ABCB4 et ABCB1. Ce sont de petites séquences cytosoliques peu conservées reliant le TMD1/NBD1 au TMD2/NBD2. Réalisé avec le logiciel Clustal Omega.

VI.1.1. Les myosines

Les myosines sont des moteurs moléculaires cytoplasmiques qui s'associent à l'actine grâce à l'énergie fournie par l'ATP. Elles forment une superfamille chez l'Homme, avec une quarantaine de myosines identifiées. Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions : contraction musculaire, division cellulaire, trafic intracellulaire, migration. Cette importante variété de myosines permet de transporter une grande diversité de partenaires dans le

cytoplasme. Des défauts de fonction de ces moteurs moléculaires sont associés à diverses pathologies : cardiomyopathie, surdité, syndrome de Griscelli (atteintes neurologiques, albinisme, immunodéficience) (Hartman 2012). Les classes de myosines sont constituées en fonction de la chaîne lourde de myosine ou MHC pour « Myosin Heavy Chain ».

C'est la classe II qui nous intéresse dans le cas d'ABCB4. Elle comprend entre autres les myosines II musculaires cardiaques, ainsi que trois myosines non-musculaires. Chaque myosine comporte un type de MHC différent. Une molécule de myosine II est composée de six sous-unités (Figure 35) :

- Un dimère de MHC.
- Deux paires de chaînes légères de myosine identiques deux à deux, avec deux Chaînes Légères Régulatrices (RLC, MRLC ou MLC2) et deux Chaînes Légères Élémentaires (ELC).

Les chaînes lourdes de myosine sont généralement constituées de trois sous-domaines :

- Une tête en N-terminal qui contient le domaine moteur auquel se lie l'ATP ainsi que le site d'interaction avec l'actine. Ce domaine est conservé parmi les différentes myosines.
- Un cou qui interagit avec la calmoduline et les chaînes légères MLC et ELC.
- Une longue queue C-terminale constituée de deux hélices alpha super-enroulées. Elle contient le site de liaison au « cargo » qui sera transporté le long des microfilaments d'actine.

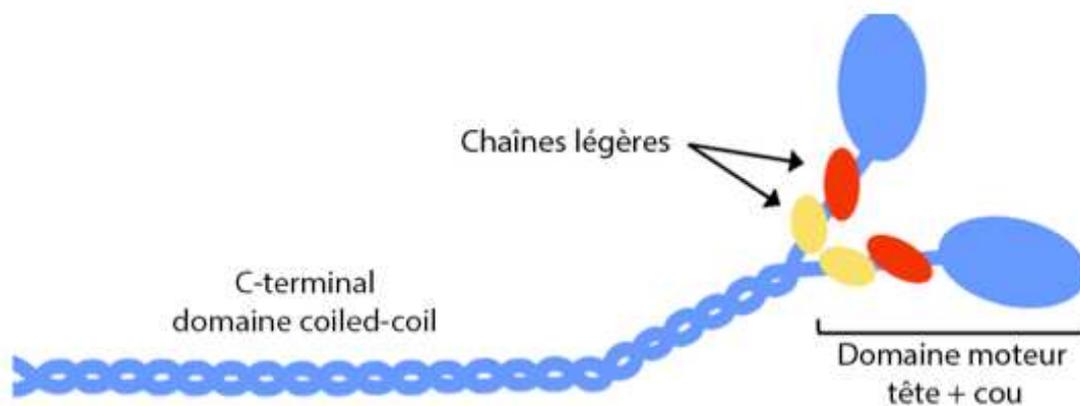


Figure 35 : Structure générale des myosines de classe II. Les myosines de classe II sont des hexamères comprenant deux chaînes lourdes dont les queues C-terminales sont surenroulées, deux têtes dans lesquelles on retrouve le domaine moteur avec l'activité ATPasique, et deux cous au niveau desquels se fixent les chaînes légères régulatrices (RLC ou MLC) et élémentaires (ELC). D'après (Lee 2019)

La régulation de ces myosines II varie selon leur type (musculaire ou non musculaire). En effet, pour les myosines II musculaires, l'activité ATPasique est régulée au travers de protéines associées, comme les troponines et tropomyosines. En revanche, pour les myosines II non musculaires, c'est la phosphorylation des MLC2 qui stimule l'activité contractile à l'origine du remodelage du cytosquelette d'actine. La chaîne légère régulatrice MLC2 partenaire d'ABCB4 forme un complexe avec la famille des myosines II non musculaires afin de réguler leur activité (Vicente-Manzanares 2009).

Myosines II non musculaires

Il existe 3 isoformes de myosine II non musculaire exprimées de manière ubiquitaire : NMIIA, NMIIB et NMIIC (pour Non Muscular Myosin II) codées par trois gènes différents, MYH9, MYH10 et MYH14 respectivement (Marigo 2004). Ces myosines sont des hexamères dont la structure globale a été décrite ci-dessus (Figure 35).

Les NMII produisent les forces contractiles nécessaires à différentes fonctions cellulaires : la migration cellulaire, l'adhésion à la matrice extracellulaire, la mise en place et le maintien de la polarité. Elles assurent également un rôle dans l'endocytose, l'exocytose et le transport vésiculaire (Newell-Litwa 2015, Vicente-Manzanares 2009).

L'activité ATPasique du moteur est déclenchée par la phosphorylation de la chaîne légère régulatrice MLC sur sa thréonine 18 et sa sérine 19. De nombreuses kinases peuvent phosphoryler cette MLC, entre autres MLCK, ROCK, et MRCK en réponse à divers signaux et en fonction des différentes localisations dans la cellule (Pecci 2018, Shutova 2018) (Figure 36). D'un point de vue de leur distribution cellulaire, bien qu'elles puissent être localisées dans le même compartiment cellulaire, l'isoforme B de la NMII est plutôt retrouvée au niveau du cortex d'actine alors que l'isoforme A est plutôt retrouvée au niveau des fibres de stress (Kovacs 2003).

Dans les cellules polarisées, l'actine et les NMII sont indispensables à l'endocytose clathrine-dépendante du récepteur de la transferrine. En effet, dans des fibroblastes issus de souris *NMIIA* *-/-* ou *NMIIB* *-/-*, l'internalisation de la transferrine est drastiquement diminuée par rapport au contrôle. De plus, le récepteur de la transferrine voit sa présence augmentée à la membrane plasmique dans ces cellules *NMIIA* *-/-* ou *NMIIB* *-/-* (Chandrasekar 2014). Ces isoformes A et B sont également impliquées dans le trafic de différentes protéines de l'appareil de Golgi au réticulum endoplasmique (Vazhappilly 2010). Les fonctions de l'isoforme NMIIC restent relativement méconnues. Elle a été impliquée dans la mise en place d'adhérences focales, la

stabilité de l'actine corticale, le développement des neurones ou encore la fission des mitochondries (Almutawa 2019, Golomb 2004, Shutova 2018). Plus d'études concernant la NMII2C sont nécessaires pour caractériser son rôle spécifique.

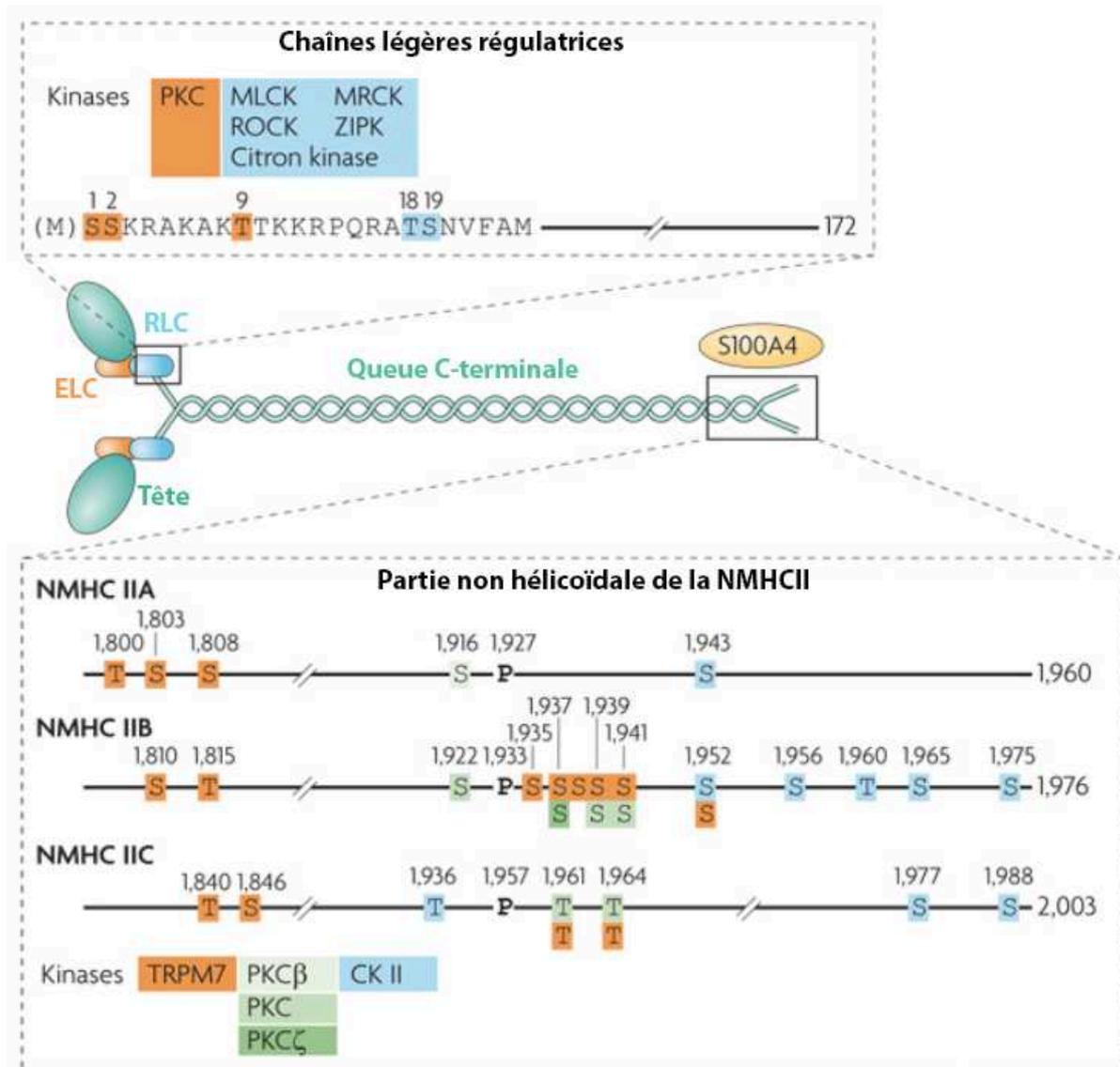


Figure 36 : Structure de la myosine II non musculaire, isoformes A, B, C La tête contient le domaine moteur et le site de liaison à l'ATP. Le cou permet aux chaînes légères ELC et MLC/RLC d'interagir avec la chaîne lourde. Les résidus sérine 19 et thréonine 18 peuvent être phosphorylés par diverses kinases, MLCK, MRCK, ROCK, afin de réguler l'activité ATPase de la tête de la MHC. D'après (Vicente-Manzanares 2009).

Les chaînes légères régulatrices des NMII (RLC / MLC)

Les chaînes légères régulatrices ont aussi été identifiées comme partenaires régulant le trafic intracellulaire de plusieurs protéines. Trois isoformes de chaînes légères ont été identifiées en association avec les chaînes lourdes, elles sont codées par les gènes *Myl9*, *Myl12a* et *Myl12b*. Les protéines retrouvées sont désignées par plusieurs noms : RLC, MRLC, MLC2... Dans cette

introduction, elles seront retrouvées sous le terme de MLC2. Une fois phosphorylées sur les thréonine 18 et sérine 19, les MLC2 peuvent augmenter l'activité ATPasique des NMII et permettre le remodelage du cytosquelette d'actine indispensable à de nombreux processus cellulaires décrits ci-dessus (Iwasaki 2001). Ce sont de petites protéines de 171 à 172 acides aminés, soit environ 20kDa, dont les séquences sont très similaires (Figure 37).

a

```

Myl9  MSSKRAKAKTTKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHDMLAS 60
Myl12a MSSKRTK-TKTKKRPPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHDMLAS 59
Myl12b MSSKKAKTKTTKKRPQRATSNVFAMFDQSQIQEFKEAFNMIDQNRDGFIDKEDLHDMLAS 60
      *****:;* ..*****

Myl9  LGKNPTDEYLEGMMSEAPGPINFMTFLTMFGEKLNQTDPEDEVIRNAFACFDEEASGFIHE 120
Myl12a LGKNPTDEYLDAMMNEAPGPINFMTFLTMFGEKLNQTDPEDEVIRNAFACFDEEATGTIQE 119
Myl12b LGKNPTDAYLDAMMNEAPGPINFMTFLTMFGEKLNQTDPEDEVIRNAFACFDEEATGTIQE 120
      ***** **:* ..*****:*****:* *:

Myl9  DHLRELLTTMGDRFTDDEEVDEMYREAPIDKKGNFNVEFTRILKHGAKDKHD 172
Myl12a DYLRRELLTTMGDRFTDDEEVDELYREAPIDKKGNFNIEFTRILKHGAKDKDD 171
Myl12b DYLRRELLTTMGDRFTDDEEVDELYREAPIDKKGNFNIEFTRILKHGAKDKDD 172
      *:*****:*****:*****.*

```

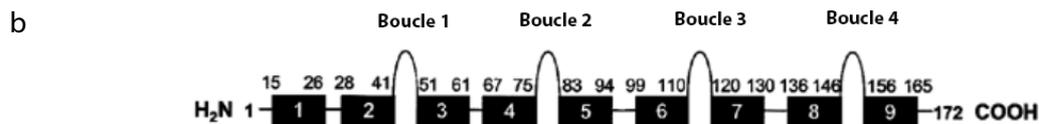


Figure 37 : Séquences et structures des isoformes de MLC2 (a) Alignement des séquences peptidiques des trois chaînes légères régulatrices de la myosine non musculaire II, Myl9, Myl12a et Myl12b. Réalisé avec le logiciel Clustal Omega. (b) Structure prédictive des MLC2. D'après (Ampanan 2005)

Elles sont régulées par leur phosphorylation grâce à plusieurs partenaires, la kinase MLCK pour Myosin Light Chain Kinase phosphoryle la sérine 19 pour les activer, alors que la phosphatase MLCP inhibe l'activité de MLC2 (Ito 2004) (Figure 38). D'autres kinases comme ROCK, citron kinase (CRIK), MRCK (pour Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42-binding Kinase), et PAK1 (pour p21-activated kinase 1) sont capables d'activer MLC2, soit en la phosphorylant directement sur ses résidus 18 et/ou 19, soit en inhibant la MLCP (Zhao 2015).

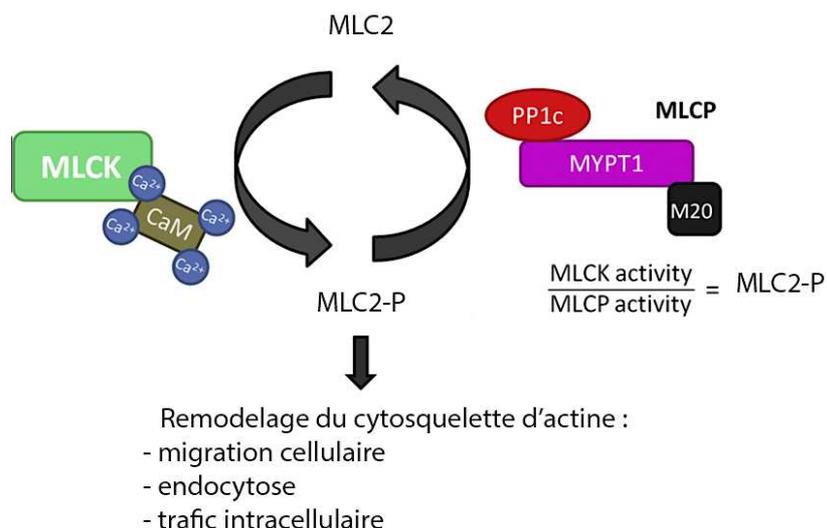


Figure 38 : Régulation de l'activité des MLC2.

MLC2 est active lorsqu'elle est phosphorylée sur ses résidus thréonine 18 et sérine 19. Une des kinases essentielles à cette activation est la MLCK. Au contraire, la phosphatase MLCP composée de plusieurs sous-unités permet d'inhiber MLC2. D'après (Grassie 2011)

Les MLC2 interagissent avec différents partenaires et régulent leur trafic intracellulaire. En effet, MLC2 interagit avec les sous-unités de récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-aspartate) NR1 et NR2, au niveau de leurs domaines C-terminaux. MLC2 et NR1/NR2 colocalisent dans le tissu cérébral et l'association MLC2-NR2 est indispensable au trafic de NR2 du Golgi à la membrane plasmique. Cette interaction a lieu lorsque MLC2 n'est pas phosphorylée et en dehors du complexe qu'elle forme avec les chaînes lourdes de la myosine (Ampan 2005, Bajaj 2009, Kioussi 2007, Vazhappilly 2010).

Au niveau hépatique, MLC2 interagit avec trois transporteurs ABC canaliculaires, ABCB1, ABCB4 et ABCB11. MLC2 permet l'adressage d'ABCB11 d'un compartiment cytosolique à la membrane apicale des hépatocytes (Chan 2005). De plus, la voie de signalisation ROCK/MLCK/MLC2 a été étudiée dans le cadre des cholestases médicamenteuses (DILI). En réponse à différentes drogues, la kinase ROCK est activée et induit la phosphorylation de MLC2, à la fois directement et par l'intermédiaire de MLCK. Cette phosphorylation augmente les contractions du cortex d'actine au canalicule biliaire et la sécrétion d'acides biliaires dans des lignées de cellules hépatocytaires humaines. A l'inverse, suite à l'inhibition de ROCK, MLC2 est majoritairement retrouvée sous forme déphosphorylée et les canalicules biliaires se dilatent. Les cycles de contraction et dilatation des canalicules étant indispensables à la sécrétion des acides biliaires, les effets de différents composés sur la voie ROCK/MLCK/MLC2 peuvent expliquer comment la DILI se met en place (Burbank 2016, Sharanek 2016).

VI.2. Domaine N-terminal d'ABCB4 : Double-hybride et identification de partenaires

Des travaux précédents réalisés par notre groupe ont montré l'importance du domaine N-terminal d'ABCB4 dans son adressage membranaire. Afin d'identifier des partenaires potentiels d'ABCB4, un crible en double hybride chez la levure avec son N-terminal comme appât a été réalisé dans une banque de foie humain.

VI.2.1. Domaine N-terminal d'ABCB4

Si l'on se base sur des logiciels de prédiction comme TOPO2 qui prédit la structure 2D de protéines transmembranaires, on observe que le domaine N-terminal d'ABCB4 fait environ 54 acides aminés et qu'il est cytosolique. Il contient une région riche en lysines et arginines située entre les acides aminés 28 et 38. Cette région chargée positivement pourrait constituer une zone d'interaction avec des partenaires protéiques (Figure 39).

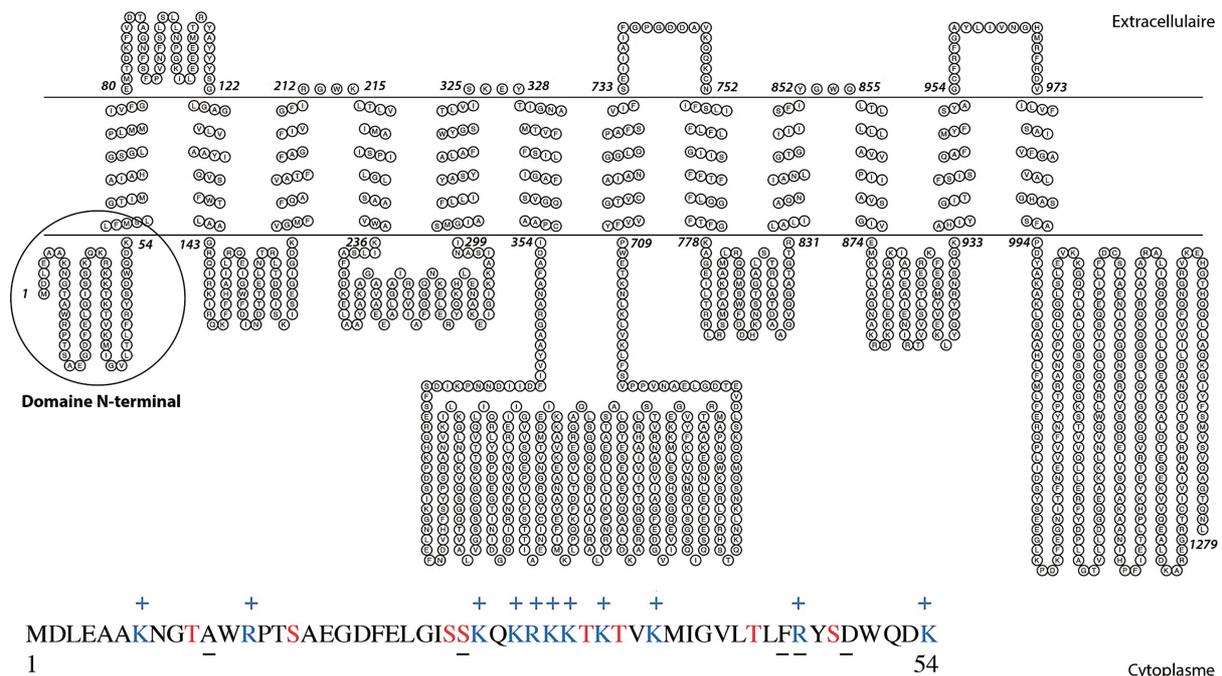


Figure 39 : Domaine N-terminal d'ABCB4 et sa séquence peptidique. Les sérines et thréonines potentiellement phosphorylables sont représentées en rouge. Les résidus chargés positivement sont indiqués en bleu. Les acides aminés mutés identifiés chez des patients sont soulignés.

La délétion de la région chargée « 28-38 » du N-terminal d'ABCB4 provoque un défaut de maturation du transporteur, une absence d'adressage à la membrane et une rétention dans le réticulum endoplasmique. La phosphorylation d'un résidu sérine du N-terminal est également nécessaire au trafic d'ABCB4 jusqu'au canalicule puisque la mutation de cette sérine 49 en acide aspartique (S49D) conduit au même effet qu'une délétion de la région 28-38 (Gautherot 2012).

Le domaine N-terminal contient plusieurs résidus potentiellement phosphorylables qui suggèrent des interactions avec diverses kinases. Le logiciel NetPhos 3.1 permet de prédire les kinases les plus aptes à phosphoryler les sérines et thréonines du N-terminal d'ABCB4 selon les sites consensus de phosphorylation. Il ne prend en compte qu'une liste restreinte de kinases : ATM, CKI, CKII, CaM-II, DNAPK, EGFR, GSK3, INSR, PKA, PKB, PKC, PKG, RSK, SRC, cdc2, cdk5 and p38MAPK. D'après cette prédiction, pour ABCB4, la PKC et une ou des kinases absentes de cette liste (unsp), sont les plus susceptibles de phosphoryler ces résidus (Figure 40).

```

>Sequence      55 amino acids
#
# netphos-3.1b prediction results
#
# Sequence      # x   Context      Score   Kinase      Answer
# -----
# Sequence      10 T   AKNGTAWRP    0.538   PKC         YES
# Sequence      15 T   AWRPTSAEG    0.847   unsp        YES
# Sequence      16 S   WRPTSAEGD    0.994   unsp        YES
# Sequence      26 S   ELGISSKQK    0.890   unsp        YES
# Sequence      27 S   LGISSKQKR    0.769   PKC         YES
# Sequence      34 T   KRKTKTVK     0.758   PKC         YES
# Sequence      36 T   KKTCTVKMI    0.922   PKC         YES
# Sequence      44 T   IGVLTFRY     0.825   PKC         YES
# Sequence      48 Y   TLFYSDWQ     0.461   INSR        .
# Sequence      49 S   LFRYSDWQD    0.918   unsp        YES
#
# MDLEAAKNGTAWRPTSAEGDFELGISSKQKRKTKTVKMIGVLTFRYSD # 50
# WQDKL # 100

```

Figure 40 : Sites prédictifs de phosphorylation du domaine N-terminal d'ABCB4 par différentes kinases. Ces prédictions sont effectuées par le logiciel NetPhos 3.1 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/> PKC: protein Kinase C, unsp: unspecified prediction, INSR: Insulin Receptor

Au laboratoire, des expériences de phosphorylation *in vitro* des différents résidus phosphorylables du domaine N-terminal indiquent que les thréonines T34 et T44 et la Ser49 peuvent être phosphorylées par la PKA. De plus, l'ajout d'inhibiteurs de PKA ou PKC inhibe la sécrétion de phosphatidylcholine par ABCB4 lors de tests réalisés *in vitro*. D'autre part, la

T34 a été identifiée mutée en méthionine chez des patients atteints de syndrome LPAC. Ces différents éléments révèlent un rôle de la phosphorylation de ce résidu dans la fonction d'ABCB4 (Gautherot 2014).

Le N-terminal d'ABCB4 est peu conservé entre les différents transporteurs ABC (Figure 41) et contient des mutations identifiées chez des patients atteints de syndrome LPAC ou de PFIC3 : T34M, R47G qui ont été étudiées et sont des mutations de classe III, responsables d'un défaut d'activité d'ABCB4 (Gautherot 2014). D'autres mutations ont depuis été identifiées mais leurs effets n'ont pas encore été étudiés par notre équipe.

```

ABCB11 MSDSVILRSIKKFGEENDGFESD----KSYNNDKKSRLQDEKKGDGVRVGVFFQLFRFSSSTDI 59
ABCB4  -----MDLEAAKNGTAWRPTSAEGDFELGISSKQKRKKTKTVMIGVLTFLFRYSDWQDK 54
ABCB1  -----MDLEGDRNGGAKKKN----FFKL--NNKSEKDKKEKKPTVSVFSMFRYSNWLDK 48

```

Figure 41 : Alignement des séquences peptidiques des domaines N-terminaux d'ABCB11, ABCB4 et ABCB1. Réalisé avec le logiciel Clustal Omega.

Toutes ces données indiquent un rôle du domaine N-terminal d'ABCB4 dans la régulation du trafic intracellulaire du transporteur mais également dans la régulation de la sécrétion de PC.

VI.2.1. Partenaires identifiés dans le crible en double-hybride

Pour identifier des partenaires d'ABCB4, notre équipe a fait réaliser un crible double hybride chez la levure avec son N-terminal comme appât dans une banque de foie humain. Une trentaine de partenaires ont été identifiés grâce à ce crible. Les études précédentes réalisées sur le domaine N-terminal indiquent un rôle de la phosphorylation de différents résidus sérines et thréonines dans le trafic et l'activité d'ABCB4. C'est pour cette raison que nous avons décidé d'étudier une sérine-thréonine kinase identifiée lors du crible appelée MRCK α (pour Myotonic dystrophy kinase-Related Cdc42-binding Kinase alpha) ou Cdc42-BP α (Cdc42 Binding Protein kinase alpha).

VI.3. MRCK α

VI.3.1. Découverte

MRCK α et son isoforme bêta ont été identifiées en 1998 en raison de leur capacité à interagir avec les p21 dont font partie les petites GTPases Cdc42 et Rac (Leung 1998). L'expression des isoformes alpha et bêta est ubiquitaire, contrairement à l'isoforme gamma découverte plus tard qui est exprimée de façon plus restreinte dans certains tissus (sang, larynx) (Leung 1998, Ng 2004, Unbekandt 2014) .

VI.3.2. Domaines fonctionnels

D'après l'analyse de sa séquence peptidique, MRCK α est une kinase de 1732 acides aminés (environ 190kDa) qui contient de nombreux domaines fonctionnels (Figure 42) :

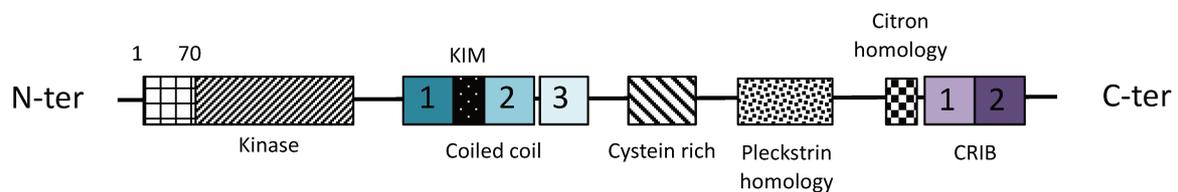


Figure 42 : Domaines fonctionnels de MRCK α . D'après (Leung 1998, Tan 2003, Tan 2001)

- **Domaine N-terminal 1-70** : Il permet l'homodimérisation de la kinase. Lorsqu'elles se dimérisent, les kinases MRCK α réalisent une trans-autophosphorylation sur leurs résidus Ser234, Thr240 et Thr403, ce qui leur permet de s'auto-activer et d'avoir une activité catalytique. En l'absence de ce domaine, l'activité kinase de MRCK α est perdue, il est donc indispensable à l'activité de la kinase. Ce domaine est fortement homologue au N-terminal des kinases ROCKs et DMPK (pour Dystrophy Myotonic Protein Kinase) dans lequel ce mécanisme de trans-autophosphorylation ainsi que les résidus impliqués dans ce processus sont conservés (Tan 2001).
- **Un domaine catalytique ou domaine kinase**, qui partage 68% d'identité avec celui de la kinase DMPK.
- **Un domaine coiled-coil (résidus 425 à 938)** qui régule négativement MRCK α en l'empêchant de s'auto-activer. Des expériences de « cross-linking » ont montré que MRCK α est éluée sous forme de multimères migrant à 500kDa ou 900kDa et qu'elle n'existe pas sous forme de monomères en conditions natives. Le domaine coiled coil (CC) de MRCK α contient plusieurs « blocs » CC. Les modules CC1, CC2 et CC3 d'une

kinase peuvent interagir respectivement avec les modules CC1, CC2 et CC3 d'une autre kinase (Figure 43). De plus, le domaine catalytique peut interagir avec les modules CC2/CC3 (mais pas avec CC1), ce qui a pour effet de réguler négativement l'activité kinase de MRCK α (Tan 2001) (Figure 42). Le motif conservé situé dans les CC2/CC3 et responsable de l'auto-inhibition de la kinase a été nommé domaine KIM pour « Kinase Inhibitory Motif ». La délétion de ce motif augmente l'activité kinase de MRCK α et MRCK γ (Ng 2004).

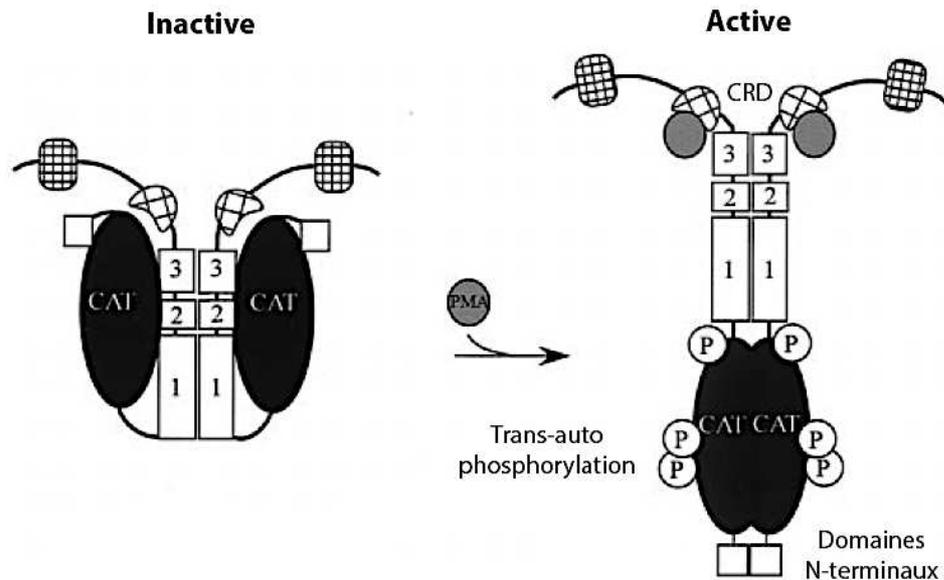


Figure 43 : Modèle de la régulation de l'activité catalytique de MRCK α . L'interaction entre les modules d'auto-inhibition CC2-CC3 (appelé KIM) de deux kinases MRCK α maintient les kinases sous forme de dimère fermé inactif en empêchant l'interaction des domaines N-terminaux et des domaines catalytiques entre eux. La liaison de PMA au domaine CRD ou l'activation par Cdc42 au niveau du domaine CRIB perturbe l'interaction entre les CC2-CC3 des deux kinases, aboutissant à une structure « ouverte » du dimère qui permet l'interaction des domaines N-terminaux entre eux et la trans-autophosphorylation avec activation des kinases MRCK α . D'après (Tan 2001)

- **Un domaine riche en cystéines (CRD) :** Il pourrait permettre à MRCK α d'interagir avec différents partenaires protéiques. Il contient des résidus conservés avec le domaine CRD de la PKC qui peut lier des esters de phorbol et le DAG (Diacylglycérol), responsables de l'activation de PKC (Choi 2008).
- **Un domaine « Pleckstrin homology » (PH) :** Ce type de domaine est généralement retrouvé dans des protéines constitutives du cytosquelette ou faisant partie de voies de signalisation cellulaire. Il est responsable du recrutement de MRCK α à la membrane plasmique (Leung 1998).

- **Domaine Citron Homology (CNH)** : Peu d'informations sont disponibles concernant ce domaine. Pour MRCK α , ce domaine pourrait réguler l'activité kinase ou encore être impliqué dans l'interaction avec la GTPase Cdc42.
- **Domaines CRIB** : De nombreux effecteurs des petites GTPases Cdc42 et Rac contiennent un GTPase Binding Domain (GBD) qui permet d'interagir spécifiquement avec les GTPases sous leurs formes liées à la GTP (Cdc42-GTP ou Rac-GTP).
Le domaine CRIB est très conservé et fait partie de ces domaines GBD. Selon l'épissage alternatif de MRCK α , un domaine ou les deux domaines CRIB sont présents. Ces différences permettraient de générer plusieurs isoformes de MRCK α répondant à différents régulateurs (Tan 2003).
 - CRIB-1 : liaison préférentielle à Cdc42
 - CRIB-2 : pas de liaison aux GTPases
 - CRIB-1 et CRIB-2 : liaison préférentielle à Rac1

VI.3.3. Épissage alternatif et régulation de l'expression

Au niveau tissulaire, MRCK α est exprimée ubiquitairement. Chez l'Homme, le gène codant pour MRCK α est situé sur le chromosome 1 (locus 1q42.1) et contient 42 exons et 39 introns. Une zone d'épissage alternatif impliquant les exons 21 à 24 est située entre les séquences codant pour le domaine coiled-coil et le domaine riche en cystéines (Figure 44).

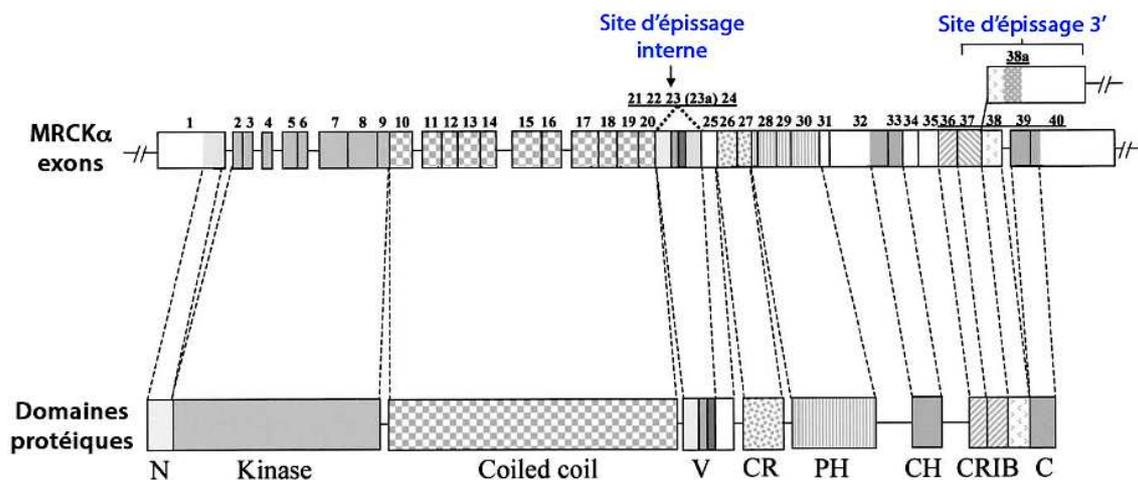


Figure 44 : Structure génomique du gène MRCK α humain. Les deux sites connus d'épissage alternatif sont représentés, ils sont situés en « interne » et en 3'. La correspondance avec les domaines protéiques est représentée. N : Domaine N-terminal, V : région variable interne, CR : Domaine riche en cystéines, PH : Domaine « Pleckstrin homology », CH : Domaine « Citron Homology », CRIB : Cdc42/Rac Interactive binding motif, C : Domaine C-terminal. D'après (Tan 2003)

Une seconde zone d'épissage alternatif existe à l'extrémité 3' du gène impliquant les exons 36 à 40. Selon cet épissage, la protéine contient différents domaines CRIB dont le rôle est détaillé ci-dessus (Tan 2003).

Très peu d'éléments sont disponibles concernant la régulation de l'expression de MRCK α . Une étude a montré l'existence d'un élément de réponse au fer (IRE pour Iron Response Element) dans la région 3'UTR de l'ARN messager de MRCK α . Les protéines régulatrices IRP1 et IRP2 se lient à l'IRE de MRCK α et modulent la traduction de son ARNm de la même façon que celui du récepteur de la transferrine TfR. Le traitement de HepG2, une lignée de cellules humaines issues d'un hépatocarcinome, avec du fer ou un chélateur de fer fait varier la quantité des transcrits dans les mêmes proportions pour MRCK α et TfR. En présence de fer, une diminution des ARNm est observée alors qu'en présence d'un chélateur de fer, la quantité de transcrits augmente grâce à une stabilité accrue (Cmejla 2006).

VI.3.4. Activité kinase : substrats et régulation

MRCK α a été identifiée grâce à sa capacité à interagir de façon spécifique avec la petite GTPase Cdc42 (Leung 1998). Cette sérine-thréonine peut se lier à Cdc42 par l'intermédiaire de son domaine CRIB1 mais uniquement lorsque Cdc42 est liée à la GTP. Lorsque Cdc42 est sous forme GDP, aucune interaction n'a lieu avec MRCK α . Si la forme dominant négatif, aussi appelée Kinase Dead (KD) de MRCK α est transfectée dans des cellules exprimant un mutant constitutivement actif de Cdc42, appelé Cdc42^{V12}, les effets de Cdc42 sur le cytosquelette sont bloqués, démontrant bien que la kinase agit comme effectrice de Cdc42.

Cette sérine-thréonine kinase est majoritairement cytosolique avec un marquage renforcé sous la membrane plasmique où elle est recrutée grâce à son domaine « pleckstrin homology ». De plus, MRCK α colocalise dans le cytoplasme avec son activateur, Cdc42 (Leung 1998).

MRCK α phosphoryle fortement la chaîne légère de myosine 2, MLC2 sur sa sérine 19 (Leung 1998). Une fois phosphorylée, MLC2 est active et intervient pour remodeler le cytosquelette d'actine (Leung 1998).

MRCK α phosphoryle également la protéine MBS85 sur sa thréonine 560, ce qui l'inactive. La MBS85 est une sous-unité d'un complexe appelé MLCP (pour Myosin-Light Chain Phosphatase) dont le rôle est de déphosphoryler MLC2. Lorsqu'elle est active, la MBS85 reconnaît et se lie à MLC2 pour la déphosphoryler et l'inactiver. MRCK α permet donc de conserver MLC2 active de façon indirecte en bloquant sa phosphatase (Tan 2001).

Les kinases LIMK1 et LIMK2 (LIM domain Kinase 1 et 2) sont phosphorylées, donc activées par MRCK α sous le contrôle de la GTPase Cdc42. Une fois activée, ces kinases phosphorylent la cofiline (aussi appelée ADF). La cofiline est une protéine impliquée dans la dépolymérisation des filaments d'actine. Si elle est phosphorylée, la cofiline est inhibée et ne peut plus interagir avec l'actine ni dépolymériser les microfilaments d'actine (Sumi 2001).

Tous ces effecteurs de MRCK α ont un point commun, ils sont impliqués directement ou indirectement avec le cytosquelette d'actine, mettant en évidence la participation de la voie de signalisation Cdc42 / MRCK α / MLC2 dans la régulation du remodelage du cytosquelette d'actine (Figure 45).

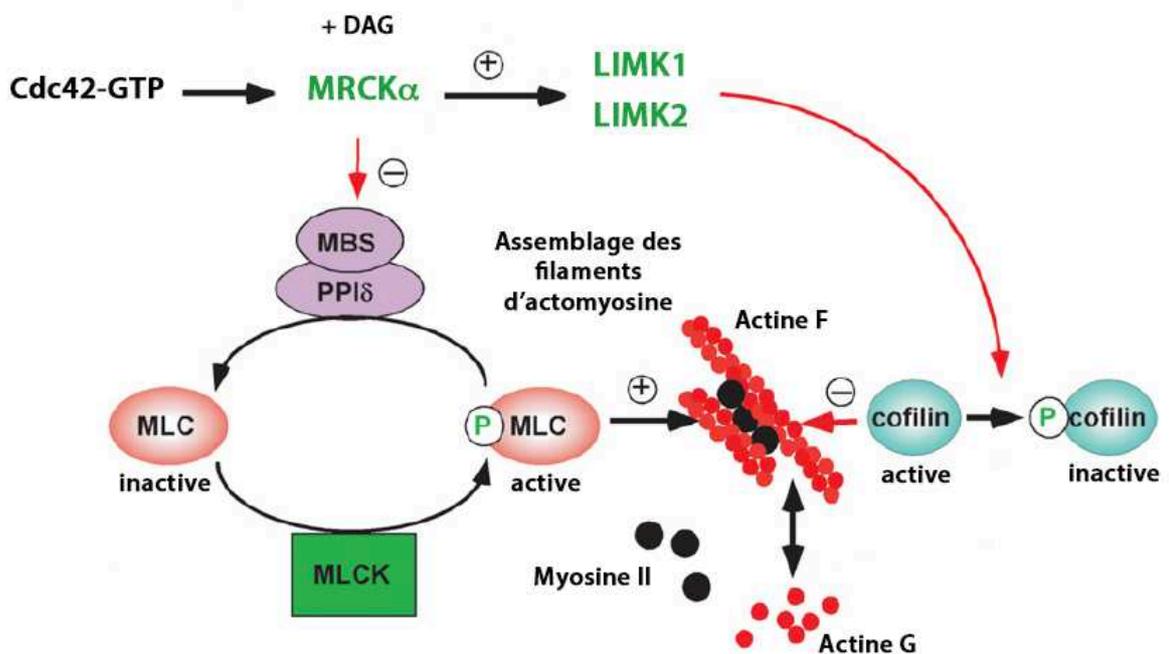


Figure 45 : Implication de la kinase MRCK α dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Une fois activée, MRCK α augmente la proportion de MLC2 phosphorylée, donc active, soit directement par phosphorylation de sa sérine 19, soit indirectement en inhibant la sous unité MBS de la phosphatase MLCP. En parallèle MRCK α phosphoryle et active les kinases LIMK1 et 2 qui inhibent la cofiline. Tous ces événements vont conduire au remodelage du cytosquelette d'actine en favorisant l'assemblage de filaments d'actomyosine. D'après (Zhao 2005)

La régulation de l'activité kinase de MRCK α dépend de plusieurs mécanismes :

- Elle est activée et transloquée à la membrane plasmique après interaction avec Cdc42 via son domaine CRIB1
- Elle peut s'auto-activer grâce à un processus de trans-autophosphorylation au niveau de son N-terminal lorsqu'elle est formée un homodimère avec une autre kinase MRCK α .

- La présence de DAG (Diacylglycérol) ou de PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), un analogue du DAG, permet d'activer MRCK α en se fixant sur son domaine CRD, et facilite sa translocation du cytosol à la membrane plasmique à l'instar de la PKC (Garcia-Bermejo 2002).
- L'activité catalytique de MRCK α est inhibée lorsque les modules CC2 et CC3 des domaines coiled-coil d'un homodimère de MRCK α interagissent entre eux et avec les domaines catalytiques (Figure 43).

Il est probable que d'autres mécanismes de régulation existent et n'aient pas encore été identifiés.

VI.3.5. Interactions et implications en physiologie cellulaire

MRCK α est fortement exprimée dans le cerveau. Une étude a montré son rôle dans la croissance des neurites qui sont des prolongements cellulaires de neurones (axones, dendrites). En effet, MRCK α , activée par Cdc42 permet de stimuler la croissance des neurites dans des modèles cellulaires en culture, contrebalançant ainsi l'effet de la kinase ROCK α qui lorsqu'elle est activée inhibe cette croissance. Ces deux kinases ont de fortes similitudes, elles ont un domaine catalytique très proche, mais aussi les domaines régulateurs CRD et PH en commun. Malgré cela, elles répondent à des signaux différents et ont des effets opposés sur la pousse des neurites. Les auteurs émettent l'hypothèse que ces différences sont dues à la présence du domaine « Citron homology » présent dans la séquence peptidique de MRCK α mais pas de ROCK α (Chen 1999).

Suite à l'identification d'un élément de réponse au fer dans le 3'UTR de l'ARNm de MRCK α , le lien entre le fer et cette sérine-thréonine kinase a été étudié au niveau protéique. D'après les auteurs, la quantité de protéine varie en fonction du niveau de fer présent, lorsqu'il augmente, la quantité de MRCK α diminue alors qu'elle augmente en absence de fer. MRCK α colocalise avec le récepteur de la transferrine TfR dans des structures ponctiformes localisées dans le cytoplasme. De plus, l'extinction *in vitro* de l'expression de la sérine-thréonine kinase MRCK α par shRNA est responsable d'une diminution de 25% de l'absorption du fer. Les auteurs suggèrent un rôle de MRCK α dans l'endocytose et le trafic intracellulaire du récepteur TfR (Cmejla 2010).

La protéine d'échaffaudage LRAP35a/LURAP1 interagit via son domaine riche en leucines avec le domaine KIM (CC2-CC3) de MRCK α , ce qui permet son activation catalytique. Des expériences de co-immunoprécipitation ont révélé l'existence d'un troisième partenaire qui interagit avec un autre domaine de LRAP35a, la MYO18A une myosine atypique impliquée dans différents processus : transport intracellulaire, formation de vésicules d'exocytose à la membrane de l'appareil de Golgi, migration cellulaire (Buschman 2018). Dans cette étude, les auteurs ont également montré la colocalisation des formes endogènes et transfectées de MRCK α , LRAP35a et MYO18A au niveau des « lamellae », des structures constituées de faisceaux d'actine situées juste en arrière des lamellipodes et riches en myosine 2, qui sont essentielles à la migration cellulaire. Ce complexe à trois partenaires est donc impliqué dans la migration cellulaire, en particulier dans les structures de type lamellae riches en acto-myosine et dans le mouvement rétrograde des microfilaments d'actine. De plus, la phosphorylation de MLC2 sur sa sérine 19 par MRCK α est indispensable à l'activité de MYO18A mais aussi de MYO2A (ou myosine 2a), toutes deux nécessaires à la formation des structures lamellaires d'actine requises pour la migration cellulaire (Tan 2008) (Figure 46).

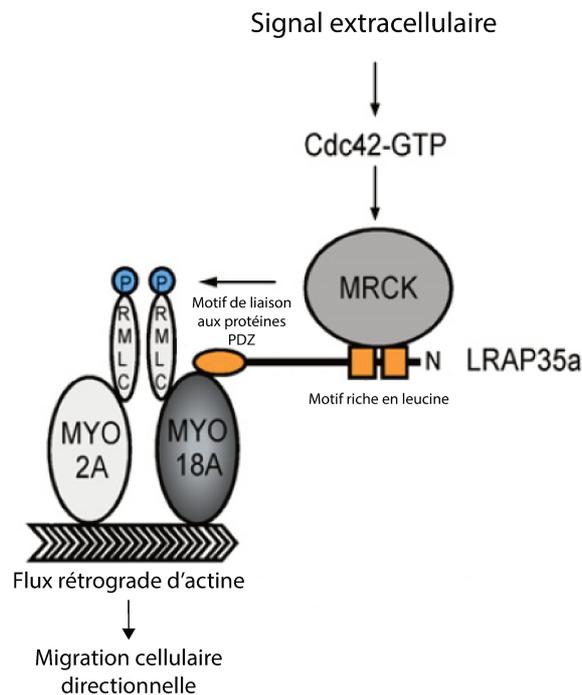


Figure 46 : Modèle de régulation des complexes d'actomyosine par MRCK. La protéine adaptatrice LRAP35 se lie à MRCK et l'active ce qui permet la liaison avec la myosine atypique MYO18A. Cette interaction permet l'association avec l'actine et la mise en place d'un flux d'actine, nécessaire à la migration cellulaire. D'après (Tan 2008)

A l'image de LRAP35, une autre protéine d'échafaudage interagissant avec MRCK α a été identifiée, la protéine adaptatrice LRAP25. De la même manière, elle interagit avec le domaine KIM de MRCK α via son motif riche en leucines et fait l'intermédiaire entre MRCK α et LIMK1. Cela permet de recruter MRCK α au niveau des lamellipodes où elle active LIMK1 en la phosphorylant. Suite à son activation par MRCK α , LIMK1 va phosphoryler et donc inactiver la cofiline et ainsi empêcher la dépolymérisation de l'actine. Il semblerait que MRCK α soit ici sous le contrôle de Rac1 et pas de Cdc42 (Lee 2014).

Au niveau des lamellipodes, l'actine est continuellement polymérisée / dépolymérisée, permettant aux cellules de migrer. Ces deux études montrent une régulation spatiale fine de l'activité de MRCK α qui, en réponse à différents activateurs, va s'associer à des protéines d'échafaudage différentes pour réguler la formation de structures d'actine lors de la migration cellulaire.

Un autre rôle de MRCK α a été mis en évidence au niveau des lamellipodes. La sérine-thréonine kinase PDK1, souvent appelée PDK1, est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine et la migration cellulaire. Il a été montré qu'en réponse à l'EGF (pour Epidermal Growth Factor) elle active MRCK α au niveau des lamellipodes en se fixant directement à un motif hydrophobe situé dans son domaine catalytique. Ce qui a pour effet une augmentation de la phosphorylation de MLC2 induisant une rétraction des lamellipodes, influant sur la direction de la migration cellulaire (Gagliardi 2014) (Figure 47).

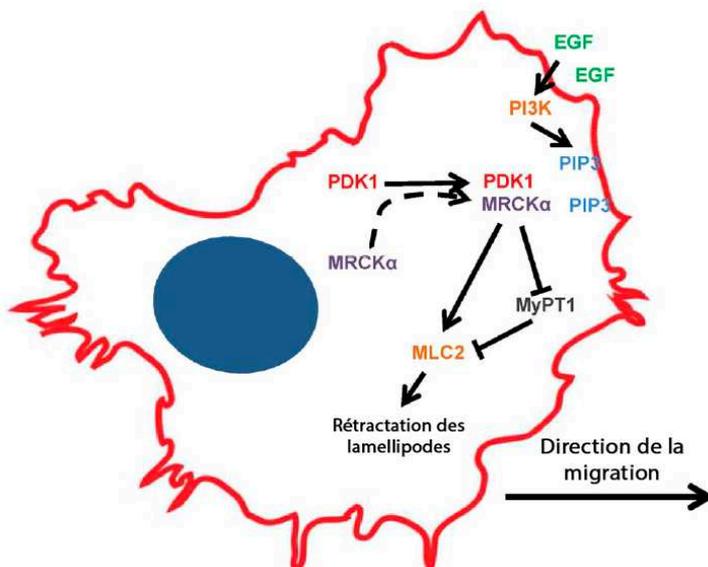


Figure 47 : MRCK α contribue à réguler la migration cellulaire.

Suite à son activation par l'EGF, la protéine PDK1 est transloquée à la membrane plasmique où elle active MRCK α . Une fois active, MRCK α augmente la proportion de MLC2 phosphorylée, ce qui induit la rétraction des lamellipodes et influe sur la direction de la migration cellulaire. D'après (Gagliardi 2014).

Suite à leur activation par une protéine appelée ICAP-1, le tandem MRCK α /MLC2 permet de détecter la rigidité de la matrice extracellulaire, un phénomène indispensable à la migration cellulaire (Bouin 2017).

Lors de la migration cellulaire, le noyau et le centre organisateur des microtubules (COMT ou MTOC en anglais) sont réorientés dans le cytosol. La petite GTPase Cdc42 a été identifiée comme régulateur clé de cette réorientation. Il a été montré que la réorientation du COMT est déclenchée par le repositionnement du noyau. Or, il s'avère que MRCK α est l'effecteur de Cdc42 lors du repositionnement du noyau et que la phosphorylation de MLC2 par MRCK α amorce un mouvement rétrograde d'actine à l'origine de ce repositionnement (Gomes 2005).

VI.3.6. Pathologies

La régulation de la contractilité du cytosquelette d'acto-myosine est centrale pour la mobilité cellulaire et les processus métastatiques dans les cancers. Le rôle clé de MRCK α dans cette régulation suggère que cette sérine-thréonine kinase pourrait être surexprimée dans de nombreux cancers.

Cancers

De plus en plus d'études permettent de constater le rôle déterminant de MRCK α dans la migration cellulaire. Néanmoins cette kinase n'avait pas été étudiée dans un contexte pathologique. La surexpression de MRCK α a été établie dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses : lymphome histiocytaire, leucémie myéloïde chronique, adénocarcinome pancréatique, cancer du sein et cancer du poumon. Sa surexpression est liée à une augmentation des métastases et un mauvais pronostic pour la survie des patients (Unbekandt 2014). Dans des cellules de carcinome colorectal, la voie de signalisation Cdc42 / MRCK α / MLC2 est impliquée dans le phénotype d'invasion cellulaire (Wilkinson 2005).

Dans des lignées cellulaires de côlon au phénotype fortement invasif, MRCK α est surexprimée ce qui est corrélé à la présence de métastases et à une faible survie des patients atteints de cancer du côlon (Hu 2018).

Dans des lignées cellulaires de carcinomes cellulaires squameux, l'expression de la protéine Notch est diminuée, avec comme conséquence une surexpression des protéines MRCK α et ROCK1/2, qui favorisent le développement tumoral (Lefort 2007).

Autres pathologies

Pour la première fois, en 2017, une des isoformes de la famille des kinases MRCK a été impliquée dans une pathologie non cancéreuse, la glomérulonéphrite extra-membraneuse (GEM). Il s'agit d'une maladie rénale qui est la cause la plus fréquente de syndrome

néphrotique chez l'adulte, et dont l'origine reste généralement indéterminée. L'analyse de biopsies de tissu rénal provenant de patients atteints de GEM par MALDI-MSI a mis en évidence la surexpression de la kinase MRCK γ chez les patients (Smith 2017). Le rôle de cette kinase n'a pas encore été étudié dans la physiopathologie de GEM mais ces résultats suggèrent que les isoformes alpha et bêta pourraient également être impliquées dans des processus pathologiques différents de l'invasion cancéreuse.

Inhibiteurs

Des inhibiteurs de MRCK α ont commencé à être développés pour deux raisons, mieux comprendre précisément son rôle, et cibler spécifiquement cette kinase pour bloquer l'invasion tumorale et la métastase dans plusieurs cancers présentés ci-dessus. De nombreux inhibiteurs des MRCKs ont été identifiés : le GSK690693, la staurosporine, les inhibiteurs de ROCK le fasudil, le H-89, le DJ4 ou encore le Y-2763. Néanmoins ils ont tous en commun leur absence de spécificité vis-à-vis de MRCK α (Kale 2014, Unbekandt 2014).

Chélérythrine chloride

Un screening dans une librairie de plus de 150 composés connus pour être des inhibiteurs de kinases a permis l'identification de la chélérythrine chloride, décrite comme un inhibiteur spécifique de MRCK α et MRCK β . Suite à l'ajout de cet inhibiteur sur des cellules en culture, la phosphorylation de MLC2 est inhibée, les structures d'acto-myosine des lamellipodes sont perturbées, la localisation intracellulaire de MRCK est modifiée et la migration cellulaire diminuée. A de faibles doses et sur des traitements de courte durée la chélérythrine chloride ne semble pas avoir d'autres effets, néanmoins elle peut déclencher l'apoptose lors de traitements supérieurs à 16h (Tan 2011). Hélas, en plus de son rôle dans l'induction de l'apoptose, la chélérythrine chloride est régulièrement utilisée comme inhibiteur de la PKC (Einat 2014, Juan 2012, Shi 2019).

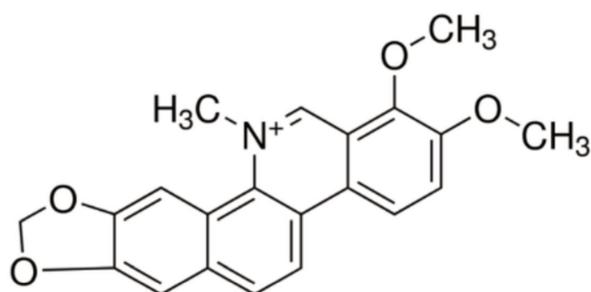


Figure 48 : Structure de la chélérythrine chloride

Cycloartane-3,24,25-triol

Le Cycloartane-3,24,25-triol est décrit comme sélectif envers MRCK α parmi 450 autres kinases. Le traitement de lignées cellulaires du cancer de la prostate avec cet inhibiteur inhibe l'activité de MRCK α et réduit la viabilité des cellules. Les auteurs proposent son utilisation comme médicament anti-cancéreux (Lowe 2012). Malgré tout, ces résultats n'ont pas été confirmés *in vivo*.

Inhibiteurs BDPs

Dans le but d'identifier des inhibiteurs spécifiques envers les kinases MRCK, un crible a été réalisé dans une banque de molécules. Le BDP5290 est un inhibiteur efficace qui se lie à MRCK β au niveau de son domaine de liaison à l'ATP. Il induit une baisse de la phosphorylation de MLC2 dans des cellules de cancer du sein et une diminution de la capacité d'invasion de cellules de carcinome épidermoïde dans du matrigel. Il est plus efficace envers MRCK β qu'envers MRCK α (Unbekandt 2014).

Depuis, deux nouveaux inhibiteurs beaucoup plus efficaces ont été proposés par la même équipe : les BDP8900 et BDP9066. Leur efficacité a été validée dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Le BDP9066 a également été testé dans un modèle murin de cancer de la peau. Après avoir traité les souris avec cet inhibiteur, l'activité de MRCK α est réduite ainsi que la phosphorylation de MLC2. De plus, l'invasion tumorale ainsi que les lésions cutanées diminuent. C'est donc la première fois qu'un inhibiteur sélectif envers les kinases MRCK montre une efficacité thérapeutique dans un modèle de cancer (Unbekandt 2018). De plus, les effets inhibiteurs du BDP9066 sur le phénotype invasif du glioblastome sont extrêmement prometteurs. Les auteurs ont montré que suite aux séances de radiothérapie, le seul traitement actuellement efficace, l'activité de MRCK α/β est augmentée, ce qui amplifie les phosphorylations de MLC2 et MLCP, et coïncide avec une augmentation de l'invasion tumorale. Ces résultats sont confirmés *in vivo* dans un modèle murin développant un glioblastome. Alors que le traitement de ces souris avec le BDP9066 associé à la radiothérapie bloque totalement les infiltrations de cellules tumorales dans le reste du cerveau et augmente significativement la survie des souris (Birch 2018).

VI.4. Rho GTPases

Les GTPases de la famille Rho comportent une vingtaine de membres catégorisés en 8 sous-familles dont les plus connues sont : Rac, Cdc42 et Rho qui font partie des Rho GTPases dites classiques. Trois membres de ces sous-familles, Cdc42, Rac1 et RhoA sont très étudiés pour leur implication dans de nombreux processus cellulaires comprenant la mise en place de la polarité cellulaire, la migration cellulaire, la prolifération, la contraction du cytosquelette (cytodiérèse, endocytose, contraction musculaire, etc.) ou le trafic vésiculaire (Chi 2013, Symons 2003).

Ces GTPases subissent des cycles de régulation, elles sont retrouvées en alternance sous une forme active liée à la GTP ou inactive liée à la GDP grâce à des protéines régulatrices, les GAPs (GTPase-Activating Proteins), les GEFs (Guanine Exchange Factors) et les GDI (Guanine Dissociation Inhibitors) (Figure 49). Les GAPs inactivent les GTPases en favorisant l'hydrolyse de la GTP donc l'association GTPase-GDP. Les GEFs facilitent la libération du GDP et la liaison de GTP. Enfin les GDI peuvent se lier aux GTPases et les maintenir inactives, liées au GDP.

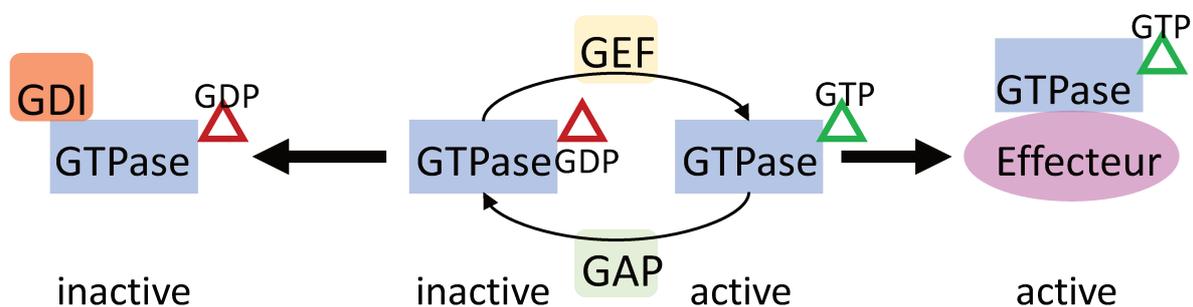


Figure 49 : Cycle des Rho GTPases. Les Rho GTPases sont régulées de façon cyclique, grâce aux GEFs et aux GAPs elles alternent entre une conformation active (liée à la GTP) ou inactive (lié à la GDP). Une fois actives, elles peuvent se lier avec un effecteur. Les Rho GTPases peuvent également être maintenues sous forme inactive par l'association avec les GDI.

VI.4.1. Cdc42

L'activateur principal de la kinase MRCK α est la petite GTPase Cdc42. Cdc42 est une protéine très conservée de la famille des Rho GTPases. Elle est indispensable au remodelage du cytosquelette d'actine via de nombreux effecteurs : N-WASP, TOCA1, MRCK... (Watson 2017).

Cdc42 a été découverte dans les années 90 pour son rôle dans le bourgeonnement des levures, phénomène indispensable à la mise en place de la polarité (Short 2015). Dans les cellules de mammifères, Cdc42 est impliquée dans de multiples processus : mise en place de la polarité, régulation du trafic vésiculaire ou encore endocytose (Etienne-Manneville 2001, Harris 2010, Rojas 2001). Parmi les partenaires privilégiés de Cdc42 on retrouve le complexe WASP – Arp2/3, essentiel au trafic rétrograde et antérograde en provenance de l'appareil de Golgi, à l'endocytose clathrine dépendante et à l'exocytose (Gasman 2004, Matas 2004).

Cdc42 est par exemple impliquée dans plusieurs étapes du trafic intracellulaire de CFTR. Il a en effet été montré que Cdc42 est nécessaire à la stabilité de CFTR mais que la GTPase favorise aussi son endocytose. Suite à l'extinction de l'expression de Cdc42 par ARN interférent, les auteurs observent une augmentation de l'expression de CFTR et de son activité. Ils concluent qu'en l'absence de Cdc42, la stabilité de CFTR à la membrane est augmentée (Ferru-Clement 2015). A l'inverse, pour le transporteur NPC1L1 exprimé au canalicule biliaire, Cdc42 est indispensable à son adressage : suite à un KO de Cdc42, NPC1L1 n'est plus adressé à la membrane canaliculaire des hépatocytes (Xie 2011).

Cdc42 et ses différents effecteurs sont donc impliqués dans de très nombreux processus de trafic intracellulaire.

VI.4.2. Voies de signalisation Cdc42/MRCK α /MLC2.

Comme décrit précédemment, la kinase MRCK α peut être activée par la GTPase Cdc42 lorsqu'elle est sous forme active, liée à la GTP. Une fois active, elle permet entre autres d'augmenter la phosphorylation de MLC2, ce qui amplifie l'activité ATPasique de la chaîne lourde de myosine NMII, nécessaire à la contraction des microfilaments d'actine (Figure 50).

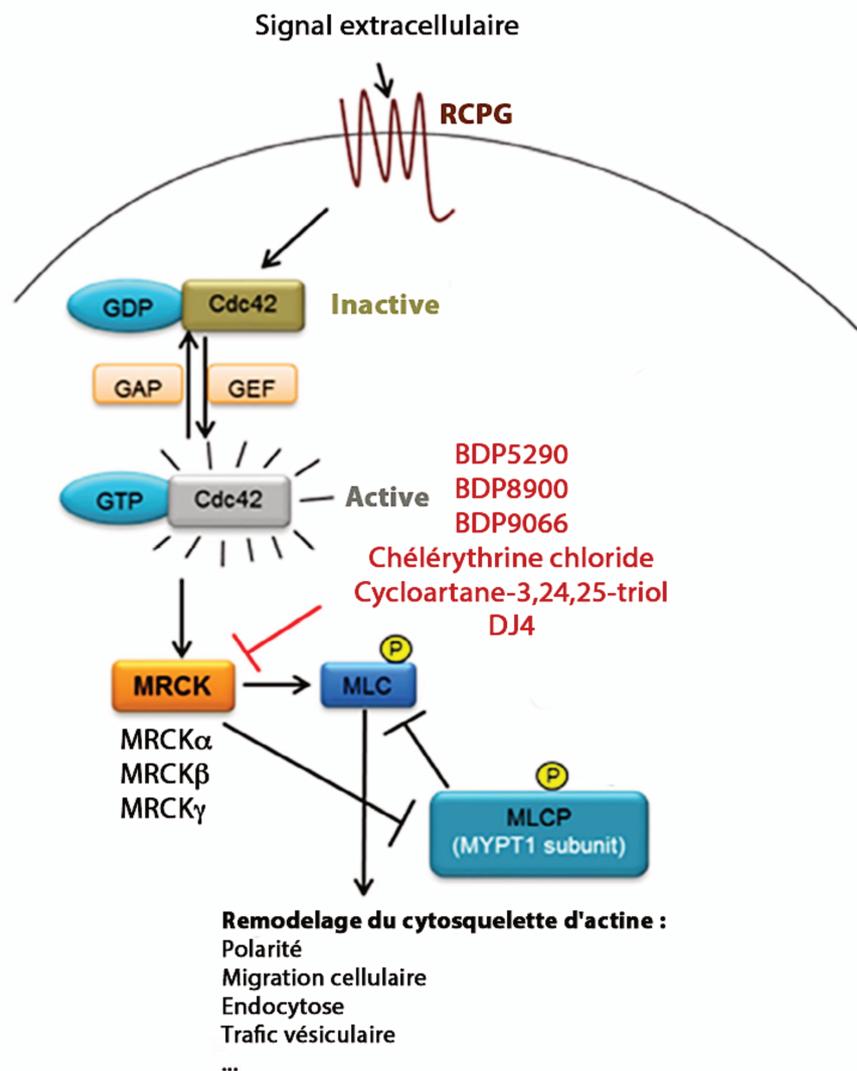


Figure 50 : Voie de signalisation Cdc42 / MRCK / MLC2. La petite GTPase Cdc42 est activée grâce aux GEF (Guanine Exchange Factor). Sous sa forme Cdc42-GTP, elle peut interagir avec la sérine-thréonine kinase MRCK qui contribue à maintenir MLC2 phosphorylée donc active. MLC2 pourra alors participer au remodelage du cytosquelette d'actine impliqué dans de nombreux événements cellulaires : mise en place de la polarité, migration cellulaire, trafic intracellulaire, endocytose, etc. D'après (Kale 2014)

VI.4.3. Modèles souris *Cdc42* *-/-* dans les hépatocytes.

Pour étudier l'implication de Cdc42 au niveau hépatique, un modèle de souris dans lequel l'expression de Cdc42 est éteinte spécifiquement dans les hépatocytes a été généré. Les auteurs ont constaté qu'elles développent une jaunisse et que leurs canalicules biliaires sont dilatés. De plus, entre sept et neuf mois, les souris développent un carcinome hépatocellulaire. Le cytosquelette d'actine est épaissi sous la membrane canaliculaire, mais les jonctions serrées au niveau des hépatocytes sont intactes. En plus des canalicules dilatés et des anomalies du cytosquelette, les transaminases circulantes (ALAT, ASAT) et la bilirubine sont significativement augmentées dans le sérum des souris *Cdc42* *-/-* (van Hengel 2008). Une autre étude utilise ce modèle pour observer la régénération du foie chez ces souris suite à une hépatectomie partielle et confirme ces résultats, les souris *Cdc42* *-/-* développent des symptômes de cholestase en l'absence de cette GTPase (Yuan 2009). Enfin, l'expression membranaire du transporteur de cholestérol NPC1L1 a été étudiée dans ce même modèle. Il s'agit d'un transporteur exprimé par les hépatocytes et les entérocytes et localisé à la membrane canaliculaire des hépatocytes où il permet l'absorption du cholestérol (Brown 2009). Sans expression de Cdc42 dans les hépatocytes, NPC1L1 n'est plus adressé à la membrane canaliculaire et son interaction avec MYO5B (une myosine) et l'actine est diminuée, ce qui prévient la réabsorption du cholestérol (Xie 2011).

Ces résultats suggèrent un rôle de Cdc42 dans le trafic de protéines canaliculaires comme NPC1L1. De plus, les augmentations des transaminases, de la bilirubine, la dilatation des canalicules indiquent des troubles cholestatiques chez ces souris. Les effets pro-cholestatiques de Cdc42 pourraient venir des effecteurs MRCK α et MLC2 et affecter l'expression membranaire d'ABCB4 et d'autres transporteurs ABC.

-OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE-

L'identification moléculaire des transporteurs biliaires représente une avancée significative dans la compréhension des mécanismes de la sécrétion biliaire. Actuellement, le défi est de comprendre comment ces transporteurs fonctionnent, quels sont leurs interlocuteurs dans les cellules, comment des altérations de ces transporteurs entraînent une cholestase et surtout comment les corriger. Mon projet de thèse se situe dans ce cadre, et consiste à cibler le transporteur de phospholipides biliaires ABCB4, un des principaux transporteurs exprimés à la membrane des canalicules biliaires et pourtant parmi les moins étudiés. ABCB4 joue un rôle clé dans la physiologie biliaire, il est donc essentiel de comprendre les mécanismes qui régulent son adressage à la membrane canaliculaire des hépatocytes, son activité et sa stabilité membranaire.

La première partie de ma thèse est dédiée à l'étude de cinq mutations identifiées chez des patients atteints de PFIC3, du syndrome LPAC ou d'ICP. Il s'agit des mutations G535D, G536R, G1178S, S1176L, et S1076C. Elles sont situées dans les sites conservés de liaison à l'ATP d'ABCB4. Ce travail a été initié grâce à une collaboration que mon équipe a mise en place avec Isabelle Callebaut (Institut de Minéralogie et Physique des Milieux Condensés, UMR7590, CNRS-Sorbonne Université), une spécialiste internationalement reconnue de la modélisation de la structure 3D des transporteurs ABC, en particulier CFTR, et de l'impact des mutations. L'objectif de ce travail était de combiner des approches théoriques et expérimentales pour comprendre l'impact des cinq mutations identifiées chez les patients et de développer des stratégies thérapeutiques ciblées pour corriger les défauts engendrés.

Nous avons reproduit ces mutations dans l'ADN codant pour ABCB4 afin de les étudier dans nos modèles cellulaires : les cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney) et les HepG2. Les cellules HepG2 dérivent d'un hépatocarcinome humain et peuvent se polariser *in vitro*. Comme les hépatocytes, elles développent un pôle apical canaliculaire permettant d'étudier la localisation cellulaire des différents variants d'ABCB4. Les cinq mutants G535D, G536R, G1178S, S1176L, et S1076C ont été transfectés dans ces deux modèles cellulaires pour étudier leurs effets phénotypiques et fonctionnels.

Dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai abordé une question fondamentale visant à comprendre la biologie du transporteur ABCB4. L'objectif de cette partie était d'étudier le rôle du domaine N-terminal d'ABCB4 et de rechercher des partenaires impliqués dans la régulation de son activité ainsi que de son expression à la membrane canaliculaire. Le domaine N-terminal d'ABCB4 est constitué de 58 acides aminés et est sans homologie avec d'autres transporteurs

ABC. Il s'agit d'une région importante puisque des mutations responsables de pathologies y sont localisées (Gautherot 2014). De plus, la présence de plusieurs sites potentiels de phosphorylation (sérines et thréonines) suggère qu'il s'agit d'une région d'interaction protéique, notamment avec des kinases. Notre approche a consisté à réaliser un crible double-hybride dans une banque de foie humain avec l'extrémité N-terminale d'ABCB4 comme appât. Plusieurs partenaires ont été identifiés parmi lesquels la sérine-thréonine kinase MRCK α (également appelée Cdc42-BPA pour Cdc42-binding Protein A). Cette kinase a été très étudiée pour son rôle dans le remodelage du cytosquelette d'actine en tant qu'effectrice de la GTPase Cdc42 (Leung 1998, Wilkinson 2005). MRCK α activée par Cdc42-GTP, phosphoryle la chaîne légère de myosine II non musculaire (Myosin Light Chain II, MLC2). Cette cascade de signalisation régule plusieurs processus cellulaires tels que le trafic vésiculaire, la polarité cellulaire et la migration cellulaire (Figure 51).

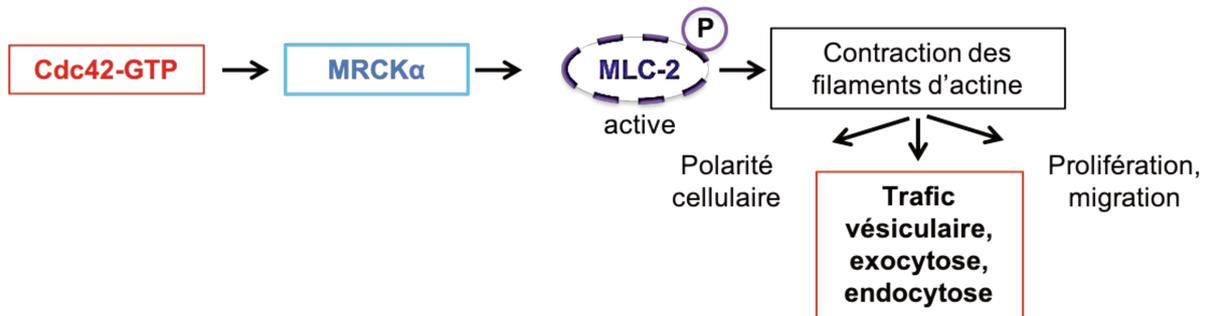


Figure 51 : La voie de signalisation Cdc42 / MRCK α / MLC2 est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine. La GTPase Cdc42 sous forme liée au GTP active la kinase MRCK α . Une fois activée, MRCK α peut phosphoryler MLC2 sur sa sérine 19 et aider à la maintenir active en inhibant la phosphatase MLCP. MLC2 permet alors le remodelage du cytosquelette d'actine, un processus impliqué dans de nombreux événements : mise en place et maintien de la polarité, migration cellulaire, trafic vésiculaire, endocytose.

Il est intéressant de noter que des données de la littérature ont mis en évidence une interaction entre MLC2 et ABCB4 dont le rôle n'a jamais été élucidé (Chan 2005). C'est dans ce contexte que j'ai étudié l'implication de ces deux partenaires dans la régulation de l'expression membranaire et de la fonction d'ABCB4. Dans ce but, nous avons inhibé ou éteint l'expression de MRCK α et de MLC2, et nous nous sommes intéressés à l'expression d'ABCB4, la stabilité de sa forme mature, son activité et son internalisation.

-RESULTATS-

Première partie :

Impact de mutations situées dans les domaines de liaison à l'ATP d'ABCB4.

Le choix des mutations étudiées a été fait en concertation avec les cliniciens des centres de références des maladies biliaires de l'enfant (Hôpital du Kremlin-Bicêtre, Pr. Emmanuel Jacquemin et Pr. Emmanuel Gonzales) et de l'adulte (Hôpital Saint-Antoine, Dr. Véronique Barbu).

Les variants étudiés sont les glycines G535D et G536R situées dans la signature « LSGGQ » du NBD1, la glycine G1178S et la sérine S1176L situées dans la signature du NBD2, ainsi que la sérine S1076C située dans le Walker A du NBD2. Des alignements de séquences des transporteurs de la famille ABC, ont révélé que les variants G536R, S1076C et G1178S sont respectivement homologues des mutations de classe III, D551D, S1251N G1349D de CFTR.

Des prédictions basées sur la modélisation moléculaire nous ont indiqué que ces mutations entraînaient un défaut de la fonction de transport d'ABCB4, comme elles entraînent un défaut de fonction de CFTR. De plus, comme les mutations homologues de CFTR elles sont corrigées par le VX-770 (Ivacaftor, Kalydeco®), un médicament approuvé en clinique pour le traitement des patients atteints de mucoviscidose porteurs de ces mutations. Ces résultats ouvrent des perspectives de repositionnement du VX-770 pour un traitement personnalisé des patients ayant une maladie liée à un défaut d'ABCB4. Ces travaux que je signe en co-premier auteur sont publiés dans la revue *Hepatology*.

Functional Defect of Variants in the Adenosine Triphosphate–Binding Sites of ABCB4 and Their Rescue by the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Potentiator, Ivacaftor (VX-770)

Jean-Louis Delaunay,^{1*} Alix Bruneau,^{1*} Brice Hoffmann,² Anne-Marie Durand-Schneider,¹ Véronique Barbu,^{1,3} Emmanuel Jacquemin,^{4,5} Michèle Maurice,¹ Chantal Housset,^{1,3} Isabelle Callebaut,² and Tounsia Ait-Slimane¹

ABCB4 (MDR3) is an adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporter expressed at the canalicular membrane of hepatocytes, where it mediates phosphatidylcholine (PC) secretion. Variations in the *ABCB4* gene are responsible for several biliary diseases, including progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3), a rare disease that can be lethal in the absence of liver transplantation. In this study, we investigated the effect and potential rescue of *ABCB4* missense variations that reside in the highly conserved motifs of ABC transporters, involved in ATP binding. Five disease-causing variations in these motifs have been identified in *ABCB4* (G535D, G536R, S1076C, S1176L, and G1178S), three of which are homologous to the gating mutations of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR or ABCC7; i.e., G551D, S1251N, and G1349D), that were previously shown to be function defective and corrected by ivacaftor (VX-770; Kalydeco), a clinically approved CFTR potentiator. Three-dimensional structural modeling predicted that all five *ABCB4* variants would disrupt critical interactions in the binding of ATP and thereby impair ATP-induced nucleotide-binding domain dimerization and ABCB4 function. This prediction was confirmed by expression in cell models, which showed that the ABCB4 mutants were normally processed and targeted to the plasma membrane, whereas their PC secretion activity was dramatically decreased. As also hypothesized on the basis of molecular modeling, PC secretion activity of the mutants was rescued by the CFTR potentiator, ivacaftor (VX-770). **Conclusion:** Disease-causing variations in the ATP-binding sites of ABCB4 cause defects in PC secretion, which can be rescued by ivacaftor. These results provide the first experimental evidence that ivacaftor is a potential therapy for selected patients who harbor mutations in the ATP-binding sites of ABCB4. (HEPATOLOGY 2017;65:560-570)

ABCB4, also called MDR3 (multidrug resistance protein 3), is a phospholipid floppase almost exclusively expressed at the canalicular membrane of hepatocytes where its function is to translocate phosphatidylcholine (PC) into bile.^(1,2) Variations in the *ABCB4* gene sequence cause several

chronic and progressive liver diseases.⁽³⁾ The most severe is progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3), which develops early in childhood and most often requires liver transplantation (LT). Less-severe disorders are intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) and low-phospholipid-associated

Abbreviations: 3D, three-dimensional; ABC, ATP-binding cassette; ATP, adenosine triphosphate; BSA, bovine serum albumin; CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; HEK, human embryonic kidney; ICP, intrahepatic cholestasis of pregnancy; IgG, immunoglobulin G; LPAC, low-phospholipid-associated cholelithiasis; LT, liver transplantation; MDR3, multidrug resistance protein 3; MRP2, multidrug resistance-associated protein 2; MSD, membrane-spanning domain; NaTC, sodium taurocholate; NBD, nucleotide-binding domain; PC, phosphatidylcholine; PFIC3, progressive familial intrahepatic cholestasis type 3; UCDA, ursodeoxycholic acid; wt, wild type.

Received April 20, 2016; accepted October 11, 2016.

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.28929/supinfo.

cholelithiasis (LPAC) syndrome, which occur in young adults. Today, approximately 300 distinct disease-causing *ABCB4* variants have been reported, typically with homozygous status in PFIC3 and with heterozygous status in LPAC syndrome and ICP.⁽³⁻¹⁰⁾ A major challenge is to find pharmacological treatments for the severe forms of these diseases. It has been reported that molecules designed to rescue trafficking defective CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) mutants can also be effective toward other adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporters.⁽¹¹⁾ For *ABCB4*, we have shown that variations, which impair *ABCB4* folding in the endoplasmic reticulum, lead to premature degradation and could be rescued *in vitro* by treatments with cyclosporin A or C.^(12,13) Two other chemical chaperones, 4-phenylbutyric acid and curcumin, have been recently proposed to rescue *ABCB4* variants that impaired traffic.⁽¹⁴⁾ However, the majority of variations affect PC secretion activity of *ABCB4*,⁽¹³⁾ and no pharmacological treatment has been proposed for these mutations yet.

ABCB4 belongs to the superfamily of ABC transporters, which are characterized by two membrane-spanning domains (MSDs) involved in substrate specificity and secretion, and two nucleotide-binding domains (NBDs) that bind and hydrolyze ATP to provide the energy required for the transport. The NBDs are well conserved throughout the family and contain specific

motifs involved in ATP binding, such as the Walker A and Walker B motifs, the A-, D-, H-, and Q-loops, and the ABC signature, LSGGQ (Leu-Ser-Gly-Gly-Gln), which is unique to the family.⁽¹⁵⁾ Five point variations located in the ATP-binding sites of *ABCB4* (G535D, G536R, S1076C, S1176L, and G1178S) have been identified in patients with PFIC3 (S1076C),⁽¹⁶⁾ LPAC syndrome (G536R, S1176L, and G1178S; this study), or ICP (G535D, G536R).^(17,18) ATP-binding sites of *ABCB4* have a strong homology with those of the chloride channel, CFTR (or ABCC7), another ABC transporter, which is deficient in cystic fibrosis (CF). The glycines, 536 and 1178, in the LSGGQ signature of *ABCB4* and serine 1076 in the Walker A motif of *ABCB4* are homologous to the glycines, 551 and 1349, and serine 1251 of CFTR, respectively. Variations of G551, G1349, and S1251 in CF patients do not affect CFTR expression at the plasma membrane, but lead to defective gating and a complete absence of chloride secretion.⁽¹⁹⁾ G551D is the third-most common CF mutant and the first to be treated with a clinically approved CFTR potentiator, ivacaftor (also known as VX-770 or Kalydeco; Vertex pharmaceuticals, Boston, MA).⁽²⁰⁻²³⁾ The approval of ivacaftor (VX-770) was extended to eight additional gating mutations of CFTR, including S1251N and G1349D.⁽¹⁹⁾

The aim of this work was to study whether the five disease-causing variations in the ATP-binding sites of

Supported by grants from the Sorbonne Universités (Programme Convergence@Sorbonne Universités, Investissements d'avenir), the association Mucoviscidose-ABCF2, the French Association Vaincre La Mucoviscidose, and the French Association for the Study of the Liver (AEEF). A.B. received a fellowship from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche".

**These authors contributed equally to this work.*

Copyright © 2016 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.28929

Potential conflict of interest: Nothing to report.

ARTICLE INFORMATION:

From the ¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR_S 938, Saint-Antoine Research Center, F-75012, Paris, France; ²IMPMC, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR CNRS 7590, Muséum National d'Histoire Naturelle, IRD UMR 206, IUC, Case 115, 4 Place Jussieu, 75005, Paris Cedex 05, France; ³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Saint-Antoine Hospital, Reference Center for Rare Disease, Inflammatory Biliary Diseases & Hepatology Department, F-75012, Paris, France; ⁴Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Faculty of Medicine Paris Sud, CHU Bicêtre, Pediatric Hepatology & Pediatric Hepatic Transplant Department, Reference Center for Rare Pediatric Liver Diseases, F-94275, Le Kremlin Bicêtre, France; and ⁵Université Paris Sud, INSERM, UMR_S 1174, HepatinoV, Orsay, France.

ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Tounsia Ait-Slimane, Ph.D.
UPMC/INSERM, Saint-Antoine Research Center,
Faculty of Medicine Pierre et Marie Curie
27 rue Chaligny

75571 Paris cedex 12, France
E-mail: tounsia.ait-slimane@inserm.fr
Tel: + 33-1-40-01-13-62

ABCB4 also impaired ABCB4 function and whether they could be rescued by ivacaftor (VX-770).

Patients and Methods

PATIENTS' DATA ANALYSES

ABCB4 gene analysis was performed in patients referred to the Reference Center for Inflammatory Biliary Diseases (Hôpital Saint-Antoine, Paris, France) as reported.⁽²⁴⁾ Clinical phenotypes of patients were classified according to current spectrum of liver diseases related to *ABCB4* gene variations.

MOLECULAR MODELING

In order to get an accurate three-dimensional (3D) structure model of the ABCB4 NBD1/NBD2 assembly, we used as a template the experimental 3D structure of the MJ0796 NBD1/NBD2 heterodimer,⁽²⁵⁾ pdb 112t, as described for the modeling of the CFTR/ABCC7 NBD1/NBD2 assembly.⁽²⁶⁾ This experimental 3D structure of a hydrolytically inactive NBD dimer was solved at high resolution (1.9 Å) in the presence of ATP, thus allowing an accurate analysis of the ATP-binding sites. The model was constructed using Modeller (v9.14).⁽²⁷⁾

ANTIBODIES AND REAGENTS

Mouse monoclonal anti-ABCB4 (P3-II-26) and anti-MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2; M2-I-4) antibodies were purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA), and the goat polyclonal anti-actin antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Goat anti-immunoglobulin G (IgG) 2b Alexa Fluor 488 and goat anti-IgG1 Alexa Fluor 594 secondary antibodies, peroxidase-conjugated secondary antibodies, and culture media were from Invitrogen-Life Technologies (Saint-Aubin, France). Ivacaftor (VX-770) was from Clinisciences (Nanterre, France). Sodium taurocholate (NaTC), ursodeoxycholic acid (UDCA), fatty-acid-free bovine serum albumin (BSA), and calf serum were from Sigma-Aldrich (Lyon, France).

DNA CONSTRUCTS AND MUTAGENESIS

The construction of the human wild-type (wt) *ABCB4*, isoform A (NM_000443.3), in the pcDNA3

vector was reported.⁽¹³⁾ Site-directed mutagenesis was performed using the Quik-Change II XL mutagenesis kit from Agilent Technologies (Massy, France). DNA primers used for *ABCB4* mutagenesis were from Invitrogen-Life Technologies and are listed in Supporting Table S1. All constructs were verified by automated sequencing.

CELL CULTURE, TRANSFECTION, AND IMMUNOANALYSIS

ABCB4-wt, ABCB4-G535D, ABCB4-G536R, ABCB4-S1076C, ABCB4-S1176L, and ABCB4-G1178S encoding vectors were transiently transfected in HepG2 and human embryonic kidney (HEK) 293 cells as published.^(24,28) Of note is that, in these conditions, HepG2 cells form canaliculi and display virtually no endogenous ABCB4 expression. Immunofluorescence and immunoblotting analyses were performed as described.⁽²⁸⁾

IVACAFTOR (VX-770) TREATMENT AND PC SECRETION ANALYSIS

HEK293 cells were seeded on polylysine-precoated six-well plates at a density of 1.3×10^6 cells/well. Six hours after seeding, cells were transiently transfected with 1 µg of ABCB4-encoding plasmids using Turbofect (Thermo-Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France), following the manufacturer's instructions. Twenty-four hours posttransfection, cells were washed twice with Hanks' balance salt solution, and then the medium was replaced by phenol red-free Dulbecco's modified Eagle's medium containing 0.5 mmol/L of NaTC and 0.02% fatty-acid-free BSA in the presence or absence of 10 µmol/L of ivacaftor, 50 µM/L of UDCA, and 10 µmol/L of ivacaftor plus 50 µM/L of UDCA. Media were collected after 24 hours. Measurement of PC content in collected media was performed as described.⁽²⁴⁾

STATISTICAL ANALYSIS

Data are shown as means ± SD. Statistical significance among means was determined using the Student *t* test. A *P* value < 0.05 was considered significant.

TABLE 1. Characteristics of Patients With *ABCB4* Variations

Patients (No./Sex)	Onset	Nucleotide Variant	Amino-Acid Variant	Domain	Homologous <i>CFTR</i> Variant	<i>ABCB4</i> Allelic Status	Diagnosis	Reference
1/F	Adolescent	c. 1605G>A	G535D	S	—	HTZ	Cholelithiasis; ICP Biliary cirrhosis	(17)
2/F	Young adult	c. 1606 G>A	G536R	S	G551D	HTZ	ICP	(18)
3/F	Young adult	c. 1606 G>A	G536R	S	G551D	HTZ	LPAC	This study
4/M	Child	c.3228 A>T	S1076C	WA	S1251N	HMZ	PFIC3	(16)
5/M	Young adult	c.3527 C>T	S1176L	S	—	HTZ	LPAC	This study
6/F	Young adult	c.3532 G>A	G1178S	S	G1349D	HTZ	LPAC	This study

Nucleotide variant corresponds to the complementary DNA of the NM_000443.3 (*ABCB4*, transcript variant A, messenger RNA). Abbreviations: F, female; M, male; S, LSGGQ signature; WA, Walker A; HTZ, heterozygous; HMZ, homozygous.

Results

ABCB4 VARIATIONS AND PATIENTS

The main characteristics of the patients are shown in Table 1. The S1076C variation was identified with a homozygous status in a PFIC3 patient.⁽¹⁶⁾ The G535D was described with a heterozygous status in a patient who developed cholelithiasis, ICP, and biliary cirrhosis.⁽¹⁷⁾ The G536R was described with a heterozygous status in

a patient with ICP.⁽¹⁸⁾ G536R was also identified, as well as S1176L and G1178S, all with heterozygous status in patients with LPAC syndrome (this study).

HOMOLOGY OF DISEASE-CAUSING VARIATIONS IN THE ATP-BINDING SITES OF ABCB4 AND CFTR/ABCC7

Distribution of the five disease-causing variations of interest in this study is shown in Fig. 1 (left panel).

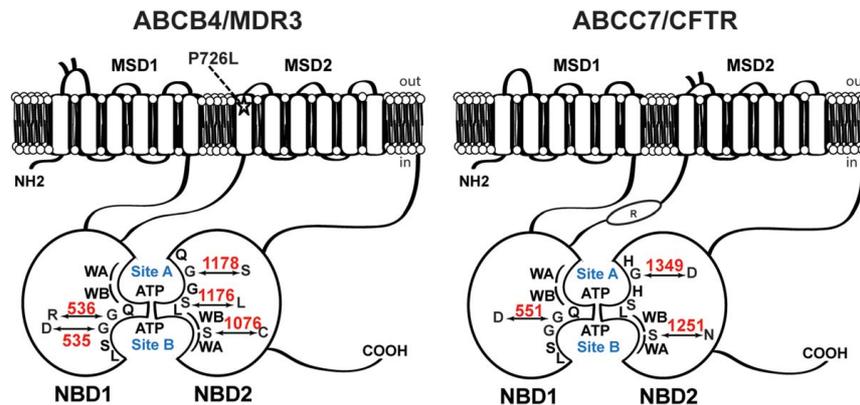


FIG. 1. Organization of ATP-binding sites in ABCB4/MDR3 and ABCC7/CFTR. Both proteins are composed of two MSDs (MSD1 and MSD2) and two NBDs (NBD1 and NBD2). The two ATP-binding pockets (sites A and B) formed by the ABC signature (LSGGQ) and Walker A (WA) and Walker B (WB) motifs are represented. In ABCC7/CFTR, ABC signature of site A is degenerated (LSHG). The five disease-causing variations of ABCB4 investigated here are indicated in red. G536, in the signature of the NBD1 of ABCB4, is homologous to G551 (in red) in the signature of the NBD1 of CFTR; S1076 in the Walker A of NBD2 of ABCB4 is homologous to S1251 (in red) in the Walker A of NBD2 of CFTR; and G1178 in the signature of the NBD2 of ABCB4 is homologous to G1349 (in red) in the signature of the NBD2 of CFTR. The P726L, located in the transmembrane domain of ABCB4 is used as a control variant in this study.

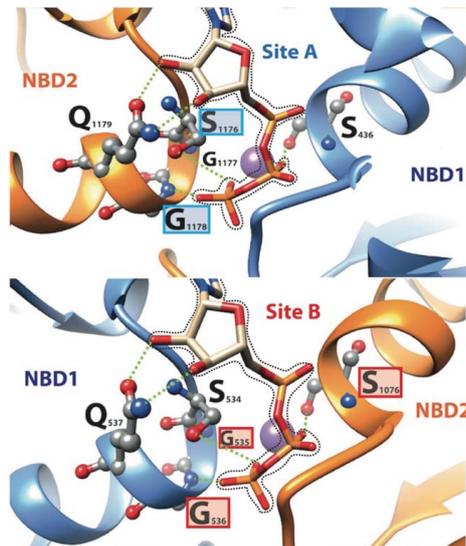


FIG. 2. 3D structure modeling of the two ATP-binding sites (sites A [up] and B [bottom]) of human ABCB4, in which the mutations studied here are boxed on a colored background. Interaction between the ATP molecules (dashed black line) and the different residues are indicated by hatched green lines.

They affect positions that all belong to the two ATP-binding sites of ABCB4 (site A and site B), formed at the interface of the head-to-tail NBD1/NBD2 heterodimer. Site A is formed by the NBD1 Walker A and Walker B motifs and the NBD2 LSGGQ signature, whereas site B is formed by the NBD2 Walker A and Walker B motifs and the NBD1 signature. Three of these ABCB4 variations (G536R, S1076C, and G1178S; Fig. 1, left panel) are homologous to the gating mutations of CFTR/ABCC7 (G551D, S1251N, and G1349D), respectively (Fig. 1 [right panel] and Supporting Fig. S1).

MOLECULAR MODELING OF ABCB4 MUTANTS

3D structure modeling showed that G536 and G1178 of ABCB4 were located at equivalent positions of the ABC signature sequences of NBD1 and NBD2, respectively (LSGGQ motif, in which the

mutated glycine is underlined). In this position, the nitrogen atom is hydrogen bonded to one of the oxygen atoms of the ATP γ -phosphate (Fig. 2 and Supporting Fig. S2). The lack of a side chain exposes the protein backbone so that the ATP γ -phosphate can form this hydrogen bond with the backbone amide. At this position, there is not enough room to accommodate a long side chain, such as that of arginine. Missense mutations would thus lead to steric hindrance. Steric hindrance is also predicted for mutation of G535 in site B, for which the backbone nitrogen atom is in Van der Waals contact with the ATP γ -phosphate (Fig. 2 and Supporting Fig. S2). In this case also, there is no room to accommodate a larger side chain. In site B, the oxygen atom of the S1076 side chain (Walker A motif) of NBD2 is hydrogen bonded to the ATP β -phosphate (Fig. 2 and Supporting Fig. S2). Furthermore, in site A, the oxygen atom of the S1176 side chain in the NBD2 ABC signature is also hydrogen bonded to the ATP γ -phosphate. Substitution of both these serine residues would lead to disruption of these critical contacts with ATP (Fig. 2 and Supporting Fig. S2). In summary, structure modeling indicated that the five mutants tested in this study were likely to disrupt critical interactions for ATP binding and thereby to interrupt ATP-induced NBD dimerization from which one would expect a defect in ABCB4 function.

MATURATION AND CANALICULAR LOCALIZATION OF ABCB4 MUTANTS

To determine their functional impact, the five point mutations were introduced into the *ABCB4* complementary DNA by site-directed mutagenesis. Expression of the mutants was compared to that of ABCB4-wt after transient transfection in polarized HepG2 hepatoma cells. These cells form neo-bile canaliculi in culture and allow localization studies. Forty-eight hours after transfection, cells were fixed, stained, and analyzed by confocal microscopy to determine whether the mutants reached the canalicular membrane. Figure 3A shows that ABCB4-wt was exclusively detected at the canalicular membrane of HepG2 cells as shown^(13,24,28) and colocalized with endogenously expressed MRP2, used as a canalicular marker.⁽²⁹⁾ Like ABCB4-wt, all the mutants displayed canalicular localization and colocalized with MRP2 (Fig. 3A). The electrophoretic patterns obtained by western blotting analysis of the

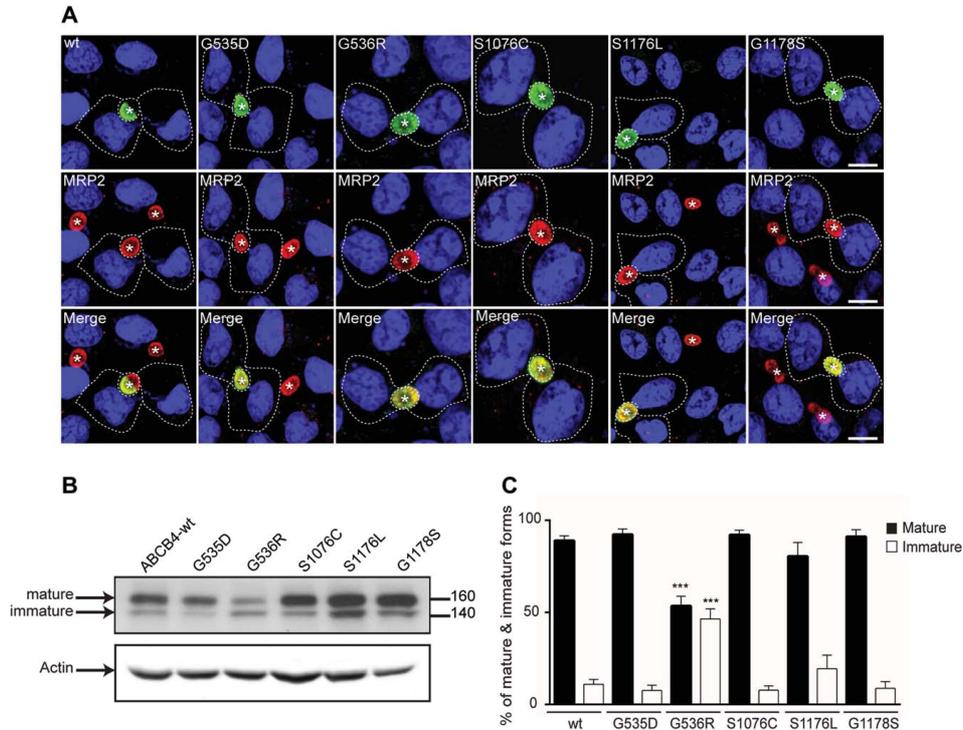


FIG. 3. Expression and processing of ABCB4 mutants in HepG2 cells. (A) Localization of ABCB4-wt and mutants by immunofluorescence and confocal microscopy. HepG2 cells transiently expressing ABCB4-wt or the mutants were fixed, permeabilized, and costained with anti-ABCB4 (P3-II-26) and anti-MRP2 (M2-I-4) monoclonal antibodies, followed by goat anti-IgG2b Alexa Fluor 488- and goat anti-IgG1594-conjugated secondary antibodies, and visualized by confocal microscopy. In transfected cells, ABCB4-wt and the mutants are expressed at the canalicular membrane and colocalized with endogenously expressed MRP2. Nuclei are stained with Draq5 (in blue). Transfected cells are indicated by dashed lines. *Bile canalculus. Bar = 10 μ m. (B) HepG2 cells transiently expressing ABCB4-wt or the mutants were lysed and analyzed by immunoblotting using P3II-26 antibody. Molecular masses are indicated on the right (in kDa). Actin was used as a loading control. (C) Quantification of experiments shown in (B). The mature and immature bands were separately quantified on gels, and their relative amounts were calculated. Results are means (\pm SD) of at least three experiments. *** $P < 0.001$, compared to the wt.

ABCB4 mutants compared to the wt protein are shown in Fig. 3B. Quantification of the results showed that all mutants were similar to the wt protein and migrated predominantly as a mature form, with the exception of G536R for which the mature and immature forms were equally abundant (Fig. 3C). From these results, we concluded that none of the five point mutations impaired the intracellular processing of ABCB4 to the canalicular membrane, although the mature form of G536R may be less stable than normal.

PC SECRETION ACTIVITY OF ABCB4 MUTANTS AND EFFECT OF IVACAFTOR (VX-770)

Structure modeling of ABCB4-G535D, ABCB4-G536R, ABCB4-S1076C, ABCB4-S1176L, and ABCB4-G1178S predicted that their transport function would be altered, a possibility further supported by their normal canalicular localization. PC secretion activity of ABCB4 mutants was examined in the nonpolarized

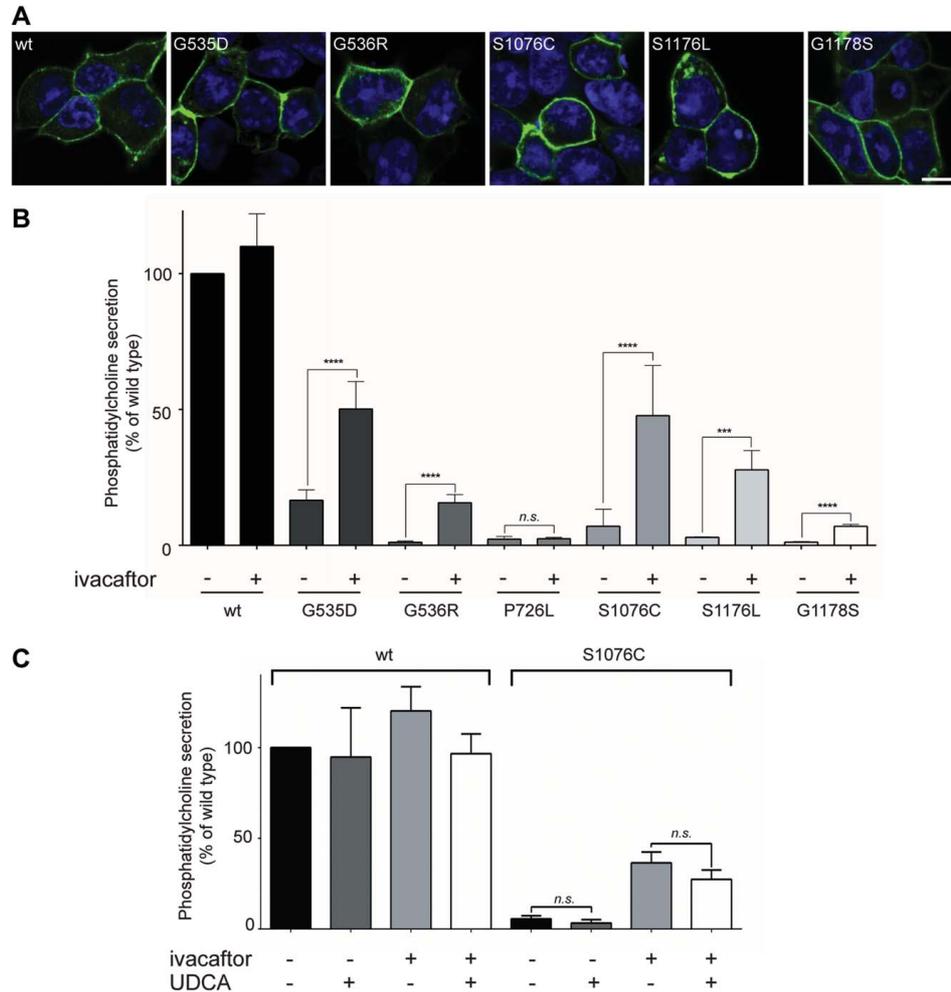


FIG. 4. PC secretion by ABCB4 mutants and effect of ivacaftor (VX-770). (A) Localization of ABCB4-wt and mutants in HEK293 cells. HEK293 cells transiently expressing ABCB4-wt or the mutants were fixed, permeabilized, and processed for immunofluorescence using the P3II-26 monoclonal antibody against ABCB4, followed by Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody. ABCB4-wt and the mutants are expressed at the plasma membrane. Nuclei are stained with Draq5 (in blue). Bar = 10 μ m. (B) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding ABCB4-wt or the mutants, and PC secretion was measured after 24 hours in the absence (-) or presence (+) of 10 μ mol/L of ivacaftor (VX-770). PC secretion was normalized to amounts of ABCB4-wt or mutant mature forms and expressed as a percentage of the secretion activity of ABCB4-wt. Results are means (\pm SD) of at least six independent experiments performed in triplicate. *** P < 0.001; **** P < 0.0001. (C) PC secretion activity was measured as in (B) after treatment of HEK293 cells 24 hours with 10 μ mol/L of ivacaftor (VX-770) alone or in combination with 50 μ mol/L of UDCA. Abbreviation: n.s., not significant.

epithelial HEK293 cells, which provide the best-suited model for such studies. PC secretion was measured in the culture medium after transient transfection, as described.⁽²⁴⁾ As in HepG2 cells, all mutants were localized predominantly at the plasma membrane (Fig. 4A). However, cells expressing the ABCB4 mutants released almost no PC compared to the cells expressing the wt protein (Fig. 4B). These results confirmed that, as predicted by structural modeling, disease-causing mutations in the ATP-binding sites of ABCB4 impaired the PC secretion activity of this transporter.

Considering the conservation of motifs between ABCB4 and CFTR/ABCC7 (Fig. 1 and Supporting Fig. S1), we hypothesized that ivacaftor, a potentiator of CFTR gating mutations, could also correct homologous mutations in ABCB4. Therefore, we tested the effect of ivacaftor on the PC secretion activity of ABCB4 mutants. HEK293 cells transiently expressing ABCB4-wt or the mutants were treated with 10 μ mol/L of ivacaftor (VX-770), for 24 hours. This concentration was previously validated for the rescue of CFTR G551D variant,⁽²⁰⁾ and we verified that it was not cytotoxic toward HEK293 cells (data not shown). Treatment with ivacaftor increased the PC secretion activity by 3-fold for ABCB4-G535D, 13.7-fold for ABCB4-G536R, 6.7-fold for ABCB4-S1076C, 9.4-fold for ABCB4-S1176L, and 5.7-fold for ABCB4-G1178S (Fig. 4B). These effects on activity are in line with those reported for CFTR/ABCC7⁽²⁰⁾ and indicate that the functional defect of ABCB4 mutants can be corrected by the CFTR potentiator, ivacaftor (VX-770). The effect of ivacaftor was also tested on another function-defective ABCB4 mutant located in the transmembrane domain of ABCB4, P726L⁽¹³⁾ (Fig. 1, left panel). In contrast to the studied mutants of the ATP-binding sites, ivacaftor was ineffective on the P726L mutant (Fig. 4B), suggesting selectivity of ivacaftor toward mutants located in the ATP-binding-sites. In addition, given that UDCA represents the only treatment in patients with ABCB4-related diseases, we tested whether the combination of treatments with ivacaftor and UDCA may increase the PC secretion activity of ABCB4. We performed this experiment on ABCB4-wt and ABCB4-S1076C mutant, which was the most responsive to ivacaftor. In our cell model, we found that treatment with UDCA had no effect on PC secretion activity of ABCB4 (Fig. 4C).

Discussion

In the present study, we show that five disease-causing variations in *ABCB4* (ABCB4-G535D, ABCB4-

G536R, ABCB4-S1076C, ABCB4-S1176L, and ABCB4-G1178S), all found in highly conserved amino-acid sequences of the LSGGQ signature and Walker A motif involved in ATP binding and hydrolysis, lead to a loss of ABCB4 function, which can be rescued by the clinically approved CFTR potentiator, ivacaftor (VX-770).

The G535D variation was identified in a heterozygous patient who developed cholelithiasis in adolescence, followed by ICP and biliary cirrhosis in adulthood (no. 1, Table 1), whose case was previously reported.⁽¹⁷⁾ Immunohistochemical staining of ABCB4 in liver biopsies from this patient previously showed the presence of ABCB4 at the canalicular membrane, which had suggested that ABCB4-G535D did not affect the targeting of the protein to the plasma membrane.⁽¹⁷⁾ In agreement with this observation, we found that ABCB4-G535D was detected at the canalicular membrane of HepG2 cells. The G536R variation was identified in 2 heterozygous patients, 1 with ICP (no. 2, Table 1)⁽¹⁸⁾ and the other with LPAC (no. 3, Table 1; this study); the S1076C variation was identified in a homozygous patient with PFIC3 who is on waiting-list for LT (no. 4, Table 1),⁽¹⁶⁾ and the S1176L and G1178S variants were identified in heterozygous patients with LPAC (nos. 5 and 6, Table 1; this study). Although efficiently targeted to the canalicular membrane of HepG2 cells, all these mutants displayed major activity defects. All were located in the two ATP-binding sites and therefore could affect ABCB4 transport function by interfering with ATP binding and/or hydrolysis.

Based on the analysis of sequence alignment (Supporting Fig. S1) and structure-function relationships between ABCB4 and CFTR/ABCC7, we found that among the five mutants, three (ABCB4-G536R, ABCB4-S1076C, and ABCB4-G1178S) had counterparts in CFTR (CFTR-G551D, CFTR-S1251N, and CFTR-G1349D, respectively; Fig. 1 and Supporting Fig. S1). In CFTR, these mutations have been classified as gating mutations that inactivate the opening of the channel and prevent transport of chloride anions.⁽¹⁹⁾ Interestingly, these CFTR mutants can be rescued by the CFTR potentiator, ivacaftor (VX-770).⁽¹⁹⁾ Ivacaftor (VX-770) is a clinically approved small molecule that was identified by high-throughput screening and that targets gating defects in disease-causing CFTR mutations, including G551D, S1251N, and G1349D. It was safe when used in CF patients harboring gating mutations. Treatment with ivacaftor (VX-770) leads to significant improvements in respiratory function in these patients.⁽³⁰⁾

So far, no specific therapeutic tool has been proposed for mutations that affect ABCB4 function. The fact that the five function-defective mutants of ABCB4 can be overcome by ivacaftor suggests that the specificity of this molecule is not restricted to CFTR/ABCC7, but rather to a common binding site involving the most conserved regions within ATP-binding sites or at the NBD1/NBD2 interface. The selectivity of ivacaftor (VX-770) toward mutants located in the ATP-binding sites is strengthened by the observation that this molecule did not rescue the P726L function-defective ABCB4 mutant, which is not involved in ATP binding or hydrolysis.

On the basis of 3D structure modeling, the mutations would cause steric hindrance or disrupt critical interactions for ATP binding (Fig. 2 and Supporting Fig. S2). This might interrupt ATP-induced NBD dimerization, as suggested for CFTR in several studies.^(31,32) Several theories have been proposed to explain the mechanism of CFTR-G551D defect and rescue by ivacaftor. It was shown that CFTR-G551D exhibited a thermal instability at 37°C, and that it was counteracted by ivacaftor.⁽³³⁾ Conversely, other studies have suggested an enhanced stability of the G551D protein, which would be diminished by ivacaftor.⁽³⁴⁾ Evidence was also provided to indicate that G551D converted ATP-binding site B into an inhibitory site,^(35,36) probably through electrostatic repulsion between the negative charges of the acidic residue and the ATP γ -phosphate. Irrespective of the consequence of G551D defect, ivacaftor could regulate the mutant stability through direct binding at the dimer interface⁽³⁷⁾ or through an allosteric mechanism.^(36,38,39)

Our findings provide the first experimental evidence making ivacaftor a potential therapeutic drug in patients with ABCB4 function deficiency attributed to mutations in the ATP-binding sites. So far, UDCA has been the only treatment in patients with ABCB4-related diseases and provided benefit essentially in patients with ICP or LPAC syndrome.⁽⁴⁰⁾ Although the mechanisms of UDCA actions are complex,⁽⁴¹⁾ its beneficial effect in patients with ABCB4-related diseases is mostly attributed to a decrease in the toxicity of bile acids in the absence of sufficient levels of PC in bile.⁽⁴⁰⁾ In most PFIC3 patients, such as patient no. 4 in this study, UDCA likely slows down disease progression, but does not avoid LT. Therefore, treatment with ivacaftor could provide a benefit in such patients. Whether the level of correction provided by ivacaftor is sufficient to be

clinically relevant requires confirmation by clinical trials. One can expect that it will be the case given that a small percentage of ABCB4 PC secretion activity might suffice to improve PFIC3 symptoms.⁽¹⁶⁾

Of all ABCB4 disease-causing variations, those in the ATP-binding domains that were herein investigated are restricted to one (private variations) or very few subjects from few families. However, beyond this limitation, the current findings pave the way for personalized medicine in genetic diseases; they also provide further evidence that the same drug could be effective toward several ABC transporters with homologous variations.

Acknowledgments: We thank Romain Morichon (UPMC and INSERM, UMS 30 LUMIC) for confocal microscopy imaging. We acknowledge Pierre Lehn (Université de Bretagne Occidentale, Brest, France) and Jean-Paul Mornon (UPMC, IMPMC) for their fruitful discussions and support during this study. We also thank Zakaria Omahdi for help in the initial phase of this work, Thomas Falguières (UPMC & INSERM, CDR Saint-Antoine) for critical reading of the manuscript, and Yves Chrétien (UPMC and INSERM, CDR Saint-Antoine) for his help with Adobe softwares.

REFERENCES

- 1) Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993;75:451-462.
- 2) Ruetz S, Gros P. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell* 1994;77:1071-1081.
- 3) Jacquemin E. Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: one gene for three diseases. *Semin Liver Dis* 2001;21:551-562.
- 4) Rosmorduc O, Hermelin B, Boelle PY, Parc R, Taboury J, Poupon R. ABCB4 gene mutation-associated cholelithiasis in adults. *Gastroenterology* 2003;125:452-459.
- 5) Degiorgio D, Colombo C, Scia M, Porcaro L, Costantino L, Zazzeron L, et al. Molecular characterization and structural implications of 25 new ABCB4 mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3). *Eur J Hum Genet* 2007;15:1230-1238.
- 6) Denk GU, Bikker H, Lekanne Dit Deprez RH, Terpstra V, van der Loos C, Beuers U, et al. ABCB4 deficiency: a family saga of early onset cholelithiasis, sclerosing cholangitis and cirrhosis and a novel mutation in the ABCB4 gene. *Hepatol Res* 2010;40:937-941.
- 7) Poupon R, Barbu V, Chamouard P, Wendum D, Rosmorduc O, Housset C. Combined features of low phospholipid-associated cholelithiasis and progressive familial intrahepatic cholestasis 3. *Liver Int* 2010;30:327-331.
- 8) Giovannoni I, Santorelli FM, Candusso M, Di Rocco M, Bellacchio E, Callea F, et al. Two novel mutations in African

- and Asian children with progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Dig Liver Dis* 2011;43:567-570.
- 9) **Dzaganian T, Engelmann G, Haussinger D, Schmitt L, Flechtenmacher C, Rtskhiladze I, et al.** The histidine-loop is essential for transport activity of human MDR3. A novel mutation of MDR3 in a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Gene* 2012;506:141-145.
 - 10) Poupon R, Rosmorduc O, Boelle PY, Chretien Y, Corpechot C, Chazouilleres O, et al. Genotype-phenotype relationships in the low-phospholipid-associated cholelithiasis syndrome: a study of 156 consecutive patients. *HEPATOLOGY* 2013;58:1105-1110.
 - 11) Sabirzhanova I, Lopes Pacheco M, Rapino D, Grover R, Handa JT, Guggino WB, et al. Rescuing trafficking mutants of the ATP-binding cassette protein, ABCA4, with small molecule correctors as a treatment for stargardt eye disease. *J Biol Chem* 2015;290:19743-19755.
 - 12) Gautherot J, Durand-Schneider AM, Delautier D, Delaunay JL, Rada A, Gabillet J, et al. Effects of cellular, chemical, and pharmacological chaperones on the rescue of a trafficking-defective mutant of the ATP-binding cassette transporter proteins ABCB1/ABCB4. *J Biol Chem* 2012;287:5070-5078.
 - 13) Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Dossier C, Falguieres T, Gautherot J, Davit-Spraul A, et al. A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *HEPATOLOGY* 2016;63:1620-1631.
 - 14) Gordo-Gilart R, Andueza S, Hierro L, Jara P, Alvarez L. Functional rescue of trafficking-impaired ABCB4 mutants by chemical chaperones. *PLoS One* 2016;11:e0150098.
 - 15) Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ. Structure of ABC transporters. *Essays Biochem* 2011;50:43-61.
 - 16) Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. The spectrum of liver diseases related to ABCB4 gene mutations: pathophysiology and clinical aspects. *Semin Liver Dis* 2010;30:134-146.
 - 17) Lucena JF, Herrero JI, Quiroga J, Sangro B, Garcia-Foncillas J, Zabalegui N, et al. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2003;124:1037-1042.
 - 18) Floreani A, Carderi I, Paternoster D, Soardo G, Azzaroli F, Esposito W, et al. Hepatobiliary phospholipid transporter ABCB4, MDR3 gene variants in a large cohort of Italian women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Dig Liver Dis* 2008;40:366-370.
 - 19) Yu H, Burton B, Huang CJ, Worley J, Cao D, Johnson JP, Jr., et al. Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *J Cyst Fibros* 2012;11:237-245.
 - 20) Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Cao D, Neuberger T, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18825-18830.
 - 21) Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med* 2010;363:1991-2003.
 - 22) Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Drevinek P, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 2011;365:1663-1672.
 - 23) Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, Chilvers MA, Howenstine MS, Munck A, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:1219-1225.
 - 24) Gautherot J, Delautier D, Maubert MA, Ait-Slimane T, Bolbach G, Delaunay JL, et al. Phosphorylation of ABCB4 impacts its function: insights from disease-causing mutations. *HEPATOLOGY* 2014;60:610-621.
 - 25) Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, et al. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 2002;10:139-149.
 - 26) Callebaut I, Eudes R, Mornon JP, Lehn P. Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modeling of the heterodimer. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:230-242.
 - 27) Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2000;29:291-325.
 - 28) Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Delautier D, Rada A, Gautherot J, Jacquemin E, et al. A missense mutation in ABCB4 gene involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 leads to a folding defect that can be rescued by low temperature. *HEPATOLOGY* 2009;49:1218-1227.
 - 29) Cantz T, Nies AT, Brom M, Hofmann AF, Keppler D. MRP2, a human conjugate export pump, is present and transports fluo 3 into apical vacuoles of Hep G2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;278:G522-G531.
 - 30) Kotha K, Clancy JP. Ivacaftor treatment of cystic fibrosis patients with the G551D mutation: a review of the evidence. *Ther Adv Respir Dis* 2013;7:288-296.
 - 31) Lewis HA, Buchanan SG, Burley SK, Connors K, Dickey M, Dorwart M, et al. Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* 2004;23:282-293.
 - 32) Xu Z, Pissarra LS, Farinha CM, Liu J, Cai Z, Thibodeau PH, et al. Revertant mutants modify, but do not rescue, the gating defect of the cystic fibrosis mutant G551D-CFTR. *J Physiol* 2014;592:1931-1947.
 - 33) Liu X, Dawson DC. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiators protect G551D but not DeltaF508 CFTR from thermal instability. *Biochemistry* 2014;53:5613-5618.
 - 34) Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, Esther CR, Jr., Das J, Dokholyan NV, et al. Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of DeltaF508 CFTR in cystic fibrosis. *Sci Transl Med* 2014;6:246ra296.
 - 35) Jih KY, Hwang TC. Vx-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:4404-4409.
 - 36) Lin WY, Jih KY, Hwang TC. A single amino acid substitution in CFTR converts ATP to an inhibitory ligand. *J Gen Physiol* 2014;144:311-320.
 - 37) Moran O, Galiotta LJ, Zegarra-Moran O. Binding site of activators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the nucleotide binding domains. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:446-460.
 - 38) Eckford PD, Li C, Ramjeesingh M, Bear CE. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *J Biol Chem* 2012;287:36639-36649.
 - 39) Mornon JP, Hoffmann B, Jonic S, Lehn P, Callebaut I. Full-open and closed CFTR channels, with lateral tunnels from the cytoplasm and an alternative position of the F508 region, as revealed by molecular dynamics. *Cell Mol Life Sci* 2015;72:1377-1403.

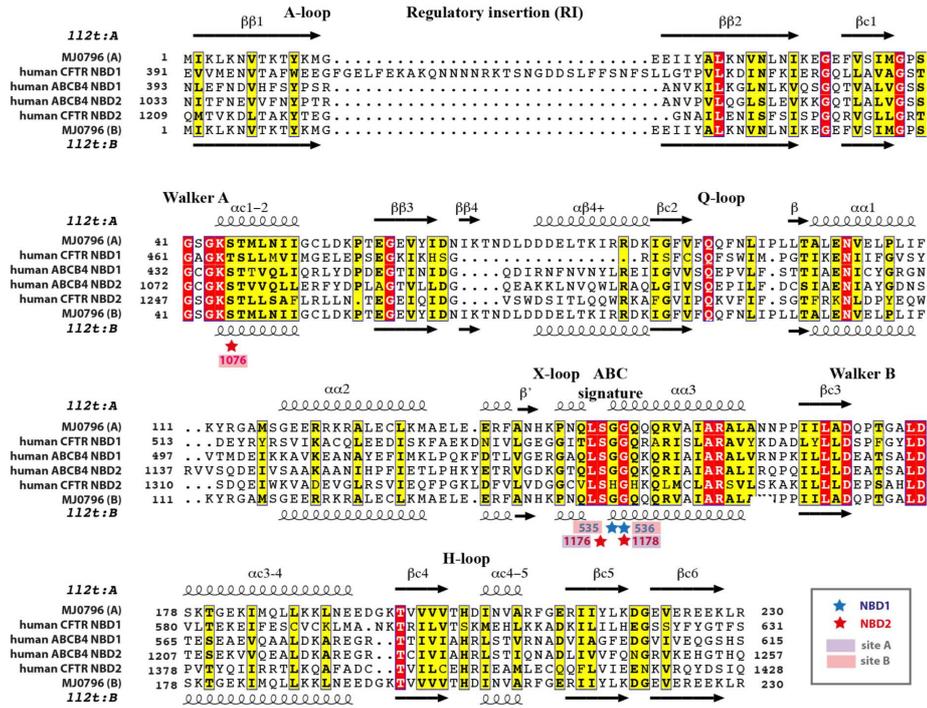
- 40) Poupon R. Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36(Suppl 1):S3-S12.
- 41) Beuers U, Trauner M, Jansen P, Poupon R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond. *J Hepatol* 2015;62(1 Suppl):S25-S37.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Supporting Information

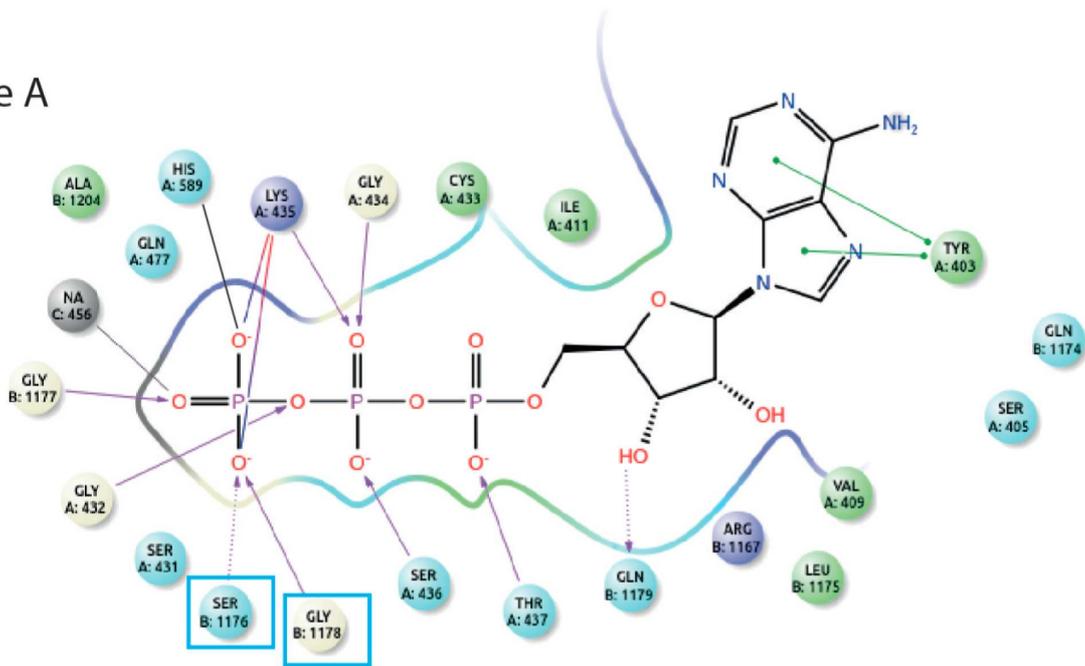
Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.28929/supinfo.

Supporting Figure 1, Delaunay et al.,

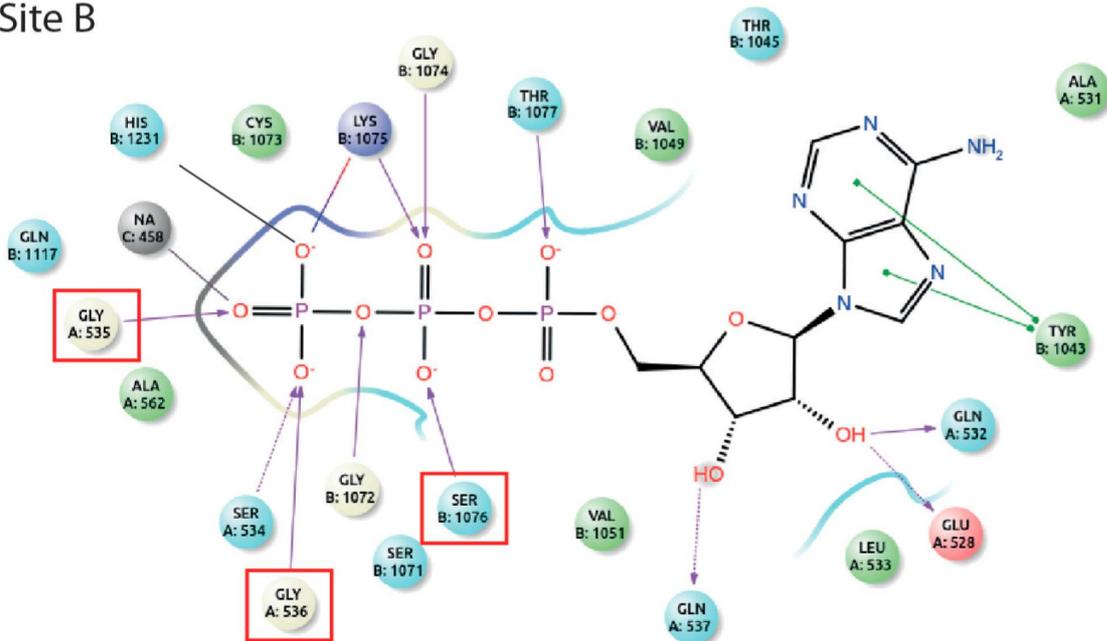


Supporting Fig.1. Alignment of the sequences of the nucleotide-binding domains NBD1 and NBD2 of CFTR (ABCC7, UniprotP13569), ABCB4 (MDR3 – isoform 2, UniprotP21439-2) and MJ0796 (pdb 1L2T). The 3D structure of MJ0796 has served as a template for the modeling of the NBD1:NBD2 heterodimer of ABCB4. The positions of the mutations studied here are highlighted with stars, on a colored background.

Site A



Site B



Supporting Fig.2. Interaction maps of ATP molecules with residues within the two ATP-binding sites of human ABCB4. The mutated residues studied here are boxed.

Supplementary Table 1. Human ABCB4 transcript variant A mutagenesis primers

<i>Primer name</i>	<i>Primer location</i>	<i>Primer sequence 5'→3'</i>	<i>Mutated nucleotide</i>	<i>Mutant amino-acid</i>
Mut 535F	Exon 14	GCCCAGCTGAGTG <u>A</u> TGGGCAGAAGCAG	c. 1604 G>A	G535D
Mut 535R	Exon 14	CTGCTTCTGCCCA <u>I</u> CACTCAGCTGGGC	c. 1604 G>A	G535D
Mut 536F	Exon 14	GCCCAGCTGAGTGGT <u>A</u> GGCAGAAGCAGA	c.1606 G>A	G536R
Mut 536R	Exon 14	TCTGCTTCTGCC <u>I</u> ACCACTCAGCTGGGC	c.1606 G>A	G536R
Mut 1076F	Exon 25	GGCTGTGGGAAG <u>I</u> GCACGGTGGTCC	c.3228 A>T	S1076C
Mut 1076R	Exon 25	GGACCACCGTG <u>C</u> ACTTCCACAGCC	c.3228 A>T	S1076C
Mut 1176F	Exon 27	AGATAAGGGGACTCAGCTC <u>T</u> IAGGAGGTCAAAAAC	c.3527 C>T	S1176L
Mut 1176R	Exon 27	GTTTTTGACCTCCT <u>A</u> AGAGCTGAGTCCCTTATCT	c.3527 C>T	S1176L
Mut 1178F	Exon 27	GGACTCAGCTCTCAGGA <u>A</u> GTCAAAAACAGAGGATT	c.3532 G>A	G1178S
Mut 1178R	Exon 27	AATCCTCTGTTTTGAC <u>I</u> TCTGAGAGCTGAGTCC	c.3532 G>A	G1178S

The underlined nucleotide in the sequence of primers is the mutated base. F represents forward; R, reverse. Mutated nucleotide corresponds to the cDNA of the NM_000443.3 (ABCB4, transcript variant A, mRNA).

Deuxième partie

Étude du rôle fonctionnel de l'interaction d'ABCB4 avec la kinase MRCK α

Le domaine N-terminal d'ABCB4 contient de nombreuses sérines et thréonines phosphorylables ainsi qu'une zone riche en lysines et arginines chargées positivement, qui pourrait constituer une zone d'interaction avec des partenaires protéiques. Notre équipe a montré pour la première fois l'implication des kinases PKA et PKC dans la phosphorylation de certains de ces résidus sérines et thréonines *in vitro* (Gautherot 2014).

Au cours d'un crible double-hybride, la sérine-thréonine kinase MRCK α a été identifiée comme partenaire du domaine N-terminal d'ABCB4. La deuxième partie de mon travail de thèse vise à comprendre le rôle de cette interaction. La stratégie expérimentale a consisté à étudier les conséquences de l'inhibition (mutant dominant négatif, inhibiteur pharmacologique) ou de l'extinction (RNA interférent, CRISPR-Cas9) de l'expression protéique de la kinase MRCK α sur l'expression membranaire et l'activité d'ABCB4 dans des modèles cellulaires. Nous avons montré que la kinase MRCK α joue un rôle dans la régulation de l'expression membranaire d'ABCB4 en contrôlant son internalisation depuis la membrane plasmique. Les résultats de cette partie sont présentés sous forme d'un manuscrit en cours de finalisation en vue d'une soumission pour publication. Des résultats décrivant l'impact de l'extinction de l'expression de la kinase MRCK α sur les mutants de classe IV (mutants instables) d'ABCB4 sont présentés sous forme de résultats complémentaires.

-Manuscrit en préparation-

The Serine/Threonine Kinase MRCK-alpha binds ABCB4 and Regulates Its Plasma Membrane Internalization

Alix Bruneau,¹ Jean-Louis Delaunay,¹ Anne-Marie Durand-Schneider,¹ Virginie Vauthier,¹ Amel Ben Saad,¹ Romain Morichon,² Thomas Falguières,¹ Jérémie Gautheron,¹ Chantal Housset,^{1,3} and Tounsia Aït-Slimane*

¹ Inserm, Sorbonne Université, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), UMR_S 938, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), F-75012 Paris, France.

² Sorbonne Université, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), UMS_37

³Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Centre de Référence des Maladies Rares - Maladies Inflammatoires des Voies Biliaires & Service d'Hépatologie, F-75012 Paris, France.

***Corresponding author:** tounsia.ait-slimane@inserm.fr

Authors contribution: Conceived and designed the study: A.B., J.L.D. and T.A.S. Performed the experiments: A.B., J.L.D., A.M.D.S. and T.A.S. Analysed the data and provided intellectual contribution. A.B., J.L.D., J.G., C.H., T.F., R.M., A.B.S., V.V and T.A.S. wrote the manuscript: A.B. and T.A.S.

Funding: This work was supported by grants from the association Mucoviscidose-ABCF2 and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE14-0008-01). A.B received a fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” and from FRM « Fondation pour la recherche médicale »

Conflict of interest declaration: The authors have no conflict of interest to declare.

ABSTRACT

ABCB4 also called MDR3 is an ATP-binding cassette transporter localized at the canalicular membrane of hepatocytes that plays a critical role in bile formation by mediating phosphatidylcholine excretion. Mutations that affect trafficking or activity of ABCB4 are associated with several biliary diseases, including progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3), which develops early in childhood and for which liver transplantation is often the only effective therapy. Thus, elucidating molecular mechanisms underlying trafficking of ABCB4 to and from the canalicular membrane can provide critical insight into the development of alternative therapies. A yeast two-hybrid screen of human liver cDNA library identified the serine/threonine kinase Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase isoform α , MRCK α , as a binding partner of the N-terminal domain of ABCB4. The interaction was confirmed by co-immunoprecipitation in co-transfected HEK293 cells. MRCK α colocalized with ABCB4 in HepG2 cells. Here we examine the functional role of the interaction of ABCB4 and MRCK α . Expression of a dominant-negative MRCK α mutant or its inhibition by chelerythrine chloride led to a significant increase of ABCB4 steady-state expression in freshly isolated human hepatocytes and HEK293 cells. RNA interference or CRISPR-cas9 knockout of MRCK α also caused a significant increase in the level of ABCB4 protein expression. Overexpression of MRCK α in MRCK α knockout cells rescued the MRCK α phenotype and led to a decrease of ABCB4 cell surface expression. These findings suggest that MRCK α regulates ABCB4 membrane expression by inducing its retrieval from the plasma membrane.

INTRODUCTION

The ATP-binding cassette transporter ABCB4, also called MDR3 (multidrug resistance 3) is functionally expressed in hepatocytes, where it mediates ATP-dependent translocation of the membrane phospholipid phosphatidylcholine (PC) from the inner leaflet to the outer leaflet of the hepatocyte canalicular membrane (Ruetz 1994, Smit 1993). PC secreted into bile forms mixed micelles with bile acids and cholesterol, thereby preventing the formation of cholesterol gallstones and the detergent activity of free bile acids (Borst 2000, Wang 2009). ABCB4 deficiency causes progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3), a rare autosomic recessive disease occurring early in childhood that may be lethal in the absence of liver transplantation (Jacquemin 2001), and other cholestatic or cholelithiasic diseases in heterozygous adults (Davit-Spraul 2010, Geenes 2009, Rosmorduc 2001).

More than 500 ABCB4 variations have been identified to date, with different effects on the expression, intracellular traffic and/or activity of ABCB4 (Bruneau 2017, Delaunay 2009, Delaunay 2015, Gautherot 2014). Targeting ABCB4 to the canalicular membrane is essential for its function; however, very little is known regarding molecular partners that bind ABCB4 and specifically regulate its trafficking to and from the canalicular membrane and/or PC secretion activity. ABCB4 has two halves, each consisting of six membrane-spanning domains and a nucleotide binding domain, joined by a linker region (Zolnerciks 2011). HS1-associated protein X-1 (HAX-1) and myosin II regulatory light chain (MLC2) were identified as direct binding partners of the linker domain of all three ABCB1 (MDR1), ABCB4 and ABCB11 (BSEP). HAX-1 and MLC2 have been involved in clathrin-mediated endocytosis and apical trafficking of ABCB11, respectively (Chan 2005, Ortiz 2004). However, the role of these molecules in the apical trafficking and recycling of ABCB4 has not been investigated. We showed that the stability and fate of ABCB4 after reaching the canalicular membrane requires

a carboxyl-terminal PDZ-like motif (QNL) that binds the PDZ domain protein NHERF/EBP50 (Venot 2016).

The N-terminal domain of ABCB4, consisting of 54 amino acids, is poorly conserved with other ABC transporters. It contains several charged amino acids and potential phosphorylation sites of serine and threonine, suggesting that this is a region of protein interaction, particularly with protein kinases. We previously showed that phosphorylation of the N-terminal domain of ABCB4 regulated ABCB4-mediated PC secretion (Gautherot 2014).

By using a yeast two-hybrid screening with the N-terminus of ABCB4 against a human liver cDNA library, we identified the serine/threonine kinase Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase isoform α , MRCK α (also called Cdc42-BPA for Cdc42-binding protein A) as a binding partner of ABCB4. MRCK α protein is serine/threonine kinase that is part of the AGC (PKA, PKG and PKC) kinase family (Pearce 2010). MRCK α is a downstream effector of the GTPase-Cdc42 that play key roles in actin-myosin regulation (Unbekandt 2014, Wilkinson 2005, Zhao 2015).

In the present study, we confirm that MRCK α binds to ABCB4 *in vitro*. We present evidence indicating that MRCK α regulates ABCB4 membrane expression by controlling its internalization from the plasma membrane.

RESULTS

MRCK α Binds the N-Terminal Domain of ABCB4. The N-terminal domain of ABCB4 is poorly conserved with other ABC transporters, suggesting that it may have a specific role. Moreover, it contains several charged amino acids and potential phosphorylation sites of serine and threonine, suggesting that this is a region of protein interaction, particularly with protein kinases (Fig. 1A). A yeast two-hybrid screen of human liver library, which used the human ABCB4 N-terminal domain as bait, resulted in isolation of the serine/threonine kinase MRCK α as a partner of ABCB4. By immunofluorescence, ABCB4 and MRCK α colocalized at the canalicular membrane in ABCB4-expressing HepG2 cells (Fig. 1B). To determine if ABCB4 forms a protein complex with MRCK α , we co-transfected HEK293 cells with plasmids expressing ABCB4 and GFP-tagged MRCK α . The cell lysates were then incubated with anti-GFP-agarose beads, and the precipitates were analyzed by immunoblotting with antibody against ABCB4. As shown in Fig. 1C, ABCB4 co-precipitated together with GFP-MRCK α from co-transfected HEK293 cells. These results demonstrated that the serine/threonine kinase MRCK α associates with ABCB4.

Effect of MRCK α Silencing on ABCB4 Expression. The functional interaction of ABCB4 with MRCK α was evaluated after knocking-down of MRCK α by synthetic siRNA in ABCB4-expressing HEK293 cells. As shown by western blot analysis (Fig. 2A and 2B), 72 hours after siRNA transfection, the level of endogenous MRCK α protein was reduced by 80% in ABCB4-expressing HEK293 cells. Decreased expression of MRCK α led to a marked increase of ABCB4 up to 3-fold, in HEK293 cells transfected with MRCK α siRNA relative to cells transfected with control scramble siRNA (Fig. 2A and 2C). By immunofluorescence, silencing of MRCK α also increased the plasma membrane staining of ABCB4 (Fig. 2D and 2E). We

checked by real-time RT-qPCR whether MRCK α depletion had an impact on ABCB4 mRNA level. We found no significant change in ABCB4 mRNA level (Fig. 2F), thus, it can be inferred that MRCK α is not involved in the regulation of ABCB4 transcription. Overall, these data provide evidence for the role of MRCK α in regulating the plasma membrane expression of ABCB4.

Inhibition of the Kinase Activity of MRCK α Increases ABCB4 Expression. To determine whether MRCK α regulates ABCB4 expression through its kinase activity, we treated ABCB4-transfected HEK293 cells with the MRCK α inhibitor chelerythrine chloride (Tan 2011). Immunoblot revealed that ABCB4 levels increased upon inhibition of MRCK α (Fig. 3A). Compared to the untreated condition, ABCB4 expression was increased to 150% (Fig. 3B). Interestingly, the expression of ABCB4 was also increased in freshly isolated human hepatocytes treated for 0-180 min with chelerythrine chloride (Fig. 3C and 3D). These experiments showed that MRCK α regulates the expression of ABCB4 both *in vitro* and *ex vivo*. To further demonstrate the specificity of MRCK α inhibition on the expression of ABCB4, a dominant-negative approach that consisted in overexpressing Flag-tagged MRCK α -kinase-dead (MRCK α -KD-Flag) was used. This construct was transiently transfected in ABCB4-expressing HEK293 cells and its effect was evaluated by western blotting. The expression of ABCB4 was strongly increased in cells transfected with MRCK α -KD-Flag as compared to cells transfected with a control vector (Fig. 3A). Quantification of western blots showed that the expression of ABCB4 was increased to ~200% in cells transfected with MRCK α -KD-Flag (Fig. 3B). We inferred from these results that ABCB4 expression can be regulated by the kinase activity of MRCK α .

MRCK α Knockout Increases Specifically the Expression of ABCB4 at the Plasma

Membrane. In a further demonstration of the involvement of MRCK α in the expression of ABCB4, we generated MRCK α knockout (KO) cell line using the CRISPR-cas9 gene editing system (Ran 2013). Fig. 4A shows that the expression of MRCK α protein was abolished in HEK293 cells by western blotting, indicating that MRCK α knockout cell line was successfully established by the CRISPR-cas9 system. Immunoblots revealed that the steady-state level of ABCB4 was significantly increased in MRCK α knockout cells (Fig. 4A). Quantification of western blots showed that the expression of ABCB4 was increased to ~400% (4B). The effect of MRCK α knockout was also studied by immunofluorescence, Fig. 4C shows that MRCK α KO cells displayed higher fluorescence intensity of ABCB4 compared to control cells. These results demonstrate that MRCK α plays a role in the regulation of the ABCB4 expression. To determine whether the effect of MRCK α was specific to ABCB4, MRCK α knockout or control HEK293 cells were transiently transfected with a DNA construct encoding the human dipeptidylpeptidase IV and tagged with GFP (DPPIV-GFP), a canalicular membrane protein (Ait-Slimane 2009). As shown in Fig. 4D and 4E, the expression of DPPIV-GFP was not affected in MRCK α KO cells as compared to control cells. These data suggest that MRCK α increases specifically the expression of ABCB4.

Transient Expression of MRCK α Rescues the MRCK α Phenotype.

Because MRCK α knockout cells showed a significant increase of ABCB4 expression, we examined whether the overexpression of MRCK α can rescue the expression level of ABCB4 comparable to control cells. MRCK α KO cells were transfected with a plasmid encoding full-length MRCK α cDNA. Immunoblots and quantification of western blots showed that the expression of ABCB4 decreased from 400% to 100% and thus returned to a level comparable to control

cells (Fig. 5A and 5B). These results demonstrate that overexpression of MRCK α can rescue MRCK α knockout phenotype.

Additional experiments were performed to determine whether MRCK α was involved in the internalization and the recycling of ABCB4 by allowing its endocytosis. We compared the membrane staining of ABCB4 in MRCK α knockout cells to that of MRCK α knockout cells overexpressing MRCK α . For these experiments, we used HEK293 cells stably transfected with an ABCB4 construct bearing a triple myc-tag (3xmyc) in the first extracellular loop. This allowed specific labeling of ABCB4 localized at the plasma membrane of non-permeabilized cells (Venot 2016). MRCK α knockout HEK293 expressing 3xmyc-ABCB4 or MRCK α knockout HEK293 expressing 3xmyc-ABCB4 transiently transfected with MRCK α plasmid encoding full-length MRCK α cDNA, were incubated with an anti-myc antibody at 0°C to allow binding of the antibody to the ABCB4 molecules expressed at the cells surface. After 60 minutes, the cells were fixed, permeabilized and incubated with a fluorescently labeled an Alexa-Fluor 594-conjugated secondary antibody. Quantification of the fluorescence of ABCB4 at the plasma membrane showed that the intensity was reduced by 35% in MRCK α knockout cells overexpressing MRCK α (Fig. 5C). Overall, these data provide evidence that MRCK α regulates membrane expression of ABCB4 by controlling its membrane recycling.

DISCUSSION

Although localization of the phospholipid transporter ABCB4 at the canalicular membrane is essential for exerting its function, the molecular mechanisms that regulate its cell surface expression are poorly known. We previously reported that canalicular membrane stability of ABCB4 is regulated by the interaction of its C-terminus PDZ-like motif with the scaffold protein EBP50 (Venot 2016). The N-terminal domain of ABCB4 contains several serines and threonines that are potential targets for protein kinases. In the present study, we performed yeast two-hybrid screen with the N-terminal domain of ABCB4 against human liver cDNA library and identified the serine/threonine kinase Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase isoform α , MRCK α , as a binding partner of ABCB4. The interaction between ABCB4 and MRCK α was confirmed by co-immunoprecipitation in HEK293 cells. The role of this interaction was examined after inhibition or depletion of MRCK α *in vitro* in HEK293 cells. The role for MRCK α in ABCB4 membrane expression was further verified *ex vivo* in freshly isolated human hepatocytes. Our results suggest that MRCK α plays a role in ABCB4 retrieval from the plasma membrane. The strongest evidence in favor of this hypothesis is the reversal of MRCK α -induced membrane accumulation of ABCB4 after overexpression of MRCK α in MRCK α knockout cells.

The increase of ABCB4 expression in MRCK α knockout cells could be due to either a stimulation of its intracellular traffic to the plasma membrane, or to an inhibition of its retrieval and recycling from the plasma membrane. The absence of intracellular labelling of ABCB4 after depletion of MRCK α as well as the significant decrease in ABCB4 surface labelling after overexpression of MRCK α in MRCK α knockout cells suggest that MRCK α would likely be involved in the internalization of ABCB4 from the plasma membrane. Future studies will aim at clarifying the mechanism by which MRCK α regulates ABCB4 membrane retrieval. There

are two possibilities. First, a direct effect of MRCK α which phosphorylates ABCB4 and thus, allows its internalization. Second, MRCK α operates indirectly by phosphorylating its target, the myosin-II regulatory light chain (MLC2) as indicated in previous reports (Tan 2001, Wilkinson 2005), resulting in ABCB4 internalization from the canalicular membrane. Interestingly, it has been shown that MLC2 binds to the linker domain -the region that separates the two halves of ABC transporters- of bile acids transporter (BSEP, ABCB11), MDR1 (ABCB1) and MDR2 (MDR3/ABCB4 in human) (Chan 2005). We may thus speculate that phosphorylation of MLC2 by MRCK α could regulate the retrieval of ABCB4 from the canalicular membrane. This speculation is not in agreement with what was shown by Chan et al. who showed that expression of a dominant negative, non-phosphorylatable MLC2 mutant severely impaired delivery of newly synthesized BSEP to the apical surface of polarized Madin-Darby canine kidney cells (MDCK), indicating that MLC2 is required for BSEP trafficking to the apical surface (Chan 2005). This discrepancy may be due to different internalization molecular mechanisms for ABCB4 and ABCB11. Indeed, ABCB11 possesses a tyrosine motif in its cytoplasmic tail, which interacts with the adaptor protein AP2, and allows internalization and recycling of ABCB11 (Hayashi 2013, Lam 2012). ABCB4 does not contain such a motif, suggesting that its internalization occurs through a distinct mechanism. The role for MRCK α in MLC2 phosphorylation and ABCB4 membrane expression are currently under investigation in our laboratory. The internalized ABCB4 may be subject to degradation, alternatively, it may also recycle back to the canalicular membrane.

In agreement of what we saw for ABCB4, Cantore et al. have reported that the Src family kinase Fyn induced MRP2 and BSEP retrieval from the canalicular membrane, probably by increasing cortactin phosphorylation (Cantore 2011). In HUH-NTCP cells, Schonhoff et al. observed that tauroolithocholate-induced MRP2 retrieval from the membrane involved the phosphorylation of a membrane-bound F-actin crosslinking protein, MARCKS by protein kinase C ϵ . They showed

that in HUH-NTCP cells transfected with phosphorylation deficient MARCKS, taurothiocholate failed to decrease plasma membrane-MRP2 (Schonhoff 2013). Finally, in the same way, Chai et al. has reported that activation of liver protein kinase Cs lead to Ezrin Thr567 phosphorylation resulting in MRP2 internalization (Chai 2015). Understanding the molecular regulation of ABCB4 expression may help to develop targeted therapies for PFIC3 patients.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and Reagents

The monoclonal P3II-26 anti-ABCB4 antibody was obtained from Enzo Life Science (Villeurbanne, France). Rabbit polyclonal anti-MRCK α was from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Monoclonal anti-myc and anti-tubulin antibodies were from ThermoFisher (Cergy-Pontoise, France) and ProteinTech (Manchester, United Kingdom) respectively. Alexa Fluor-labeled secondary antibodies, DRAQ5 fluorescent probe and culture media were from Invitrogen-ThermoFisher (Cergy-Pontoise, France) and peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Rockland Immunochemicals (Gilbersville, PA). The control siRNA “ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool” and MRCK α siRNA “ON-TARGETplus Human CDC42BPA siRNA SMARTpool” were from Dharmacon-GE Healthcare (Fontenay-sous-Bois, France). The ECL-Prime detection kit was from VWR (Courtaboeuf, France). The transfection reagents Turbofect and JetPrime were purchased from ThermoFisherScientific, (Saint-Herblain, France) and Ozyme (Saint-Cyr-l’Ecole, France) respectively. Chelerythrine chloride used for treatment was obtained from Enzo Life Science (Villeurbanne, France)

Yeast two-hybrid screen

Screening with the N-terminal domain of ABCB4 against a human liver cDNA library was performed at Hybrigenics Services per their standard protocols.

DNA Constructs

The construction of the human wild type ABCB4 (ABCB4-wt), isoform A in the pcDNA3 vector has been previously described (Delaunay 2009). The construction of the human triple c-myc tag ABCB4-wt (3xmyc-ABCB4-wt) has been previously described (Venot 2016). The

constructs of the human MRCK α , MRCK α -wt-GFP, MRCK α -KD-Flag were provided by P. A. Gagliardi from L. Primo laboratory (Laboratory of Cell Migration, Candiolo Cancer Institute FPO-IRCCS, Candiolo 10060, Italy) and produced as described in (Gagliardi 2014). All constructs were verified by automated sequencing.

Quantitative reverse-Transcription Polymerase chain Reaction

Stably expressing Abcb4-wt HEK293 cells were transfected with 75pmol/1mL MRCK α siRNA or 75pmol/1mL control siRNA as described. 72 hours after the first transfection, total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit from Qiagen (Courtaboeuf, France). 200 U of M-MLV synthesized cDNA from 1 μ g of total RNA as recommended (Life Technologies). Quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed using the LightCycler 480 Sybr green I Master (Roche) on a Lightcycler 96 (Roche) device, with HPRT as a reference gene. Primers are described in Supplemental Table 1.

CRISPR Cas9 Experiments

The pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmid containing the human codon optimized SpCas9 gene with 2A-EGFP and the backbone of sgRNA was used according to Feng Zhang Lab CRISPR plasmid instructions (Ran 2013). sgRNA were designed using CRISPR Design Tool from Dharmacon targeting exon 1 of MRCK α . Sequence of primers Eurogentec (Angers, France) hybridized and cloned in PX458 using BbsI were MRCK α -Hs-1S 5'3'Trq (CACCGGGGCCCGCTCAGACCAAT) and MRCK α -Hs-1AS 5'3'Trq (AAACATTGGTCTGAGCGGGCCCC). Constructs were verified by automated sequencing. (HEK) 293 cells were co-transfected with a mix of 2.75 μ g of PX458-MRCK α and 0.25 μ g PEGFPN-3 with 6 μ l of Turbofect and neomycin resistant cells were selected after 8 days of culture with 400 μ g/ml of G418.

Cell Culture, Transfection and Immunoanalysis

Hepatocellular carcinoma, human HepG2 and Human embryonic kidney HEK293 cells were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) as previously reported (Gautherot 2014). The stably expressing ABCB4-wt (HEK) 293 cells were obtained as described (Delaunay 2016).

ABCB4-wt, MRCK α -wt or -KD encoding vectors were transiently transfected in HEK293 cells as published (Delaunay 2009, Gautherot 2014). Immunofluorescence and immunoblotting analyses were performed as described.

Hepatocytes isolation was realised by the Human HepCell platform (ICAN, Paris, France) <http://www.ican-institute.org/category/plateformes> according to the previously described protocol (Aoudjehane 2016). Hepatocytes were treated with 20 μ M of chelerythrine chloride for 30 to 180 minutes.

Coimmunoprecipitation and Western Blotting

For the coimmunoprecipitation of ABCB4 and MRCK α , (HEK) 293 cells were cotransfected with plasmids expressing ABCB4 and GFP-tagged MRCK α . 24h after transfection, cells were lysed on ice for 30 min in TNE-Triton (Tris 20mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM (pH 7.4)) in the presence of a protease inhibitor mixture from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Lysates were centrifuged at 12,000 \times g for 15 min to remove insoluble materials. Immunoprecipitation was performed overnight with 1 mg of lysate protein and 2 μ L of the monoclonal anti-GFP preadsorbed onto Proteine A-Sepharose beads (VWR) for 2h at 4 °C. Samples were denatured in Laemmli sample buffer for 30 min at 37 °C and run on 7,5% SDS-polyacrylamide gels. Immunoblotting was performed using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Development of peroxidase activity was performed with the ECL Prime detection kit.

Electrophoresis and immunoblotting were performed as described, (Delaunay 2009) using the monoclonal P3II-26 anti-ABCB4 antibody from Enzo Life Science (Villeurbanne, France), rabbit-polyclonal anti-MRCK α antibody from Euromedex (Souffelweyersheim, France) and peroxidase-conjugated secondary antibodies from Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA). Immunoblotting of tubulin with a monoclonal antibody from ProteinTech (Manchester, United Kingdom) was also performed as a loading control. Blot exposure times were within the linear range of detection, and signal intensities were quantified using ImageJ software.

RNA Interference

Stably expressing Abcb4-wt HEK293 cells were transfected with 75pmol/1mL MRCK α siRNA or 75pmol/1mL control siRNA by incubation in the presence of JetPrime following the manufacturer's instructions. The effect of the siRNA was analysed 72 hours after the first transfection, 48h after the second, two transfections were necessary to silence MRCK α efficiently.

Cell Surface Staining

HEK-CTL cells or HEK-CRISPR-Cas9-MRCK α cells (HEK-KO) were transfected with 3xmyc-ABCB4-wt. 24h after transfection, the cells were washed three times with HEPES-buffered (20 mmol/L, pH 7.0) serum-free medium (HSFM). Cell surface antigens were labeled at 0°C for 30 minutes with conjugated monoclonal anti-myc antibody, diluted in HSFM/0.2% BSA. After surface labeling, cells were extensively washed with HSFM/0.2% BSA, fixed and fluorescence was examined by confocal microscopy. Signal intensities were quantified using ImageJ software.

Statistical Analysis

The Student t test was used for comparisons. $P < 0.05$ was considered significant.

Acknowledgements

We Thank Thomas Leung (Institute of Molecular & Cell Biology, Singapore) and Paolo Armando Gagliardi (University of Torino) for the generous gift of cDNAs. We are grateful to Michèle Maurice for her fruitful discussions and support during this study. We also thank Lynda Aoudjehane (Human HepCell) who provided preparations of human hepatocytes, Haquima El Mourabit for the help with RT-PCR experiments and Yves Chrétien (UPMC) for his help with Adobe softwares.

1. Ait-Slimane T, Galmes R, Trugnan G, Maurice M. Basolateral internalization of GPI-anchored proteins occurs via a clathrin-independent flotillin-dependent pathway in polarized hepatic cells. *Mol Biol Cell*. 2009;20(17):3792-800.
2. Aoudjehane L, Boelle PY, Bisch G, Delelo R, Paye F, Scatton O, et al. Development of an in vitro model to test antifibrotic drugs on primary human liver myofibroblasts. *Lab Invest*. 2016;96(6):672-9.
3. Borst P, Zelcer N, van Helvoort A. ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1486(1):128-44.
4. Bruneau A, Delaunay JL, Hoffmann B, Durand-Schneider AM, Barbu V, Jacquemin E, et al. Functional defect of variants in the adenosine triphosphate-binding sites of ABCB4 and their rescue by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator, ivacaftor (VX-770). *Hepatology*. 2017;65(2):560-70.
5. Cantore M, Reinehr R, Sommerfeld A, Becker M, Haussinger D. The Src family kinase Fyn mediates hyperosmolarity-induced Mrp2 and Bsep retrieval from canalicular membrane. *J Biol Chem*. 2011;286(52):45014-29.
6. Chai J, Cai SY, Liu X, Lian W, Chen S, Zhang L, et al. Canalicular membrane MRP2/ABCC2 internalization is determined by Ezrin Thr567 phosphorylation in human obstructive cholestasis. *J Hepatol*. 2015;63(6):1440-8.
7. Chan W, Calderon G, Swift AL, Moseley J, Li S, Hosoya H, et al. Myosin II regulatory light chain is required for trafficking of bile salt export protein to the apical membrane in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. 2005;280(25):23741-7.
8. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. The spectrum of liver diseases related to ABCB4 gene mutations: pathophysiology and clinical aspects. *Semin Liver Dis*. 2010;30(2):134-46.
9. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Delautier D, Rada A, Gautherot J, Jacquemin E, et al. A missense mutation in ABCB4 gene involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 leads to a folding defect that can be rescued by low temperature. *Hepatology*. 2009;49(4):1218-27.
10. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Dossier C, Falguieres T, Gautherot J, Anne DS, et al. A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Hepatology*. 2016.
11. Gagliardi PA, di Blasio L, Puliafito A, Seano G, Sessa R, Chianale F, et al. PDK1-mediated activation of MRCKalpha regulates directional cell migration and lamellipodia retraction. *J Cell Biol*. 2014;206(3):415-34.
12. Gautherot J, Delautier D, Maubert MA, Ait-Slimane T, Bolbach G, Delaunay JL, et al. Phosphorylation of ABCB4 impacts its function: insights from disease-causing mutations. *Hepatology*. 2014;60(2):610-21.
13. Geenes V, Williamson C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J Gastroenterol*. 2009;15(17):2049-66.
14. Hayashi H, Sugiyama Y. Bile salt export pump (BSEP/ABCB11): trafficking and sorting disturbances. *Curr Mol Pharmacol*. 2013;6(2):95-103.
15. Jacquemin E, De Vree JM, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, et al. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1448-58.

17. Ortiz DF, Moseley J, Calderon G, Swift AL, Li S, Arias IM. Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and regulates its abundance in the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. 2004;279(31):32761-70.
18. Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(1):9-22.
19. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8(11):2281-308.
20. Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1459-67.
21. Ruetz S, Gros P. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell*. 1994;77(7):1071-81.
22. Schonhoff CM, Webster CR, Anwer MS. Tauroolithocholate-induced MRP2 retrieval involves MARCKS phosphorylation by protein kinase C in HUH-NTCP Cells. *Hepatology*. 2013;58(1):284-92.
23. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*. 1993;75(3):451-62.
24. Tan I, Lai J, Yong J, Li SF, Leung T. Chelerythrine perturbs lamellar actomyosin filaments by selective inhibition of myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase. *FEBS Lett*. 2011;585(9):1260-8.
25. Tan I, Seow KT, Lim L, Leung T. Intermolecular and intramolecular interactions regulate catalytic activity of myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *Mol Cell Biol*. 2001;21(8):2767-78.
26. Unbekandt M, Olson MF. The actin-myosin regulatory MRCK kinases: regulation, biological functions and associations with human cancer. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(3):217-25.
27. Venot Q, Delaunay JL, Fouassier L, Delautier D, Falguieres T, Housset C, et al. A PDZ-Like Motif in the Biliary Transporter ABCB4 Interacts with the Scaffold Protein EBP50 and Regulates ABCB4 Cell Surface Expression. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146962.
28. Wang DQ, Cohen DE, Carey MC. Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S406-11.
29. Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol*. 2005;7(3):255-61.
30. Zhao Z, Manser E. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases (MRCK), the ROCK-like effectors of Cdc42 and Rac1. *Small GTPases*. 2015;6(2):81-8.
31. Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ. Structure of ABC transporters. *Essays Biochem*. 2011;50(1):43-61.

Figure 1

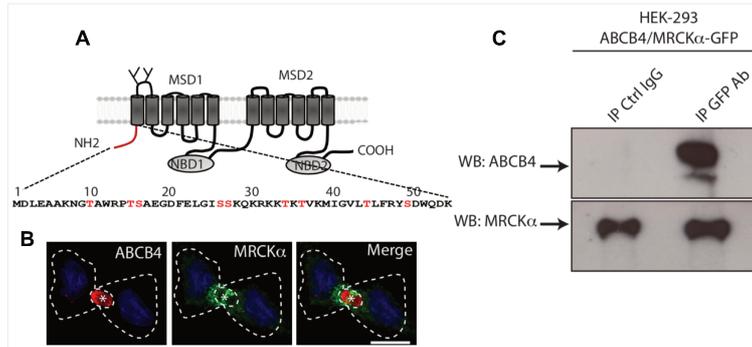


Figure 1. ABCB4 colocalizes and coimmunoprecipitates with the serine/threonine kinase MRCK α . (A) Schematic representation of ABCB4. ABCB4 is composed of two membrane spanning domains (MSD1 and MSD2) and two nucleotide binding domains (NBD1 and NBD2). The two glycosylation sites in the first extracellular loop are indicated. The amino acid sequence of the intracytoplasmic N-terminal domain of human ABCB4 isoform A (NP_000434.1) is shown. The serines and threonines residues present in the N-terminal domain of ABCB4 are indicated in red. (B) HepG2 cells transiently expressing ABCB4 were grown on coverslips, fixed, permeabilized, and stained with anti-ABCB4 antibody followed by anti-MRCK α antibody, and then incubated with Alexa-Fluor-594-and 488-conjugated secondary antibodies and visualized by confocal microscopy. Nuclei were stained with DRAQ 5 (Blue). Asterisks indicate bile canaliculi. BCs are indicated by asterisks. Bars, 10 μ m. (C) Cell lysates of co-transfected HEK293 cells with plasmids expressing ABCB4 and GFP-tagged MRCK α were incubated with anti-GFP antibody or mouse immunoglobulin G (IgG) covalently linked to agarose beads. The immunoprecipitated complex was immunoblotted with anti-ABCB4 and anti-MRCK α antibodies.

Figure 2

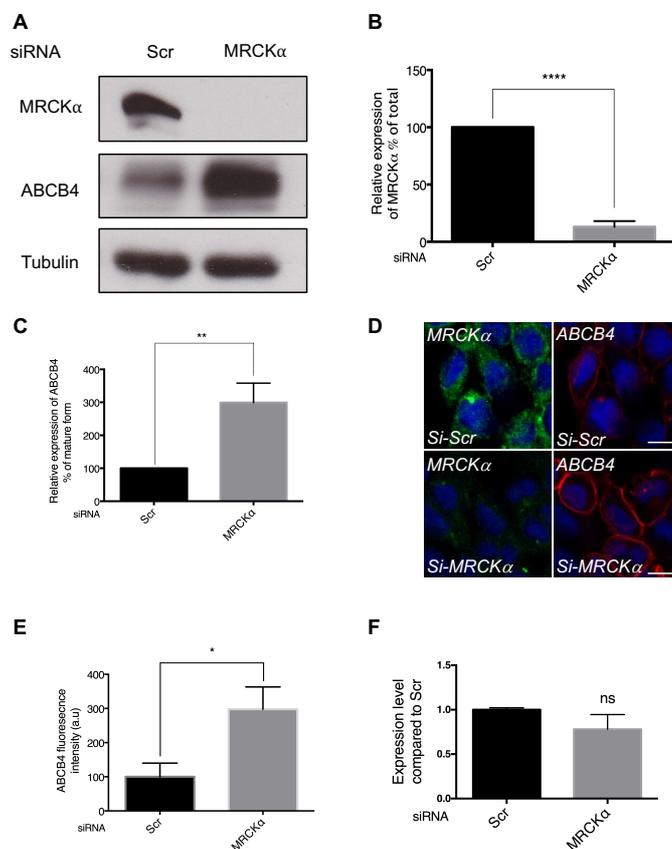


Figure 2. Effect of MRCK α silencing. (A) HEK293 cells stably expressing ABCB4 were transfected with scramble siRNA (Scr) or MRCK α siRNA. After 72 hours of transfection, cells were lysed and analyzed by immunoblotting using anti-MRCK α , anti-ABCB4 and anti-tubulin antibodies. (B) Amounts of MRCK α were quantified from immunoblots by densitometry to assess the efficiency of the RNA interference. MRCK α levels were expressed as a percentage of total expression in HEK293 cells transfected with scramble siRNA. Means (\pm SEM) of at least four independent experiments are shown. **** $P < 0,0001$. (C) Amounts of ABCB4 were quantified from immunoblots by densitometry. ABCB4 levels were expressed as a percentage of total expression in HEK293 cells transfected with scramble siRNA. Means (\pm SEM) of at least four independent experiments are shown. ** $P < 0,005$. (D) HEK293 cells stably expressing ABCB4 were transfected with scramble siRNA (Scr) or MRCK α siRNA. After 72 hours of transfection, cells were fixed, permeabilized, and stained with anti-ABCB4 antibody followed by anti-MRCK α antibody, and then incubated with Alexa-Fluor-594 and 488-conjugated secondary antibodies and visualized by confocal microscopy. Nuclei were stained with DRAQ 5 (Blue). Bars, 10 μ m. (E) The amount of ABCB4 was quantified in si Scramble- or si MRCK α -transfected cells using ImageJ 1.41 Software. Means (\pm SEM) of two independent experiments are shown. * $P < 0,05$; a.u., arbitrary units. (F) After 72 hours of transfection, mRNA expression of ABCB4 was quantified by reverse-transcription QPCR; n.s., not significant.

Figure 3

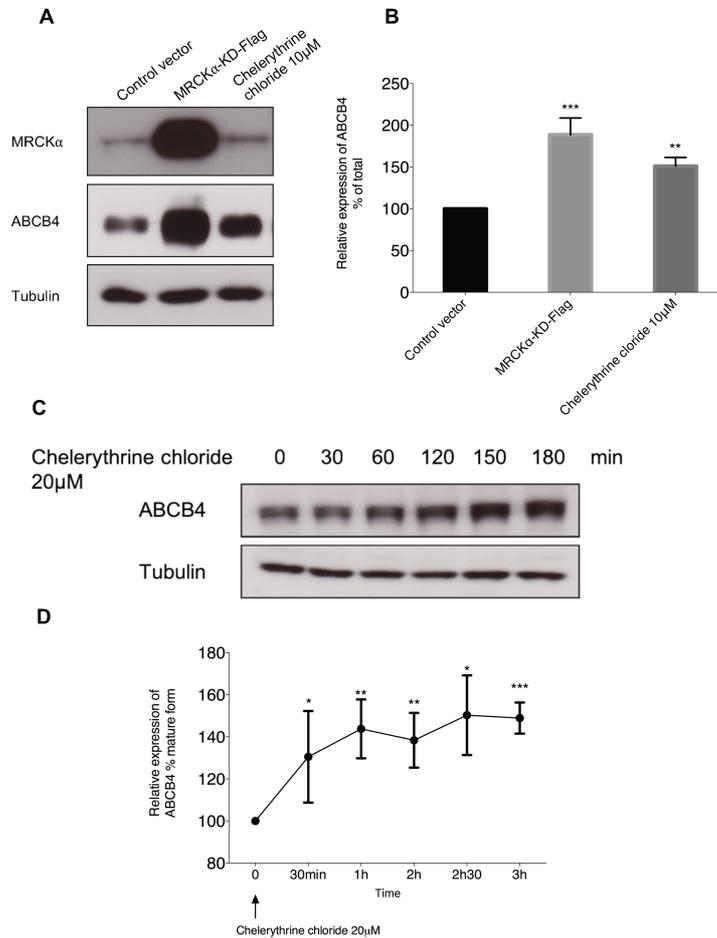


Figure 3. Effect of inhibition of MRCK α kinase activity. (A) HEK293 cells stably expressing ABCB4 were transfected with control vector or MRCK α -KD-Flag. After 24 hours of transfection, cells were untreated or treated with 10 μ M of chelerythrine chloride for 2 hours. They were then lysed and analyzed by immunoblotting using anti-MRCK α , anti-ABCB4 and anti-tubulin antibodies. (B) Amounts of ABCB4 were quantified from immunoblots by densitometry. ABCB4 levels were expressed as a percentage of total expression in HEK293 cells transfected with control vector and from untreated cells. Means (\pm SEM) of at least eight independent experiments are shown. ***P<0,001; **P<0,005. (C) Primary human hepatocytes were treated with 20 μ M of chelerythrine chloride for the indicated time points. Cells were then lysed and analyzed by immunoblotting using anti-ABCB4 and anti-tubulin antibodies. (D) Amounts of ABCB4 were quantified from immunoblots by densitometry. ABCB4 levels were expressed as a percentage of total expression of untreated (Time 0min) hepatocytes. Means (\pm SEM) of at least three independent experiments are shown. *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0005.

Figure 4

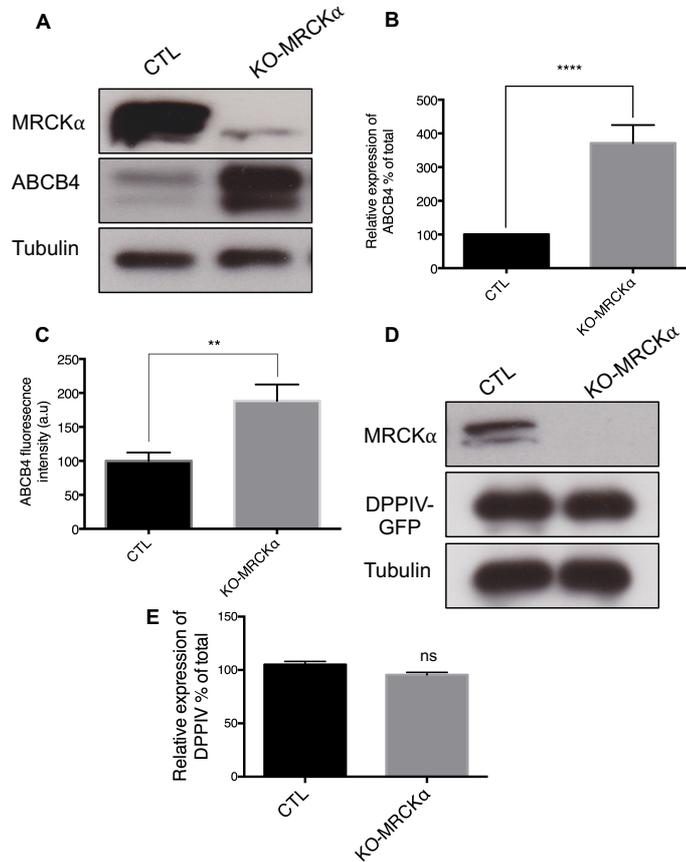


Figure 4. MRCK α knockout increases ABCB4 expression. (A) Control HEK293 cells (CTL) or HEK-CRISPR for MRCK α (KO-MRCK α) were transfected with ABCB4. After 24 hours of transfection, cells were lysed and analyzed by immunoblotting using anti-MRCK α , anti-ABCB4 and anti-tubulin antibodies. (B) Amounts of ABCB4 were quantified from immunoblots by densitometry. ABCB4 levels were expressed as a percentage of total expression in CTL cells transfected with ABCB4. Means (\pm SEM) of at least seven independent experiments are shown. **** P <0,000. (C) Quantification with ImageJ 1.41 Software of ABCB4 fluorescence in CTL- or KO-HEK293 cells expressing ABCB4, stained with anti-ABCB4 antibody and Alexa-Fluor-594 488-conjugated secondary antibody. Means (\pm SEM) of two independent experiments are shown. ** P <0,005; a.u., arbitrary units. (D) CTL- or KO-MRCK α HEK293 cells were transfected with DPPIV-GFP. After 24 hours of transfection, cells were lysed and analyzed by immunoblotting using anti-MRCK α , anti-GFP and anti-tubulin antibodies. (E) Amounts of DPPIV-GFP were quantified from immunoblots by densitometry. DPPIV-GFP levels were expressed as a percentage of total expression in CTL cells transfected with DPPIV-GFP. Means (\pm SEM) of at least four independent experiments are shown; n.s., not significant.

Figure 5

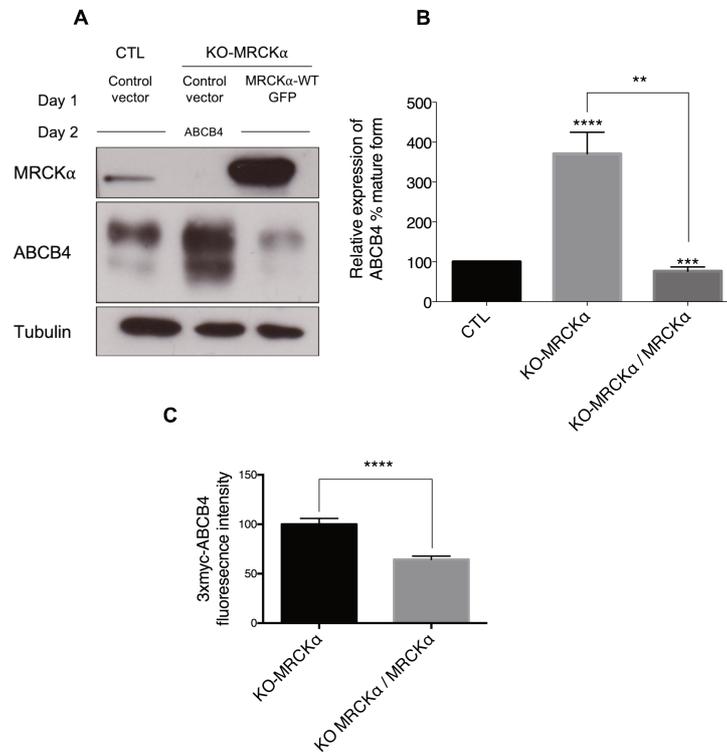


Figure 5. Rescue of MRCK α phenotype in MRCK α knockout cells. (A) HEK293-CTL or HEK293-MRCK α -KO cells were transfected with control vector or MRCK α -WT-GFP. After 24 hours of transfection, they were transfected with ABCB4 for 24 hours. They were then lysed and analyzed by immunoblotting using anti-MRCK α , anti-ABCB4 and anti-tubulin antibodies. (B) Amounts of ABCB4 were quantified from immunoblots by densitometry. ABCB4 levels were expressed as a percentage of total expression in CTL cells transfected with control vector. Means (\pm SEM) of at least four independent experiments are shown. ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$. (C) HEK293-MRCK α -KO cells stably expressing 3xmyc-ABCB4 were transiently transfected with a control vector or MRCK α -WT-GFP. They were then incubated for 60 minutes at 0°C with anti-myc antibody. After surface labeling, cells were fixed and cell ABCB4 was visualized with Alexa-Fluor 594-conjugated secondary antibodies. The amount of ABCB4 at the membrane was quantified in cells transfected with control vector or MRCK α -WT-GFP using ImageJ 1.41 software. Means (\pm SEM) of at least two independent experiments are shown. **** $P < 0.0005$.

Supplemental Table 1. **Sequence of primers used for RT-PCR**

5' CAGTACTGGTGCACTTTCTACAAGACTT 3'	ABCB4-Forward
5' TGCAATTAAAGCCAACCTGGTT 3'	ABCB4-Reverse
5' CCCTGGCGTCGTGATTAG 3'	HPRT-Forward
5' ATGGCCTCCCATCTCCTT 3'	HPRT-Reverse

-Résultats complémentaires-

Impact de l'extinction de l'expression protéique de la kinase MRCK α sur les mutants de classe IV d'ABCB4

Matériels et méthodes

Les « matériels et méthodes » de cette partie sont identiques à ceux des études présentées précédemment, s'y ajoutent :

Plasmides. Les plasmides codant pour les mutants T424A et N510S ont été décrits précédemment (Delaunay 2009, Delaunay 2016)

Résultats

L'expression des mutants T424A et N510S est augmentée en absence de MRCK α

Les résultats présentés dans le manuscrit montrent qu'en absence de la kinase MRCK α , ABCB4 est accumulé à la membrane plasmique et son internalisation inhibée. Ces résultats nous ont conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle la stabilité des mutants de classe IV d'ABCB4 pourrait être améliorée en absence de cette kinase. Les mutants de classe IV d'ABCB4 présentent un défaut de stabilité membranaire, ils sont alors rapidement internalisés et dégradés (Delaunay 2016). J'ai donc étudié l'effet de l'extinction de MRCK α dans des HEK-CRISPR-Cas9-MRCK α (KO MRCK α) sur deux mutants de classe IV d'ABCB4, le mutant T424A et le N510S, identifiés chez deux patients atteints de PFIC3 (Delaunay 2016). Les résultats présentés dans la Figure 52 montrent une absence d'expression de MRCK α dans les cellules KO MRCK α comparées aux cellules contrôle (CTL). Suite à cette extinction, on observe une augmentation de l'expression des mutants T424A et N510S en western blot. Ces résultats suggèrent une stabilisation des mutants de classe IV d'ABCB4 à la membrane lorsque la kinase MRCK α est absente.

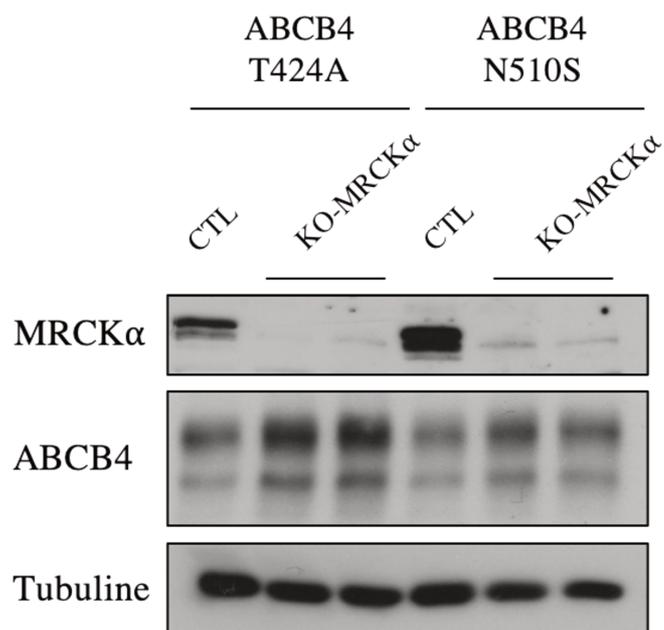


Figure 52 : Analyse par western-blot du profil d'expression des mutants de classe IV d'ABCB4 en absence de MRCK α Les cellules HEK contrôle (CTL) ou HEK CRISPR MRCK α (KO MRCK α) sont transfectées avec 1 μ g d'ADN plasmidique codant pour les mutants de classe IV T424A ou N510S. Les cellules sont lysées et les protéines sont déposées sur gel SDS-PAGE pour l'analyse en western-blot avec des anticorps anti-MRCK α , anti-ABCB4 et anti-tubuline (témoin de charge). L'expérience a été réalisée en duplicata dans les cellules KO MRCK α .

L'extinction de l'expression protéique de MRCK α augmente la stabilité du mutant T424A

Afin de caractériser plus en détails l'impact de l'absence de MRCK α sur la stabilité d'ABCB4, j'ai réalisé différentes expériences sur le mutant T424A. J'ai d'abord confirmé l'augmentation de l'expression du mutant T424A par ARN interférent dirigé contre MRCK α . En effet, les résultats présentés dans les Figures 53A et B montrent que lorsque l'ARN interférent dirigé contre MRCK α est transfecté dans des cellules HEK293 exprimant stablement le mutant T424A, on observe une augmentation significative de l'expression du mutant T424A.

J'ai ensuite réalisé des expériences de cinétique de dégradation du mutant T424A après une inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide dans les cellules HEK CTL ou KO MRCK α . Les figures 53C et D montrent que dans les cellules contrôle, le mutant T424A suit une cinétique de dégradation comparable à celle déjà publiée par l'équipe, à savoir une diminution de la quantité de mutant T424A au cours du temps (Delaunay 2016). A l'inverse, dans les cellules KO MRCK α , la cinétique de dégradation du mutant T424A est fortement ralentie. A 8h, environ 20% sont dégradés contre 50% dans le contrôle. Ces résultats montrent qu'en absence de MRCK α , la stabilité du mutant T424A est augmentée.

La suite logique de ces expériences était de vérifier si l'augmentation de la stabilité du mutant T424A est corrélée à une augmentation d'activité de sécrétion de phosphatidylcholine (PC). J'ai donc mesuré l'activité du mutant T424A en condition contrôle et en absence de la kinase MRCK α . Les résultats présentés dans la Figure 53E montrent que l'activité de sécrétion de PC n'est pas modifiée en absence de MRCK α . Ce résultat est surprenant puisque nous nous attendions à une augmentation de l'activité de sécrétion de PC par le mutant en absence de MRCK α . Des explications envisageables seront abordées dans la partie Discussion.

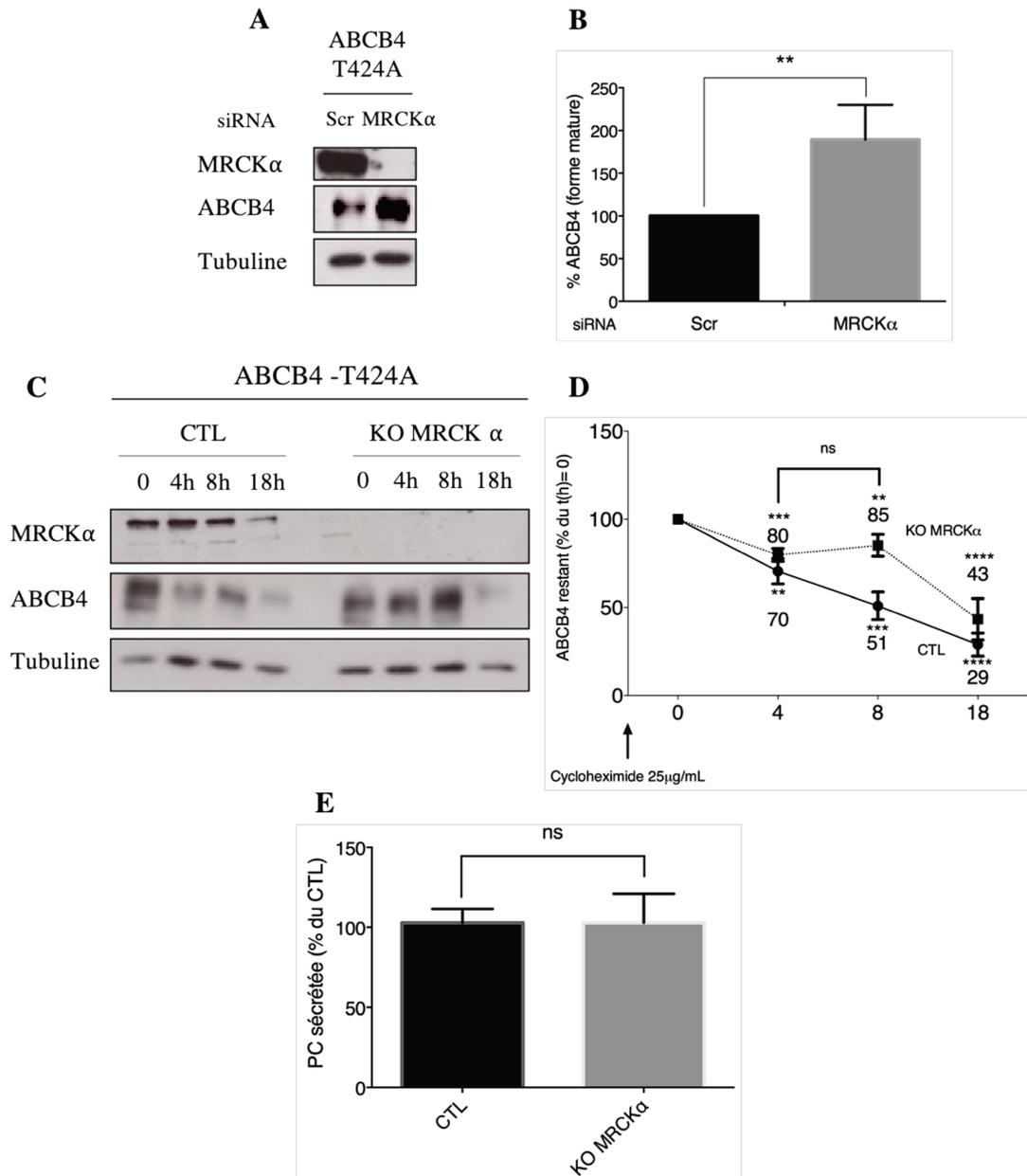


Figure 53 : La forme mature et la stabilité du variant T424A d'ABCB4 sont augmentées en absence de MRCK α . (A et B) Des cellules HEK exprimant de façon stable ABCB4-T424A sont transfectées avec un ARN interférent contrôle ou dirigé contre MRCK α . Les cellules sont lysées 48h après la seconde transfection de siRNA. Les protéines sont déposées sur gel SDS-PAGE pour l'analyse des western blot avec des anticorps anti-MRCK α , anti-ABCB4 et anti-tubuline (témoin de charge). La quantification de la forme mature d'ABCB4 rapportée à la tubuline a été réalisée avec ImageJ. Le niveau d'ABCB4 est rapporté à la quantité de tubuline présente, ce rapport est ensuite exprimé en pourcentage, le contrôle représentant 100%. Moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. **P < 0,005 (C et D) Stabilité d'ABCB4-T424A. Les cellules HEK CTL ou KO MRCK α sont transfectées avec ABCB4-T424A et traitées pendant 18h avec de la cycloheximide. La cinétique débute à t(h)=0 lorsque la cycloheximide est ajoutée au milieu de culture des cellules. La quantification d'ABCB4 restant au cours du temps est réalisée avec ImageJ. Le niveau d'ABCB4 est exprimé en pourcentage à partir de t(h)=0. Moyenne de 5 expériences indépendantes. **P < 0,005 ; ***P < 0,0005 ; ****P < 0,0001 (E) Dosage de la PC excrétée par ABCB4-T424A. Les cellules HEK CTL ou HEK KO MRCK α sont transfectées avec ABCB4-T424A. 24h après la transfection le milieu est remplacé par du DMEM sans rouge phénol additionné de 0,02% de BSA et 0,5mM de taurocholate de sodium. Après 24h d'incubation, le milieu est récupéré et la PC est dosée à l'aide d'un test fluoroenzymatique. La sécrétion de PC est rapportée à la quantité d'ABCB4 exprimée, ce rapport est ensuite exprimé en pourcentage, le contrôle représentant 100%. Moyenne de 3 expériences indépendantes.

Troisième partie

Si l'effet de la kinase MRCK α passait par son effecteur MLC2 ?

Le linker d'ABCB4 est une séquence cytosolique d'environ 80 acides aminés allant de la phénylalanine 620 à la valine 700 et reliant le NBD1 au TMD2. Sa fonction reste peu étudiée même s'il semble impliqué dans le trafic intracellulaire, la stabilité membranaire, la dégradation ou encore la régulation de l'activité des transporteurs ABC. Plusieurs partenaires du linker d'ABCB4 ont été identifiés, RACK1, HAX1, MLC2, les deux derniers interagissant avec ABCB4 et ABCB11. Le rôle des interactions avec HAX1 et MLC2 n'a été étudié que pour ABCB11. Ces deux partenaires régulent l'adressage canaliculaire et l'endocytose du transporteur des acides biliaires. Pour la protéine partenaire RACK1, elle est nécessaire à l'adressage membranaire d'ABCB4. Une vingtaine de mutations identifiées chez des patients, dont huit atteints de PFIC3, sont localisées dans le linker d'ABCB4, ce qui indique l'importance de ce domaine pour le transporteur.

Suite à la découverte de MLC2 comme partenaire du domaine linker d'ABCB4 par crible en double hybride, cette interaction a été confirmée par co-immunoprécipitation et GST-pulldown mais son rôle n'a pas été déterminé à ce jour (Chan 2005). L'objectif de cette dernière partie est d'étudier le rôle de cette interaction. MLC2 étant un effecteur de la kinase MRCK α (Figure 54) il est intéressant de déterminer si ces deux protéines ont un rôle commun auprès du transporteur ABCB4.

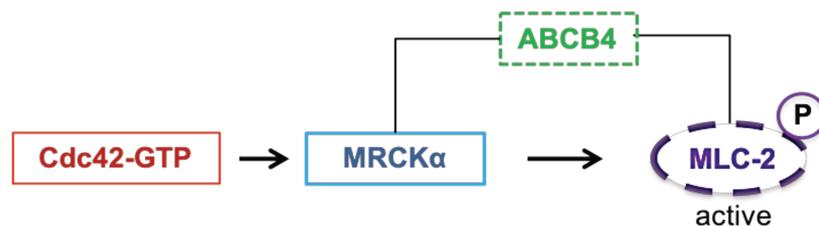


Figure 54 : Interaction d'ABCB4 avec les effecteurs de la voie de signalisation Cdc42 / MRCK α / MLC2. La GTPase Cdc42 active la sérine thréonine kinase MRCK α qui est un partenaire du domaine N-terminal d'ABCB4. Une fois active, MRCK α peut activer MLC2 soit directement en la phosphorylant, soit en inhibant sa phosphatase. MLC2 est un partenaire de la région linker d'ABCB4.

La stratégie consiste à inhiber ou éteindre MLC2 de différentes façons : dominant négatif, ARN interférent ou CRISPR-Cas9 et à observer les effets sur ABCB4. A l'instar de MRCK α , les résultats obtenus nous ont poussé à explorer la stabilité de la forme mature d'ABCB4, et son activité.

Matériels et méthodes

Les « matériels et méthodes » de cette partie sont identiques à ceux des études présentées précédemment, s’y ajoutent :

Plasmides et ARN interférent. Il existe plusieurs isoformes de MLC2. Les plasmides codant pour MLC2-WT et MLC2-AA (mutant dominant négatif dont la thréonine 18 et la sérine 19 ont été mutées en alanine) nous ont été aimablement donné par Hamao Kozue du laboratoire de Hiroshi Hosoya (Department of Biological Science, Graduate School of Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, 739-8526, Japan). Ces plasmides correspondent à l’isoforme Myl12b (Iwasaki 2001).

L’isoforme utilisée par Chan et al. mettant en évidence l’interaction du domaine linker d’ABCB4 avec MLC2 correspondant à l’isoforme Myl12a. Nous avons donc utilisé des ARN interférents dirigés contre les deux isoformes, Myl12a et Myl12b. Les ARN interférents contrôle siRNA “ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool”, Myl12a siRNA “ON-TARGETplus Human Myl12a siRNA SMARTpool” et Myl12a siRNA “ON-TARGETplus Human Myl12b siRNA SMARTpool” proviennent de chez Dharmacon-GE Healthcare (Fontenay-sous-Bois, France).

Expériences de CRISPR. Pour étudier le rôle de l’interaction de MLC2 avec ABCB4, une invalidation a été réalisée. Nous avons utilisé la machinerie « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » (CRISPR) « CRISPR-associated » (Cas9). Les cellules ont été transfectées avec le plasmide PX458. Il est constitué de la séquence codant un guide d’oligonucléotides complémentaire de la séquence cible (l’isoforme Myl12b étant celle dont l’extinction a le plus d’effet par ARN interférent, nous avons ciblé l’exon 2 de ce gène) et d’une séquence codant la Cas9 couplée à une séquence de localisation nucléaire (NLS) qui permettra à l’endonucléase d’entrer dans le noyau où elle pourra induire une cassure double brin au niveau du gène *Myl12b*. Le plasmide contient de plus la séquence codant la Green Fluorescent Protein (GFP), qui nous permet ensuite de sélectionner les cellules transfectées.

Anticorps et réactifs. Deux anticorps dirigés contre les isoformes Myl12a et Myl12b de chez Euromedex (Souffelweyersheim, France) ont été utilisés.

Résultats

ABCB4 co-immunoprécipite avec MLC2-WT et MLC2-AA

Pour confirmer l'interaction d'ABCB4 avec MLC2, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation dans nos modèles cellulaires avec les formes WT et AA de MLC2 couplées à la GFP. Les résultats montrent qu'ABCB4-WT co-immunoprécipite avec MLC2-WT et MLC2-AA (Figure 55).

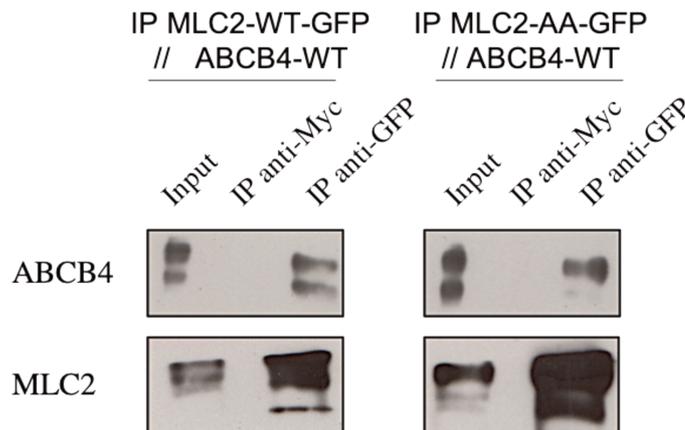


Figure 55 : MLC2-WT et -AA co-immunoprécipitent avec ABCB4 Co-immunoprécipitation à partir de lysat de cellules HEK293. Les protéines sont immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP et les protéines déposées sur gel SDS-PAGE pour l'analyse en western-blot avec l'anticorps anti-ABCB4 ou anti GFP (pour révéler les formes taguées GFP de MLC2). L'anticorps anti-myc est utilisé comme anticorps contrôle non relevant.

La surexpression de MLC2-WT permet de restaurer le phénotype contrôle dans les cellules KO MRCK α

Afin de vérifier si l'effet de MRCK α sur l'expression d'ABCB4 passe par son effecteur MLC2, j'ai réalisé des expériences de « sauvetage » consistant à évaluer l'effet d'une surexpression de MLC2-WT dans les cellules HEK KO MRCK α . L'expression d'ABCB4 a été donc évaluée après la transfection de l'ADNc de MLC2-WT dans les cellules HEK KO MRCK α . Les résultats présentés dans les figures 56A et B montrent que, comme présenté dans le manuscrit, l'expression d'ABCB4 est augmentée en absence de MRCK α . La ré-expression de MRCK α comme de MLC2 dans les cellules KO MRCK α permet de diminuer le niveau d'expression d'ABCB4. Ces résultats suggèrent que l'effet de MRCK α sur l'expression membranaire d'ABCB4 passe par son effecteur MLC2, qui contrôlerait donc l'internalisation d'ABCB4 (Figure 56).

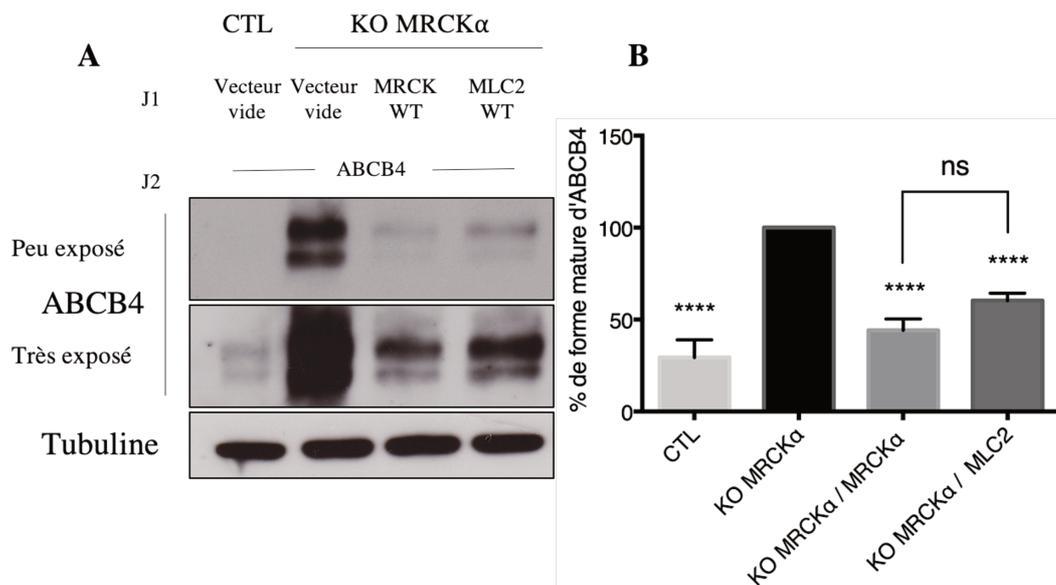


Figure 56 : La transfection de MLC2-WT dans des HEK KO MRCK α a le même effet que le « rescue » de MRCK α . (A) Des HEK CTL ou HEK KO MRCK α sont transfectées avec un vecteur vide, un plasmide codant pour MRCK α -WT ou MLC2-WT. Le lendemain, elles sont transfectées avec ABCB4-WT. 24h après les cellules sont lysées et les protéines déposées sur gel SDS-PAGE pour l'analyse en western- blot avec des anticorps anti-ABCB4 et anti-tubuline (témoin de charge). (B) Quantification de 3 points dans deux expériences indépendantes. **** P < 0,0001.

L'expression de la forme mature d'ABCB4 est augmentée suite à l'extinction de MLC2

Afin d'étudier le rôle de l'interaction d'ABCB4 avec MLC2, la même démarche que celle retenue pour MRCK α a été utilisée. Le mutant MLC2-AA fonctionnant comme dominant négatif de MLC2, ainsi que des ARN interférents dirigés contre les isoformes Myl12a et Myl12b ont été utilisés. L'expression d'ABCB4 a été observée en western blot en présence de cette construction dominant négatif ou des siRNA. Les résultats présentés dans la Figure 57 montrent que l'inhibition de MLC2 par l'expression d'un mutant dominant négatif et l'extinction de son expression par des ARN interférents ciblant les deux isoformes Myl12a et Myl12b entraînent une augmentation de l'expression d'ABCB4. Il est intéressant de noter que les mêmes résultats sont obtenus lorsque l'on inhibe MLC2 ou MRCK α , à savoir une augmentation de la quantité de forme mature d'ABCB4. Ces résultats suggèrent que MLC2 joue un rôle dans la régulation de l'expression de la forme membranaire d'ABCB4.

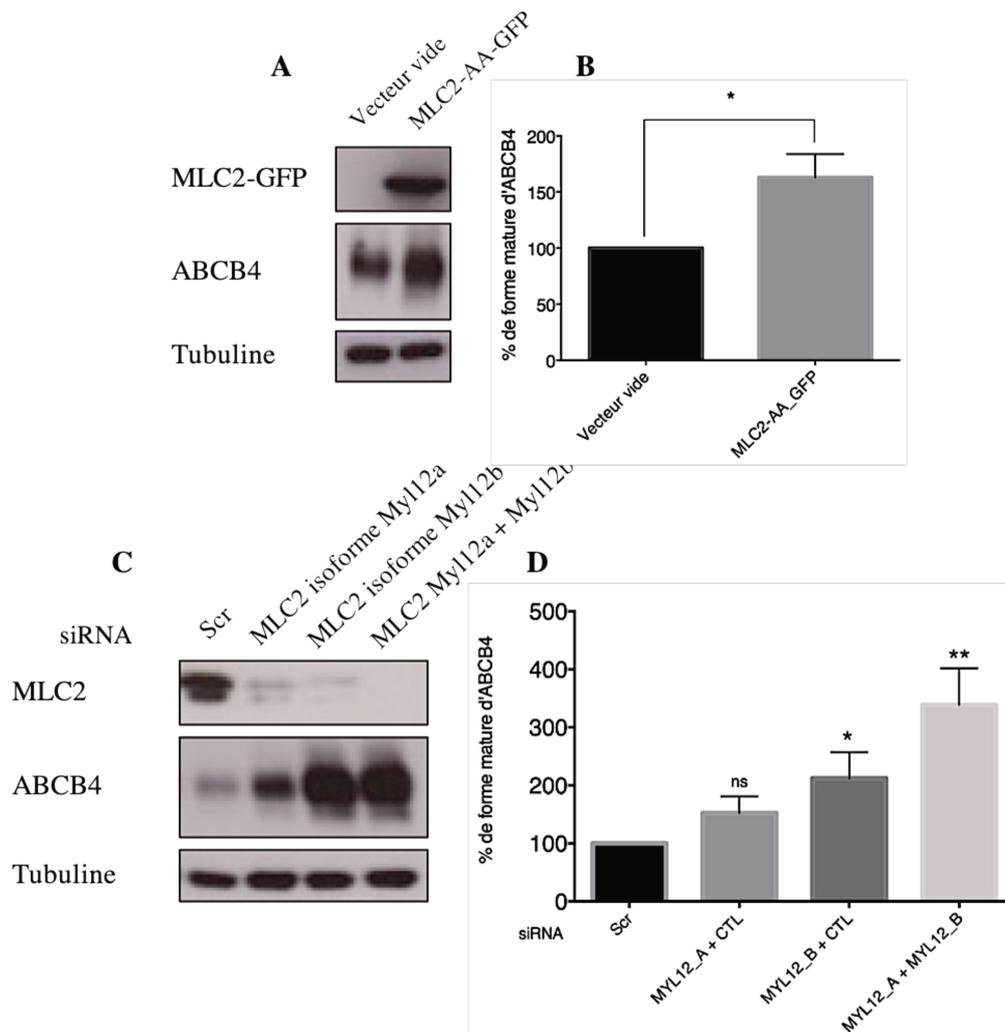


Figure 57 : La forme inactive ou l'extinction de MLC2 augmentent l'expression d'ABCB4. (A et B) Des cellules HEK exprimant de façon stable ABCB4-WT sont transfectées avec un vecteur vide ou un mutant dominant négatif, MLC2-AA. Les cellules sont lysées, les protéines sont déposées sur gel SDS-PAGE pour l'analyse des western-blot avec des anticorps anti-MLC2, anti-ABCB4 et anti-tubuline (témoin de charge). La quantification de la forme mature d'ABCB4 rapportée à la tubuline a été réalisée avec ImageJ. Le niveau d'ABCB4 est rapporté à la quantité de tubuline présente, ce rapport est ensuite exprimé en pourcentage, le contrôle représentant 100%. Moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes. * $P < 0,05$ (C et D) Des cellules HEK exprimant de façon stable ABCB4-WT sont transfectées avec un ARN interférent contrôle ou dirigé contre les isoformes My112a et My112b de MLC2. Les cellules sont lysées 48h après la seconde transfection de siRNA. Les protéines sont déposées sur gel SDS-PAGE pour l'analyse des western-blot avec des anticorps anti-MLC2, anti-ABCB4 et anti-tubuline (témoin de charge). La quantification de la forme mature d'ABCB4 rapportée à la tubuline a été réalisée avec ImageJ. Le niveau d'ABCB4 est rapporté à la quantité de tubuline présente, ce rapport est ensuite exprimé en pourcentage, le contrôle représentant 100%. Moyenne d'au moins 4 expériences indépendantes. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

L'extinction de MLC2 par CRISPR-Cas9 augmente la stabilité d'ABCB4

J'ai ensuite comparé la stabilité d'ABCB4 dans les cellules HEK contrôle et KO MLC2. La cinétique de dégradation d'ABCB4 a été suivie au cours du temps suite à l'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide. Les résultats des figures 58A et B montrent clairement que la cinétique de dégradation d'ABCB4 est retardée en absence de MLC2, autrement dit la stabilité d'ABCB4 est augmentée en absence de MLC2. Il s'agit néanmoins d'une seule expérience qui doit être répétée pour confirmer l'effet de MLC2 sur la stabilité membranaire d'ABCB4.

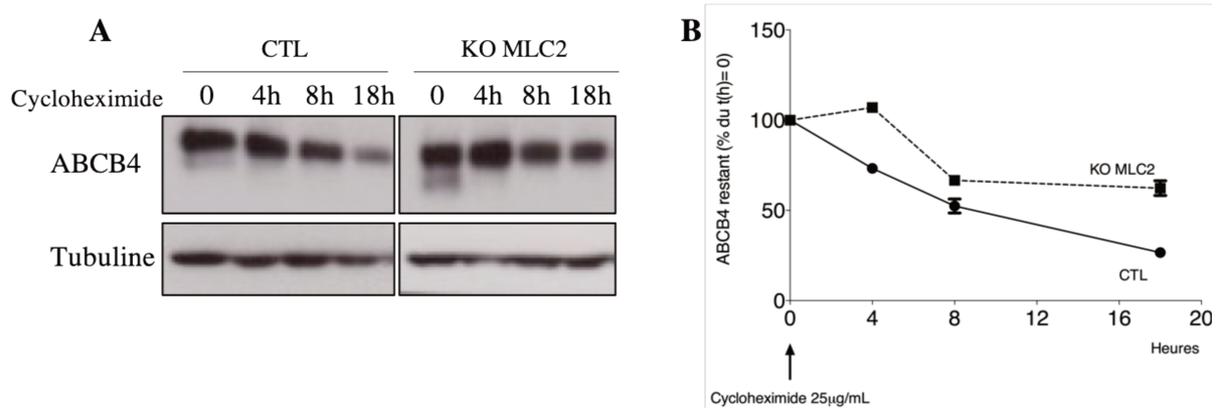


Figure 58 : La stabilité d'ABCB4 augmente lorsque l'expression de MLC2 est invalidée.

(A et B) Les cellules HEK CTL ou KO MLC2 sont transfectées avec ABCB4-T424A et traitées pendant 18h avec de la cycloheximide. La cinétique débute à $t(h)=0$ lorsque la cycloheximide est ajoutée au milieu de culture des cellules. La quantification d'ABCB4 restant au cours du temps est réalisée avec ImageJ. Le niveau d'ABCB4 est exprimé en pourcentage à partir de $t(h)=0$.

L'extinction de MLC2 augmente l'activité du transporteur ABCB4.

Comme pour MRCK α , j'ai vérifié si l'augmentation de la forme mature d'ABCB4 était corrélée à une augmentation de son activité. J'ai donc mesuré la sécrétion de PC dans les cellules HEK CTL ou KO MLC2. Les résultats obtenus montrent que la sécrétion de PC augmente d'environ 20% de manière significative dans les cellules KO MLC2 (Figure 59). Cela signifie qu'en absence de MLC2, ABCB4 est stabilisé à la membrane plasmique sous une forme active, contrairement aux résultats obtenus en absence de MRCK α (aucun changement d'activité d'ABCB4 n'avait été observé). Des expériences complémentaires sont nécessaires pour valider ces résultats préliminaires.

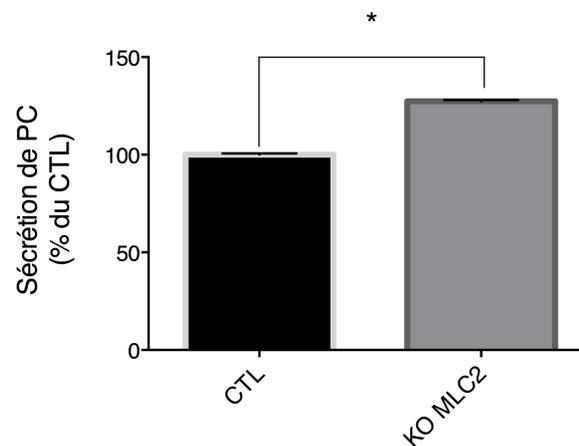


Figure 59 : La sécrétion de PC augmente lorsque l'expression de MLC2 est réprimée.

Dosage de la PC excrétée par ABCB4-WT. Les cellules HEK CTL ou KO MLC2 sont cultivées dans des plaques 6puits puis transfectées avec ABCB4-WT. 24h après la transfection le milieu est remplacé par du DMEM sans rouge phénol additionné de 0,02% de BSA et 0,5mM de taurocholate de sodium. Après 24h d'incubation, le milieu est récupéré et la PC est dosée à l'aide d'un test fluoroenzymatique. La sécrétion de PC est rapportée à la quantité d'ABCB4 présente, ce rapport est ensuite exprimé en pourcentage, le contrôle représentant 100%. Moyenne de 4 points. * P < 0,05

-DISCUSSION-

Dans la première partie de ma thèse, des prédictions basées sur la modélisation moléculaire en trois dimensions (3D) m'ont permis de démontrer que cinq mutants de classe III d'ABCB4, localisés dans des sites conservés de liaison à l'ATP, sont homologues à des variations de CFTR. J'ai également mis en évidence les effets bénéfiques du VX-770 (ivacaftor, Kalydeco®), un médicament approuvé en clinique pour le traitement des patients atteints de mucoviscidose, sur les cinq mutants d'ABCB4. Ces résultats ouvrent la voie aux thérapies ciblées pour des patients atteints de pathologies biliaires liées à des défauts d'ABCB4, notamment la PFIC3.

La compréhension de la biologie d'ABCB4 a un intérêt direct de recherche en physiologie et physiopathologie des maladies biliaires liées à des défauts de ce transporteur. C'est dans ce contexte que se situent les travaux de la deuxième partie de ma thèse. En effet, j'ai montré qu'ABCB4 interagit avec la kinase MRCK α et MLC2, et que l'inhibition de ces deux partenaires entraîne une augmentation de l'expression et de la stabilité membranaire d'ABCB4. Ces résultats permettent de comprendre les mécanismes qui contribuent à réguler l'expression membranaire d'ABCB4, un aspect fondamental à considérer si l'on veut améliorer l'expression de mutants d'ABCB4 identifiés chez les patients.

Les mutations situées dans les sites de liaison à l'ATP entraînent un défaut d'activité d'ABCB4

Notre équipe a un accès privilégié aux bases de données répertoriant les mutations de patients atteints de syndrome LPAC ou d'ICP puisqu'elle est affiliée au Centre de Référence coordonnateur « maladies inflammatoires des voies biliaires ». De plus, une collaboration avec les Prs. Emmanuel Jacquemin et Emmanuel Gonzales nous permet un accès aux mutations identifiées chez des enfants atteints de PFIC3.

Les mutations G535D, G536R, S1076C et G1178S ont été identifiées chez des patients atteints d'ICP ou de syndrome LPAC sévère, la mutation S1176L chez un enfant atteint de PFIC3. Tous ces variants sont situés dans les motifs conservés des sites de liaison à l'ATP d'ABCB4. Une biopsie de foie de la patiente portant la mutation G535D montre que ABCB4 est correctement localisé à la membrane canaliculaire (Lucena 2003). Les quatre autres variants n'ont jamais été caractérisées ni à l'échelle tissulaire, ni au niveau moléculaire et cellulaire.

Des prédictions basées sur la modélisation moléculaire en trois dimensions (3D) des deux sites de liaison à l'ATP d'ABCB4, réalisée en collaboration avec Isabelle Callebaut, nous a permis

de situer les résidus mutés dans ces sites : les résidus G536 et G1178 occupent des positions équivalentes dans les signatures LSGGQ des NBD1 et NBD2. Au niveau de ce résidu glycine, l'azote forme une liaison hydrogène avec l'un des oxygènes du phosphate γ de l'ATP. Le changement de résidu lié aux mutations faux sens au niveau des résidus glycines 536 et 1178 entraînerait donc un encombrement stérique. Le même encombrement est prédit pour le résidu G535 dont l'azote est faiblement lié par des forces de Van der Waals à ce même phosphate γ . La chaîne latérale de la sérine 1076 située dans le Walker A du second NBD forme une liaison hydrogène avec le phosphate β de l'ATP. Quant à la sérine 1176, sa chaîne latérale forme une liaison hydrogène avec le phosphate γ . La substitution de l'une de ces sérines perturberait ces interactions avec l'ATP. Des prédictions basées sur cette modélisation structurale indiquent que les 5 mutations étudiées sont susceptibles de perturber ou de rompre des liaisons essentielles à l'interaction d'ABCB4 avec l'ATP, donc la dimérisation des NBDs, ce qui impliquerait un défaut d'activité d'ABCB4.

Nous avons reproduit ces mutations dans l'ADNc d'ABCB4 et étudié leur impact après transfection dans des modèles cellulaires HEK293 et HepG2. Nous avons montré que les cinq mutants étaient correctement adressés et exprimés au niveau de la membrane canaliculaire des cellules HepG2. Les mesures de sécrétion de PC ont montré un défaut d'activité des cinq mutants étudiés comparés à la protéine sauvage. Ces résultats confirment donc les prédictions in silico réalisées sur le modèle 3D.

Le potentiateur VX-770, utilisé en clinique pour traiter des patients atteints de mucoviscidose permet de restaurer partiellement la sécrétion de PC par ABCB4

Des alignements de séquences des sites de liaison à l'ATP d'ABCB4 et du canal d'ions chlorure CFTR ont mis en évidence que les variants G536R, S1076C et G1178S d'ABCB4 sont respectivement homologues des variants de classe III G551D, S1251N et G1349D de CFTR.

Les mutants de classe III de CFTR correspondent à des mutants d'activité du canal d'ions chlorures, qui est correctement localisé à la membrane plasmique mais inactif (Bompadre 2007, Melin 2004). Les patients atteints de mucoviscidose porteurs de mutations de classe III, y compris les G551D, S1251N et G1349D, homologues des variants G536R, S1076C et G1178S d'ABCB4, sont traités avec une molécule approuvée en clinique, le VX-770 ou Ivacaftor (Van Goor 2009, Veit 2016, Yu 2012). Le VX-770 agit comme potentiateur et restaure partiellement l'activité de CFTR permettant une amélioration des symptômes chez les patients atteints de mucoviscidose (Accurso 2010, Bessonova 2018, Davies 2016, Davies 2013). Nous avons

supposé que le VX-770 pourrait aussi fonctionner comme potentiateur sur les cinq mutants d'activité d'ABCB4. Nous avons ainsi mesuré l'activité de sécrétion de phosphatidylcholine d'ABCB4 en présence de VX-770. Comme pour les mutants de classe III de CFTR, l'activité des cinq mutants des sites de liaison à l'ATP d'ABCB4 est partiellement corrigée, avec une augmentation jusqu'à 50% de l'activité de la protéine wild-type pour la mutation S1076C identifiée chez un enfant atteint de PFIC3 et homozygote pour celle-ci. Néanmoins, pour ABCB4 le VX-770 semble être spécifique des mutations des sites de liaison à l'ATP puisqu'il ne restaure pas l'activité du variant P726L localisé dans les domaines transmembranaires. D'autres acides aminés impliqués dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP ont été identifiés comme mutés chez des patients atteints de PFIC3, il serait intéressant de déterminer si l'utilisation du VX-770 peut être élargie à ceux-ci.

Les mécanismes d'action du VX-770 ne sont pas encore résolus mais diverses études en ont proposé. En augmentant le temps de probabilité d'ouverture du canal d'ions chlorure CFTR, et ce de manière ATP-dépendante, l'activité de CFTR-WT est accrue *in vitro*. Mais cette même étude montre un effet indépendant de l'ATP sur l'activité du mutant de classe III G551D, pour lequel le VX-770 restaure partiellement l'activité sécrétrice d'ions chlorures. Ce potentiateur aurait donc un double effet, grâce à des propriétés fortement hydrophobes, il se fixerait au niveau des domaines transmembranaires et en modifiant la structure du canal, il faciliterait l'ouverture du canal de façon indépendante, tout en prolongeant le temps d'ouverture ATP-dépendant, ce qui augmente la sécrétion d'ion Cl⁻ (Eckford 2012, Jih 2013, Van Goor 2009).

Selon d'autres études, le VX-770 agirait également en diminuant la stabilité à la membrane du mutant Δ F508 de CFTR dont l'adressage membranaire est corrigé par le VX-809 agissant comme chaperonne (Cholon 2014, Mall 2014, Matthes 2016, Veit 2014). L'effet perturbateur du VX-770 a donc été observé sur la stabilité de CFTR et d'autres protéines membranaires interagissant avec CFTR et faisant partie de la famille des SLCs. Il s'avère que la déstabilisation due au VX-770 n'est pas spécifique à CFTR- Δ F508 mais est également observée sur plusieurs SLCs. D'après les auteurs, cette déstabilisation serait due aux propriétés lipophiles du VX-770, qui perturberait les rafts lipidiques de la membrane plasmique en s'y insérant (Chin 2018).

Dans une optique de développement de la médecine personnalisée, cette étude a permis le repositionnement du VX-770 pour traiter des patients atteints de pathologies biliaires provenant de mutations dans les sites de liaison à l'ATP d'ABCB4. C'est la première fois qu'une molécule est proposée pour corriger des mutations de classe III d'ABCB4, qui sont les plus représentées chez les patients (Delaunay 2016). A l'heure actuelle, il n'existe pas d'autre traitement que

l'UDCA pour les patients atteints de PFIC3, mais l'UDCA ne permet que de repousser la transplantation hépatique, pas de s'y soustraire. De plus, il n'est efficace qu'en présence d'une quantité résiduelle de PC. L'administration de VX-770 à des patients pourrait donc permettre de restaurer une activité d'ABCB4 suffisante pour que l'UDCA agisse. Bien que nos expériences *in vitro* ne montrent pas d'effet additif de l'UDCA et du VX-770, il est possible que la combinaison de ces deux molécules soit efficace chez les patients, permettant ainsi de leur éviter une transplantation. Le VX-770 est actuellement utilisé en combinaison avec des chaperonnes pharmacologiques comme le VX-809 pour corriger l'adressage et l'activité de CFTR- Δ F508 qui est la mutation la plus répandue chez les patients atteints de mucoviscidose (De Boeck 2014) mais aussi en combinaison avec des molécules dites « stabilisatrices » et en triple combinaison (Davies 2018, Keating 2018, Taylor-Cousar 2019, Taylor-Cousar 2017). Selon les associations de variations identifiées chez les patients PFIC3, il serait possible de proposer des combinaisons thérapeutiques personnalisées comprenant des molécules correctrices, potentiatrices, stabilisatrices, ou des translecteurs.

Nous avons donc montré que le VX-770 est efficace pour un second transporteur de la famille ABC : ABCB4 et ses variants S1176L, G535D, G536R, S1076C et G1178S. Ces résultats laissent supposer que le VX-770 pourrait agir comme potentiateur pour d'autres transporteurs ABC impliqués dans des pathologies. Le spectre d'utilisation du VX-770 pourrait ainsi être accru et permettre de soigner d'autres patients. Il serait également intéressant de tester d'autres potentiateurs comme le GLPL1837 pour comparer son efficacité avec le VX-770 et voir s'il est efficace sur les mêmes mutants ou une sélection différente de mutants (Yeh 2017).

La kinase MRCK α partenaire du N-terminal d'ABCB4 régule l'internalisation d'ABCB4

Pour développer de nouvelles molécules thérapeutiques, il est important de comprendre les mécanismes fondamentaux régissant l'expression, le trafic, et l'activité d'ABCB4.

Le domaine N-terminal d'ABCB4 est sans homologie de séquence avec ceux des autres transporteurs ABC. De plus, des mutants situés dans le domaine N-terminal d'ABCB4 ont été identifiés chez des patients atteints de PFIC3 et de syndrome LPAC, indiquant l'importance ce domaine. Notre équipe a montré que le domaine N-terminal d'ABCB4 contient plusieurs résidus sérines et thréonines phosphorylables *in vitro* par les kinases PKA et PKC. Leur phosphorylation permet de réguler l'activité de sécrétion de PC d'ABCB4. En effet, l'activité d'ABCB4 diminue drastiquement en l'absence de phosphorylation (Gautherot 2014). D'autre

part, ce domaine contient une zone chargée positivement pouvant constituer une zone d'interaction avec des partenaires protéiques, en particulier avec des kinases.

Pour ces raisons, notre équipe a fait réaliser un crible en double hybride dans une banque d'ADN de foie humain pour rechercher des partenaires du domaine-terminal d'ABCB4. La sérine thréonine kinase MRCK α est l'un des partenaires protéiques identifié lors de ce crible. Cette kinase a été découverte en 1998 grâce à son interaction avec la GTPase Cdc42. Lorsque Cdc42 est sous forme GTP, elle peut interagir avec MRCK α et l'activer. Une fois activée, MRCK α est transloquée à la membrane plasmique où elle permet entre autres d'activer la chaîne légère de myosine II MLC2 en la phosphorylant. Le cytosquelette d'actine peut alors être remodelé, entraînant différents événements : endocytose, exocytose, migration cellulaire (Figure 60).

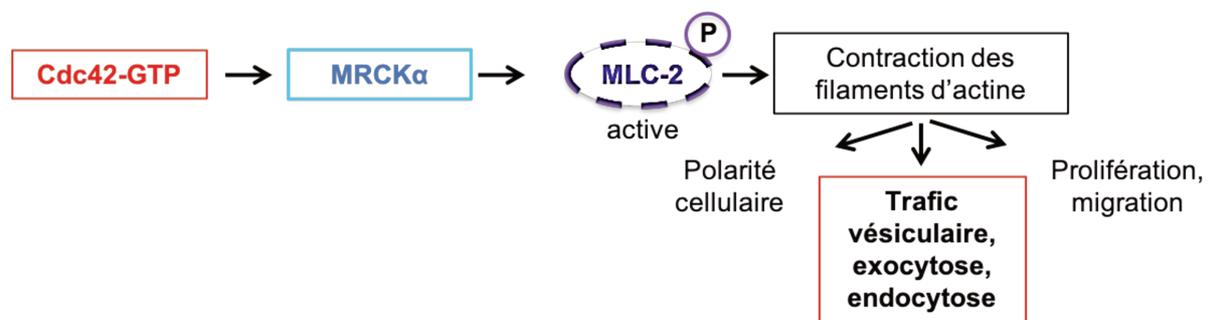


Figure 60 : La voie de signalisation Cdc42/MRCK α /MLC2 est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine. La GTPase Cdc42 sous forme liée au GTP active la kinase MRCK α . Une fois activée, MRCK α peut phosphoryler MLC2 sur sa sérine 19 et aider à la maintenir active en inhibant la phosphatase de MLC2. MLC2 permet alors le remodelage du cytosquelette d'actine, un processus impliqué dans de nombreux événements : mise en place et maintien de la polarité, migration cellulaire, trafic vésiculaire, endocytose.

Dans le but de comprendre le rôle de cette interaction, notre stratégie a consisté à inhiber cette kinase par différents moyens, inhibiteur chimique, mutant dominant négatif, ARN interférent ou CRISPR-Cas9. Avec chaque méthode, nous avons observé une augmentation de la forme mature d'ABCB4 en western-blot, mais pas de modification de sa localisation à la membrane plasmique en immunofluorescence. De plus, des résultats de RT-qPCR nous ont permis de déterminer que la transcription d'ABCB4 n'est pas modifiée lors de l'inhibition de MRCK α . Des mécanismes post-traductionnels sont donc à l'origine de cette augmentation. De nombreuses kinases ont été étudiées pour leur implication dans la régulation post-traductionnelle de l'expression des transporteurs ABC canaliculaires. Différentes isoformes de PKC, les kinases PKA, PI3K, Pim-1, ou encore Fyn interagissent avec ABCB1, ABCC2 ou ABCB11 pour réguler leur adressage à la membrane canaliculaire ou leur endocytose (Beuers

2001, Cantore 2011, Chan 2005, Homolya 2014, Kubitz 2001, Kurz 2001, Misra 1998, Schonhoff 2013, Woods 2011).

Lorsque l'on ré-exprime MRCK α -WT dans des cellules KO pour cette protéine, on observe une diminution de la forme mature d'ABCB4 en western blot. De plus, un marquage membranaire d'ABCB4 en immunofluorescence sur des cellules KO non perméabilisées montre que lorsque MRCK α -WT est ré-exprimé dans ces cellules, la forme membranaire d'ABCB4 est diminuée. En outre, l'absence de MRCK α dans les cellules ne fait apparaître aucun marquage d'ABCB4 dans des compartiments intracellulaires tels que l'appareil de Golgi, le SAC ou les endosomes. Nos différentes expériences nous ont donc permis de mettre en évidence l'implication de la kinase MRCK α dans l'internalisation d'ABCB4.

Pour le confirmer, il faudrait reproduire ces expériences en présence de dynasore, un inhibiteur de l'endocytose clathrine-dépendante. D'autres kinases, MARCKS, Fyn, PKC sont impliquées dans l'endocytose de transporteurs ABC (Cantore 2011, Chai 2015, Schonhoff 2013). L'inhibition de MARCKS ou de Fyn empêche l'internalisation des transporteurs ABCB11 et ABCC2. De la même façon, lorsque la kinase MRCK α est inactive ou absente, ABCB4 s'accumule à la membrane sans possibilité d'être internalisé (Figure 61). Le rôle de MRCK α dans l'endocytose a d'ailleurs été suggéré pour le récepteur de transferrine TfR mais n'a pas encore été démontré (Cmejla 2010).

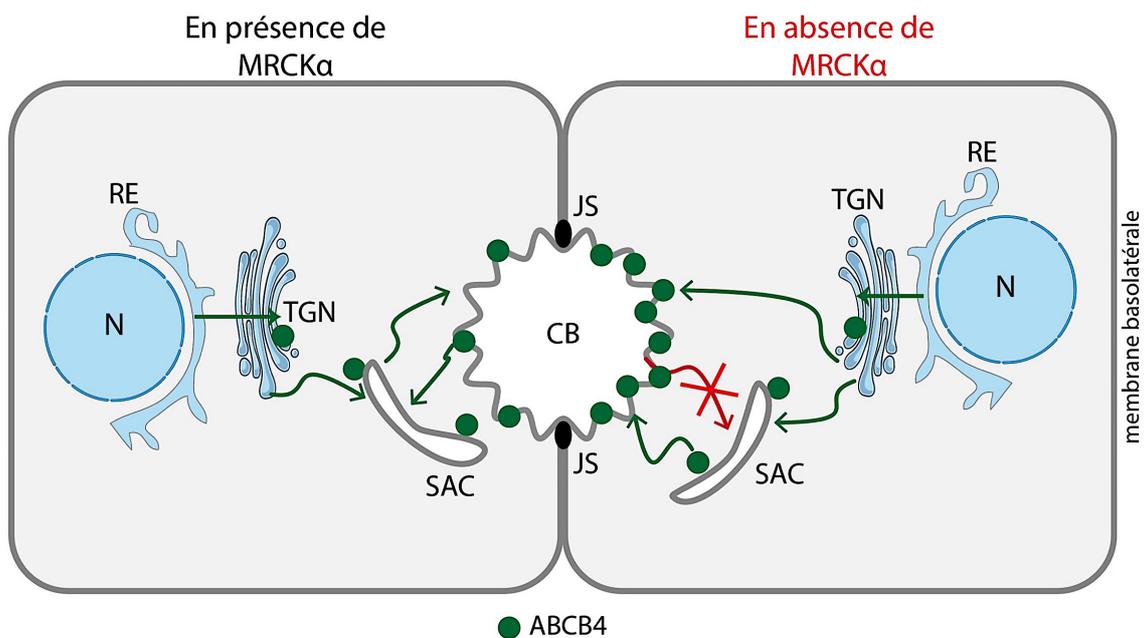


Figure 61 : MRCK α régule l'internalisation d'ABCB4. Lorsque la kinase MRCK α est inhibée ou que son expression est éteinte, la forme membranaire d'ABCB4 s'accumule, montrant l'implication de cette kinase dans la régulation de l'internalisation d'ABCB4.

Un autre résultat intéressant suite à l'extinction de MRCK α est l'augmentation de la stabilité du mutant de classe IV ABCB4-T424A. Notre équipe a en effet publié une étude décrivant cinq classes répartissant les mutations identifiées chez les patients atteints de PFIC3. Les mutants de classe IV, comprenant le variant T424A, sont responsables d'une diminution de la stabilité d'ABCB4 (Delaunay 2016). La possibilité de corriger ce défaut de stabilité en inhibant un partenaire protéique tel que la kinase MRCK α ouvre donc des perspectives thérapeutiques pour les patients atteints de PFIC3 porteurs de mutations de classe IV. Néanmoins, malgré une stabilité et une expression accrue, le mutant ABCB4-T424A n'est pas plus actif.

La sérine thréonine kinase MRCK α est donc impliquée dans l'adressage d'ABCB4 mais probablement aussi dans la régulation de son activité, lui conférant un double rôle. En effet, malgré l'importante augmentation d'ABCB4 à la membrane, aucun effet n'est observé sur l'activité de sécrétion de PC alors que nous nous attendions à une augmentation. Notre groupe a montré qu'en l'absence de phosphorylation de son domaine N-terminal, l'activité d'ABCB4 était diminuée de 40 à 60% (Gautherot 2014). Si nos expériences de phosphorylation *in vitro* confirment l'hypothèse que nous faisons et montrent que MRCK α phosphoryle des résidus sérines et thréonines du domaine N-terminal d'ABCB4, nous pourrions expliquer cette absence d'augmentation de l'activité lorsque l'expression de la kinase est éteinte. En effet, si MRCK α phosphoryle ABCB4 et contribue ainsi à ce que le transporteur de PC ait une activité optimale, alors lorsque l'on éteint son expression par CRISPR-Cas9, l'activité d'ABCB4 devrait diminuer. Mais comme sa quantité à la membrane est augmentée de 2 à 4 fois, cette diminution d'activité serait compensée. En l'absence de MRCK α , on observerait donc plus d'ABCB4 à la membrane mais moins actif.

La régulation de l'internalisation d'ABCB4 par MRCK α se fait via son effecteur MLC2, partenaire du linker d'ABCB4

Ces résultats nous ont incité à investiguer le rôle de la chaîne légère de myosine II MLC2. La protéine MLC2 est non seulement un effecteur de MRCK α impliqué dans le remodelage du cytosquelette d'actine et l'endocytose, mais également un partenaire du linker d'ABCB4 (Chan 2005, Li 2016). Néanmoins, le rôle de l'interaction d'ABCB4 avec MLC2 n'a jamais été élucidé. MLC2 est activée directement et indirectement par la kinase MRCK α . Celle-ci peut activer directement MLC2 en la phosphorylant sur sa sérine 19 mais aussi la maintenir active en inhibant sa phosphatase (Figure 59) (Leung 1998, Zhao 2015). MLC2 peut ainsi activer les

chaînes lourdes de myosine II non musculaire, NMII, et permettre l'interaction du complexe de myosine II avec les microfilaments d'actine (Park 2011).

Notre hypothèse était que l'effet de MRCK α sur l'internalisation d'ABCB4 passe par son effecteur MLC2. Nous avons tout d'abord confirmé l'interaction dans notre modèle cellulaire par co-immunoprécipitation. Nous avons ensuite reproduit l'expérience de « sauvetage » dans les cellules KO-MRCK α mais en surexprimant MLC2-WT à la place de MRCK α -WT. Cette expérience montre clairement un rôle commun de ces deux partenaires dans la régulation de l'expression d'ABCB4. En effet, la surexpression de MLC2-WT a le même effet que celle de MRCK α -WT, à savoir, une diminution de l'expression d'ABCB4 qui est de nouveau équivalente à celle du contrôle.

Notre stratégie a ensuite été identique à celle utilisée pour MRCK α . Nous avons donc inhibé la protéine MLC2 par différents moyens : mutant dominant négatif, ARN interférent ou CRISPR-Cas9. Cette approche a donné lieu à des résultats très intéressants puisqu'en inhibant ou en éteignant MLC2 nous avons obtenu les mêmes effets sur ABCB4 que lorsque MRCK α est inhibé. En effet, ni la localisation d'ABCB4 ni son profil de maturation ne sont modifiés, mais on observe une augmentation de la forme mature en western blot et une augmentation de sa stabilité en présence de cycloheximide. De plus, l'activité de sécrétion de PC d'ABCB4 augmente de 20% dans les cellules KO pour MLC2 comparé aux cellules contrôles. Une augmentation de l'activité d'ABCB1 a également été mise en évidence lorsque la phosphorylation de MLC2 est inhibée, suggérant un mécanisme commun (Bajaj 2010). Concernant ABCB4, ce résultat démontre indirectement que la forme d'ABCB4 qui est augmentée est bien membranaire. Il faudrait réaliser un marquage membranaire dans des cellules KO pour Myl12b en condition contrôle ou suite au sauvetage afin de le confirmer. De plus, l'augmentation de l'activité d'ABCB4 suite à l'extinction ou l'inhibition de MLC2 conforte notre hypothèse au sujet du rôle de MRCK α dans la régulation de l'activité de sécrétion de PC. En effet, nous supposons que la kinase MRCK α , comme les kinases PKA et PKC, phosphoryle le N-terminal d'ABCB4, régulant ainsi positivement l'activité du transporteur. Ainsi lorsque MRCK α est inactive ou absente, la forme membranaire d'ABCB4 est augmentée mais sous forme moins active, expliquant qu'il n'y ait pas de hausse de la sécrétion de PC dans les cellules KO-MRCK α . Au contraire, dans les cellules KO-MLC2, la kinase est présente et active. En l'absence de MLC2, la forme membranaire d'ABCB4 augmentée est donc une forme active pouvant être phosphorylée par MRCK α , expliquant la

hausse de l'activité. Des expériences visant à mesurer l'activité de mutants de classe IV lorsque MLC2 est inhibé sont en cours.

Pour la première fois, nous avons mis en évidence que l'inhibition d'un partenaire protéique d'ABCB4 permet d'augmenter la stabilité de la protéine à la membrane et son activité de sécrétion de PC. Ces résultats sont particulièrement intéressants pour les mutants de classe IV qui présentent un défaut de stabilité (Delaunay 2016). En effet, la possibilité de les stabiliser ouvre des perspectives pour le développement de pharmacothérapies ciblées pour les patients atteints de PFIC3 porteurs de mutations de classe IV.

La sérine thréonine kinase MRCK α , activée par la GTPase Cdc42, phosphoryle MLC2. Une fois active, MLC2 induit un remodelage de l'actine corticale, ce qui favoriserait l'endocytose clathrine dépendante d'ABCB4 et la fission des vésicules d'endocytose à l'aide du complexe hexamérique de myosine II non musculaire (Figure 62).

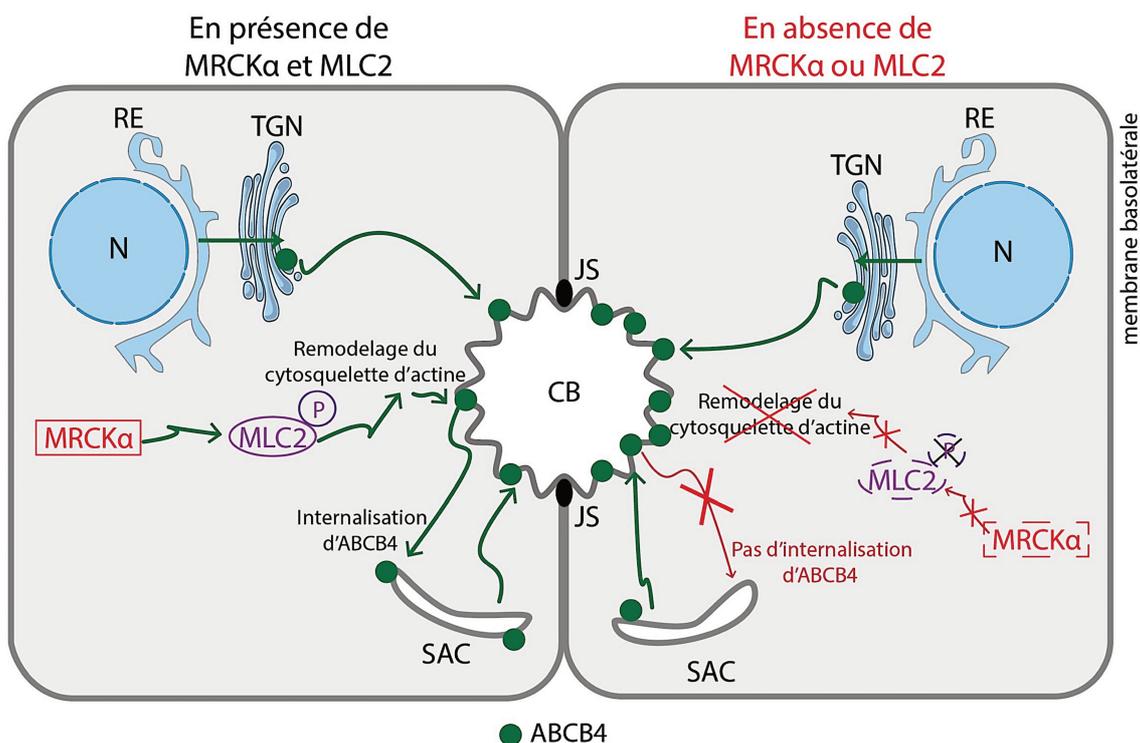


Figure 62 : L'effet de MRCK α sur l'internalisation d'ABCB4 passe par son effecteur MLC2. En condition contrôle, ABCB4 est adressé au canalicule biliaire. MRCK α est présente et peut être activée, la kinase peut alors phosphoryler MLC2 sur sa sérine 19, ce qui permet l'interaction de la myosine avec l'actine et donc le remodelage du cytosquelette. ABCB4 peut alors être internalisé et stocké dans le SAC ou dégradé. En l'absence de l'un de ces partenaires protéiques, le cytosquelette d'actine ne peut plus être remodelé et ABCB4 est bloqué à la membrane. Le transporteur peut toujours être adressé au canalicule mais ne peut plus être internalisé, on observe donc une accumulation de la forme mature d'ABCB4.

Les résultats de deux études portant sur le récepteur de transferrine TfR montrent que dans des cellules KO pour les isoformes de chaînes lourdes NMIIA et NMIIB, l'endocytose de TfR est inhibée (Chandrasekar 2014). De plus, il a été montré que MRCK α colocalise avec TfR à la membrane plasmique et que l'extinction de son expression diminue l'absorption de fer. Les auteurs suggèrent donc qu'en l'absence de MRCK α , l'endocytose de TfR est inhibée, expliquant la diminution de l'assimilation de fer (Cmejla 2010).

La voie Cdc42 / MRCK α / MLC2 en physiopathologie biliaire

Différentes études ont montré l'implication de la GTPase Cdc42 et de la voie ROCK/MLC2 dans des processus pathologiques dans le foie (Burbank 2016, Sharanek 2016, van Hengel 2008, Xie 2011, Yuan 2009). Un modèle de souris KO pour la GTPase Cdc42 spécifiquement dans les hépatocytes a été généré. Ces souris présentent une jaunisse et une élévation sérique marquée des ALT, AST, ALP et de la bilirubine. Au niveau cellulaire, à deux mois, les souris présentent une dilatation des canalicules biliaires et la diminution du nombre de microvillosités, sans modification de l'expression et de la localisation des protéines de jonction, ZO-1, claudine-1, occludine, E-cadhérine. A huit mois, les foies des souris présentent des caractéristiques de CHC (van Hengel 2008). La régénération du foie suite à une hépatectomie partielle chez les souris KO pour Cdc42 dans les hépatocytes est retardée par rapport aux souris sauvages. Les auteurs ont également observé une augmentation des ALT, AST et des acides biliaires circulants chez ses souris avant l'hépatectomie. De plus, en l'absence de Cdc42, la localisation du transporteur de cholestérol ABCA1 est modifiée dans les hépatocytes. Bien que toujours à la membrane, les auteurs constatent une disparition de son marquage périnucléaire mais n'ont pas investigué ce résultat plus en détails (Yuan 2009). Ce même modèle de souris a été utilisé pour étudier le trafic du transporteur canaliculaire de cholestérol NPC1L1. En l'absence de Cdc42 dans les hépatocytes, NPC1L1 est absent des membranes canaliculaires, montrant un rôle de Cdc42 dans l'adressage de NPC1L1 au canalicule biliaire (Xie 2011).

Ces trois études montrent un rôle de Cdc42 dans le développement de phénotypes cholestatiques chez les souris, ainsi que dans le trafic de différents transporteurs apicaux chez ces animaux. Étudier l'expression, la localisation et l'activité d'ABCB4 dans ce modèle murin serait très informatif et permettrait de voir si le phénotype est le même que lorsque nous inhibons MRCK α et MLC2. Nous serions alors en mesure de déterminer si la voie MRCK α /MLC2 est régulée par la GTPase Cdc42.

Deux études récentes ont montré l'implication d'une dizaine de composés connus pour provoquer des DILI dans la voie ROCK / MLC2. Ces composés peuvent être divisés en deux sous-familles : ceux qui activent la kinase ROCK, entraînant une phosphorylation permanente de MLC2 et une constriction des canalicules biliaires, et ceux inhibant ROCK donc la phosphorylation de MLC2 avec comme effet une dilatation des canalicules biliaires (Sharanek 2016). De plus, l'expression de plusieurs transporteurs des acides biliaires est modulée par ces composés. L'expression d'ABCB11 et de NTCP est inhibée par tous les composés, alors que celle d'ABCC2, ABCC3 et ABCC4 est globalement surexprimée (Burbank 2016). Il serait intéressant de reproduire ces expériences avec MRCK α à la place de ROCK pour voir si ces deux kinases sont à l'origine de mécanismes communs dans le développement de cholestases. Aussi, l'étude de l'expression, la localisation et l'activité d'ABCB4 dans ces expériences permettrait de compléter les résultats que nous avons obtenus dans nos modèles cellulaires.

Le rôle des protéines Cdc42, MLC2 et de la kinase ROCK, proche de MRCK α , ont été mis en évidence dans le développement de phénotypes cholestatiques dans deux modèles différents. Nos résultats, renforcés par les données de la littérature, montrent un rôle clé de la voie Cdc42/MRCK α /MLC2 dans la régulation de l'expression membranaire du transporteur hépatobiliaire de phosphatidylcholine ABCB4.

-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES-

Les travaux réalisés au cours de ma thèse se sont d'une part intéressés à des mutations identifiées chez des patients et situées dans les sites de liaison à l'ATP d'ABCB4, d'autre part au rôle de l'interaction d'ABCB4 avec la kinase MRCK α et son effecteur, la chaîne légère de myosine MLC2.

La première partie de ce travail a été initiée grâce à une collaboration mise en place par mon équipe avec Isabelle Callebaut (Institut de Minéralogie et Physique des Milieux Condensés, UMR7590, CNRS-Sorbonne Université), une spécialiste de la modélisation structurale des transporteurs ABC et de l'impact des mutations sur leur fonction. Cette stratégie novatrice associant modélisation 3D et études *in vitro* nous a permis de mettre en évidence que cinq mutations pathologiques localisées dans les motifs conservés des sites de liaison à l'ATP d'ABCB4 sont responsables d'un défaut de fonction du transporteur. L'utilisation du VX-770, une molécule utilisée en clinique pour soigner les patients atteints de mucoviscidose permet de restaurer partiellement l'activité des cinq mutants de classe III d'ABCB4. C'est la première fois qu'une molécule est identifiée pour corriger des mutations de classe III qui touchent l'activité de sécrétion de phosphatidylcholine d'ABCB4. Ces travaux ont été publiés et représentent une avancée majeure dans l'optique de développer des alternatives thérapeutiques pour le traitement des patients en fonction de leur variant. A terme, le repositionnement du VX-770 constituera une alternative de choix à la transplantation hépatique pour les patients atteints de maladies biliaires liées à un défaut d'ABCB4, notamment la PFIC3. La suite de ce travail consiste à déterminer si le VX-770 a un effet bénéfique sur d'autres mutants de classe III. Il faudrait également le tester en combinaison, par exemple avec des chaperonnes, pour corriger l'adressage et l'activité de mutants de classe II d'ABCB4.

L'étude du rôle de partenaires protéiques d'ABCB4 identifiés suite à un crible double hybride constitue la deuxième partie de mon travail. Notre équipe ayant montré l'importance de la phosphorylation de plusieurs résidus sérines et thréonines *in vitro* dans la régulation de l'activité d'ABCB4, nous nous sommes particulièrement intéressés à la sérine thréonine kinase MRCK α identifiée lors de ce crible. MRCK α active la chaîne légère de myosine II non musculaire MLC2, impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Suite à l'inhibition de MRCK α , l'expression de la forme mature d'ABCB4 augmente. Nous avons montré que cette

kinase joue un rôle dans la régulation de l'expression membranaire d'ABCB4 en contrôlant son internalisation depuis la membrane plasmique. Nous avons également montré que l'extinction de l'expression de la kinase MRCK α permet d'augmenter la stabilité de mutants de classe IV (mutants instables) d'ABCB4. Nous poursuivons l'étude de l'interaction entre ABCB4 et MRCK α , en particulier par des expériences de phosphorylation *in vitro*. En effet, notre hypothèse est que cette kinase aurait une seconde fonction en régulant l'activité d'ABCB4 par phosphorylation des résidus sérines et thréonines de son domaine N-terminal.

Enfin, la dernière partie de ce travail avait pour but de déterminer si les effets de MRCK α sur l'expression d'ABCB4 passent par son effecteur MLC2. D'autant plus parce que MLC2 est un partenaire du linker d'ABCB4 dont le rôle n'a jamais été élucidé. Nous avons montré que l'extinction de MLC2 augmente l'expression de la forme mature d'ABCB4, sa stabilité ainsi que son activité de sécrétion de phosphatidylcholine, confirmant bien que la forme augmentée est membranaire. De plus, lorsque MLC2-WT est surexprimée dans les cellules KO MRCK α , l'expression d'ABCB4 diminue jusqu'à atteindre un niveau d'expression équivalent au contrôle. Ces résultats confirment notre hypothèse : MRCK α active MLC2 qui en remodelant l'actine corticale permet l'internalisation d'ABCB4. L'élucidation des mécanismes régulant l'internalisation et la stabilité d'ABCB4 est fondamentale et permettra d'orienter les recherches vers de nouveaux champs d'intervention thérapeutique en ciblant directement ces deux partenaires ou une des voies de signalisation dans lesquelles ils sont impliqués pour améliorer l'expression de variants d'ABCB4 identifiés chez des patients.

-ANNEXES-

Tableau 1. Transporteurs ABC chez l'Homme

Transporteur	Location chromosomique	Fonction	Pathologie associée
ABCA1	9q31.1	Transport de cholestérol	Maladie de Tangier
ABCA2	9q34.3	Résistance aux médicaments	
ABCA3	16p13.3	Sécrétion de surfactant pulmonaire	Pneumopathie
ABCA4	1p22.1	Transport de phospholipides (NR-PE ; ATR)	Maladie de Stargardt, Diverses maladies oculaires
ABCA5	17q24.3		Le syndrome de fibromatose gingivale-hypertrichose
ABCA6	17q24.3	Transport de cholestérol ?	
ABCA7	19p13.3		
ABCA8	17q24.3		
ABCA9	17q24.3		
ABCA10	17q24.3		
ABCA12	2q34		Ichtyoses congénitales
ABCA13	7p12.3		
ABCB1	7q21.12	Résistance aux médicaments	Résistance aux anti-cancéreux
ABCB2	6p21.3	Présentation de peptides antigéniques	Déficience immunitaire
ABCB3	6p21.3	Présentation de peptides antigéniques	Déficience immunitaire
ABCB4	7q21.12	Sécrétion de phosphatidylcholine	PFIC3
ABCB5	7q21.1		
ABCB6	2q35	Synthèse de l'hème	Colobome oculaire ?
ABCB7	Xq21-q22	Transport de fer	Anémie sidéroblastique liée à l'X avec ataxie
ABCB8	7q36.1		
ABCB9	12q24.31		
ABCB10	1q42.13		
ABCB11	2q24.3	Transport d'acides biliaires	PFIC2
ABCC1	16p13.12	Résistance aux médicaments	Résistance aux anti-cancéreux
ABCC2	10q24.2	Bilirubine conjuguée	Syndrome de Dubin-Johnson
ABCC3	17q21.33		
ABCC4	13q32.1	Transport de GSH, bilirubine, acides biliaires	

ABCC5	3q27.1	Transport de GSH, bilirubine, acides biliaires	
ABCC6	16p13.12	Transport d'ATP	Pseudoxanthome élastique (PXE)
ABCC7/ CFTR	7q31.31	Transport d'ions chlorures	Mucoviscidose
ABCC8	11p15.1	Régulation d'un canal potassium, associé à la sécrétion d'insuline	Hyperinsulinisme
ABCC9	12p12.1	Régulation de canal potassium	
ABCC10	6p21.1		
ABCC11	16q12.1		
ABCC12	16q12.1		
ABCD1	Xq28	Transport d'acides gras à très longues chaînes (AGTLC)	Adrénoleucodystrophie liée à l'X
ABCD2	12q11		
ABCD3	1p22.1		
ABCD4	14q24.3	Transport de cobalamine	
ABCE1	4q31.31		
ABCF1	6p21.1	Phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2	
ABCF2	7q36.1		
ABCF3	3q27.1		
ABCG1	21q22.3	Efflux de cholestérol	
ABCG2	4q22	Résistance aux médicaments	Résistance aux anti-cancéreux
ABCG4	11q23	Transport de cholestérol ?	
ABCG5	2p21	Transport de stérols	Sitostérolémie
ABCG8	2p21	Transport de stérols	Sitostérolémie

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Structural analogues of roscovitine rescue the intracellular traffic and the function of ER-retained ABCB4 variants in cell models

Received: 13 December 2018
Accepted: 16 April 2019
Published online: 30 April 2019

Virginie Vauthier¹, Amel Ben Saad¹, Jonathan Elie², Nassima Oumata², Anne-Marie Durand-Schneider¹, Alix Bruneau¹, Jean-Louis Delaunay¹, Chantal Housset^{1,3}, Tounsia Aït-Slimane¹, Laurent Meijer² & Thomas Falguières¹

Adenosine triphosphate binding cassette transporter, subfamily B member 4 (ABCB4) is the transporter of phosphatidylcholine at the canalicular membrane of hepatocytes. ABCB4 deficiency, due to genetic variations, is responsible for progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3) and other rare biliary diseases. Roscovitine is a molecule in clinical trial that was shown to correct the F508del variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), another ABC transporter. In the present study, we hypothesized that roscovitine could act as a corrector of ABCB4 traffic-defective variants. Using HEK and HepG2 cells, we showed that roscovitine corrected the traffic and localisation at the plasma membrane of ABCB4-I541F, a prototypical intracellularly retained variant. However, roscovitine caused cytotoxicity, which urged us to synthesize non-toxic structural analogues. Roscovitine analogues were able to correct the intracellular traffic of ABCB4-I541F in HepG2 cells. Importantly, the phospholipid secretion activity of this variant was substantially rescued by three analogues (MRT2-235, MRT2-237 and MRT2-243) in HEK cells. We showed that these analogues also triggered the rescue of intracellular traffic and function of two other intracellularly retained ABCB4 variants, *i.e.* I490T and L556R. Our results indicate that structural analogues of roscovitine can rescue genetic variations altering the intracellular traffic of ABCB4 and should be considered as therapeutic means for severe biliary diseases caused by this class of variations.

ABCB4, also called MDR3, is a member of the ATP Binding Cassette (ABC) superfamily. Its expression is mainly restricted to the canalicular membrane of hepatocytes where its function is to flop phosphatidylcholine (PC) from the inner leaflet to the outer leaflet of the plasma membrane, thus allowing its secretion into bile (for reviews, see^{1,2}). At the molecular level, secreted PC has an essential role since it forms mixed micelles with the other co-secreted hydrophobic bile components, such as bile salts and cholesterol, as first proposed by Admirand and Small³. Indeed, impairment of PC secretion into bile leads to the formation of cholesterol crystals and gallstones, as well as loss of protection from the detergent effects of free bile salts on biological membranes of the biliary tree^{4,5}. These clinical characteristics have been largely reported for patients with rare biliary diseases such as progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3), low-phospholipid associated cholelithiasis syndrome or intrahepatic cholestasis of pregnancy^{6–8}. These diseases are correlated with genetic variations of the *ABCB4* gene, most of them being missense variations (see^{2,9,10} and references therein, as well as <http://abcmutations.hegelab.org/proteinDetails?pid=63>). For patients with ABCB4-related biliary diseases, the only pharmacological treatment is the administration of ursodeoxycholic acid (UDCA), a bile acid with low hydrophobicity¹¹. Although this therapy is efficient in the milder forms of the diseases^{12,13}, UDCA is not – or poorly – efficient in the majority of

¹Inserm, Sorbonne Université, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), UMR_S 938, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), F-75012, Paris, France. ²ManRos Therapeutics, Hôtel de Recherche, Centre de Perharidy, F-29680, Roscoff, France. ³Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Centre de Référence des Maladies Rares - Maladies Inflammatoires des Voies Biliaires & Service d'Hépatologie, F-75012, Paris, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.F. (email: thomas.falguieres@inserm.fr)

homozygous or compound heterozygous patients with severe forms of ABCB4-related diseases for whom the only alternative remains liver transplantation^{14,15}. Thus pharmacological alternatives are eagerly needed.

The effect of ABCB4 genetic variations can be classified in five categories, as we recently proposed⁹: no expression of the protein (class I); intracellular retention (class II); impairment of PC secretion activity (class III); defect of protein stability at the canalicular membrane (class IV); no apparent defect (class V). The goal of this classification was to identify targeted pharmacotherapies for the different classes of ABCB4 variants in the frame of personalized medicine¹⁰. We showed that impaired PC secretion activity of class III ABCB4 variants was corrected by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/ABCC7 potentiator VX-770/Ivacaftor^{9,16}. Concerning class II variants, cyclosporins have been shown to correct the maturation and the intracellular localisation of endoplasmic reticulum (ER)-retained variants in cell models^{9,17–19}. However, cyclosporin A (CsA) inhibits the PC secretion activity of ABCB4¹⁸, as this is also the case for its close homologue ABCB1/MDR1^{20,21}. This clearly indicated that new potential correctors of class II ABCB4 variants had to be sought.

In the present study, we investigated (R)-roscovitine and some newly synthesized analogues as potential correctors for ER-retained ABCB4 variants in Human Embryonic Kidney (HEK) and HepG2 cell models. (R)-roscovitine, also known as Seliciclib or CYC202 and hereafter referred to as roscovitine, is a 2,6,9-trisubstituted purine that was identified as a relatively potent and selective Cyclin-Dependent Kinase (CDK) inhibitor^{22–24}. Roscovitine has undergone numerous studies in many indications up to clinical phase trials in various cancers, rheumatoid arthritis, glaucoma and cystic fibrosis (for a review, see²⁴). Interestingly, roscovitine has been shown to correct the intracellular localisation and the channel activity of the F508del ER-retained variant of CFTR/ABCC7²⁵. Here, we showed that newly synthesized roscovitine analogues correct the maturation, the canalicular expression and more importantly the function of three distinct ER-sequestered ABCB4 variants.

Results

Roscovitine rescues the maturation and the canalicular localisation of the I541F ER-retained ABCB4 variant. In this study, we used ABCB4-I541F, a prototypical ER-retained variant of ABCB4, first identified in a homozygous PFIC3 patient⁷, and further characterized in our laboratory^{17,26}. Indeed, ABCB4-I541F has been shown to be retained in the ER as an immature and high-mannose glycosylated protein²⁶, characterized by the absence or low abundance of a mature protein band on immunoblot, compared to the WT protein (Fig. 1A). We have previously demonstrated that the maturation and the localisation at the canalicular membrane of ABCB4-I541F could be partially rescued upon temperature shift of cell culture at 27 °C or treatment with the ABCB1/MDR1 substrate CsA^{17,26}. Since roscovitine at 100 μM was described to correct the function of the F508del ER-retained CFTR/ABCC7 variant²⁵, we investigated the potential correction of ABCB4-I541F by this molecule. Such treatment led to the correction of the maturation of ABCB4-I541F in HEK cells (Fig. 1A), as shown by the quantification of immunoblots (Fig. 1B). These results were confirmed by indirect immunofluorescence analyses in HepG2 cells, a hepatocellular carcinoma derived cell line forming pseudo-bile canaliculi in cell culture²⁷. Indeed, the increased maturation of ABCB4-I541F was associated with its relocalisation at the canalicular membrane after treatment with 100 μM roscovitine in HepG2 cells (Fig. 1C). However, roscovitine displayed important dose-dependent cytotoxicity (Fig. 1D) and inhibition of ABCB4-WT-mediated PC secretion activity in HEK cells (Fig. 1E), which compromises its relevance for further investigations.

Structural analogues of roscovitine rescue the maturation and the canalicular localisation of ABCB4-I541F. The cytotoxic effect induced by roscovitine might be explained by its CDK inhibition activity²². We thus synthesized structural analogues (Fig. 2A) potentially devoid of this feature. Aftin-4 is a methyl-roscovitine with reduced kinase inhibition activity^{28,29}, and M3 is the main hepatic metabolite of roscovitine. All other products are carboxylated analogues displaying much reduced kinase inhibition compared to the parent compound, roscovitine (Table 1). This indicates that carboxylation at the hydroxyl level and/or methylation at position N6 (Fig. 2A and Supplementary Fig. S1) strongly reduce CDK inhibition activity of these molecules. As expected, all roscovitine analogues with decreased CDK inhibition activity were less cytotoxic (Table 1 and Supplementary Fig. S1). Interestingly, in HEK cells, some of these analogues (MRT2-235, -237, -239, -241, -243, -245 and -249) were able to significantly increase the expression of a mature form of ABCB4-I541F while other analogues (Aftin-4, M3, MRT2-163 and MRT2-164) were not (Fig. 2B). The quantification of these results indicated a ~2.5 fold increase of expression of the mature form of ABCB4-I541F after treatment with 100 μM of the most potent roscovitine analogues (Fig. 2C). We then analysed the efficacy of the most potent analogues to correct the canalicular targeting of ABCB4-I541F in HepG2 cells. After 16 hours of treatment with 100 μM of these compounds, we observed partial relocalisation of ABCB4-I541F at bile canaliculi, as shown by its partial co-localisation with ABCC2 (Fig. 3). Altogether, these results demonstrate that the maturation and the canalicular localisation of ABCB4-I541F can be rescued by new structural analogues of roscovitine.

Structural analogues of roscovitine are less cytotoxic and less inhibitory of ABCB4 activity than roscovitine. To pursue this study, we decided to focus on three roscovitine analogues (MRT2-235, MRT2-237 and MRT2-243) which displayed significant rescue of the maturation and partial relocalisation of ABCB4-I541F at bile canaliculi (Figs 2B,C and 3). At concentrations lower than 100 μM, these analogues were much less cytotoxic than roscovitine in HEK cells (Fig. 4A). Indeed, the cell viability was still higher than 80% at 25 μM of the analogues while it was reduced to less than 60% at the same concentration for roscovitine (Fig. 4A). Furthermore, measurement of ABCB4-WT-mediated PC secretion in HEK cells indicated that the three roscovitine analogues were less inhibitory than the original molecule when used at 10 μM and 25 μM (Fig. 4B). The IC₅₀ on ABCB4-WT activity was 7.5 μM for roscovitine while it was 2.5 to 4.0 fold higher for its analogues (Fig. 4C and Table 2). It is also important to notice that treatment with roscovitine and these three analogues at 10, 25 and 100 μM do not

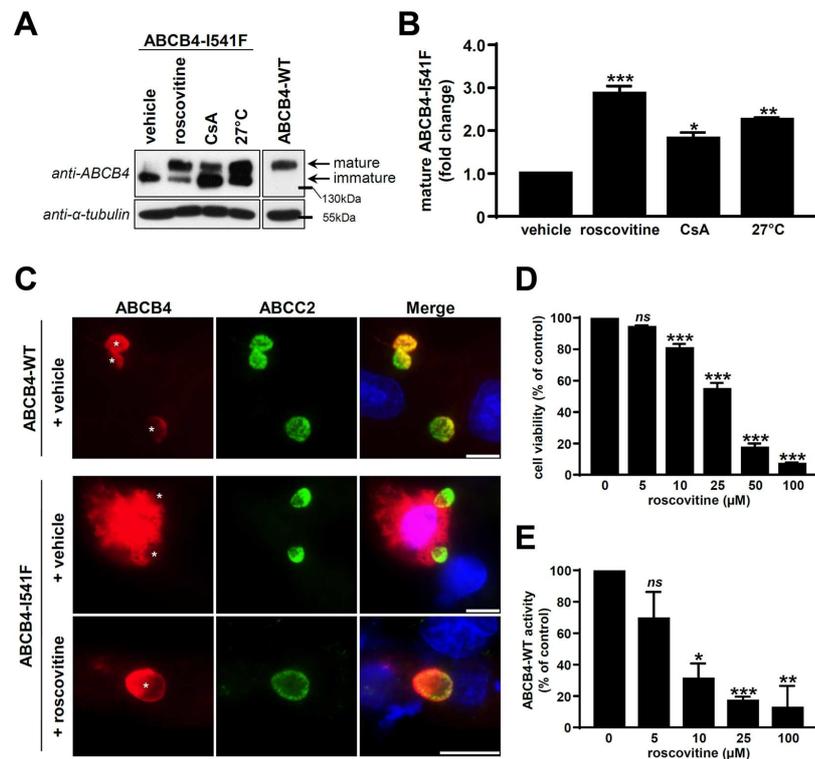


Figure 1. Roscovitine rescues the maturation and the traffic of ABCB4-I541F, but is cytotoxic and inhibitory of ABCB4 activity. (A) ABCB4-I541F was transiently expressed in HEK cells. After 16 hours of treatment with vehicle (DMSO), 100 μ M roscovitine, 10 μ M CsA or cell culture at 27°C, cell lysates were prepared and analysed by immunoblot using the indicated antibodies. ABCB4-WT expressed under the same conditions is shown as reference. The mature and immature forms of ABCB4 are indicated (arrows). This panel is representative of six independent experiments. Presented data were cropped from full immunoblots shown in Supplementary Fig. S3 and correspond to different exposure times. (B) Densitometry analysis of A. The percentage of the mature form of ABCB4 was quantified and then expressed as fold change compared to vehicle-treated cells. Means (\pm SEM) of six independent experiments are shown. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001. (C) ABCB4-WT or ABCB4-I541F were expressed in HepG2 cells. After 16 hours of treatment with vehicle (DMSO) or 100 μ M roscovitine, cells were fixed and permeabilized. After indirect immunofluorescence, ectopically expressed ABCB4 (red) and endogenous ABCC2 (green) were visualized by fluorescence microscopy. Nuclei shown in the merged images were labelled with Hoechst 33342 (blue). Asterisks in the left panels indicate bile canaliculi. This panel is representative of three independent experiments. Bars: 10 μ m. (D) HEK cells were treated with increasing concentrations of roscovitine during three days. Cell viability was assessed by MTT assay and expressed as a percentage of values for control vehicle-treated cells. Means (\pm SEM) of four independent experiments performed in triplicate are shown. *** P < 0.001; ns: not significant. (E) After transient expression of ABCB4-WT, HEK cells were treated with increasing doses of roscovitine. Then the capacity of these cells to secrete PC was assessed and represented as a percentage of the activity for vehicle-treated control cells (expressing ABCB4-WT) after background subtraction (see *Materials and Methods* for details). Means (\pm SEM) of at least three independent experiments performed in triplicate for each tested condition are shown. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; ns: not significant.

alter the plasma membrane localisation of ABCB4-WT in HEK cells (Supplementary Fig. S2). Thus, inhibition of ABCB4-mediated PC secretion by roscovitine and its analogues may be due to a direct effect of these compounds on ABCB4 function. Altogether, these results indicate that roscovitine analogues might be interesting ABCB4 correctors with low cytotoxicity and low inhibition activity of ABCB4.

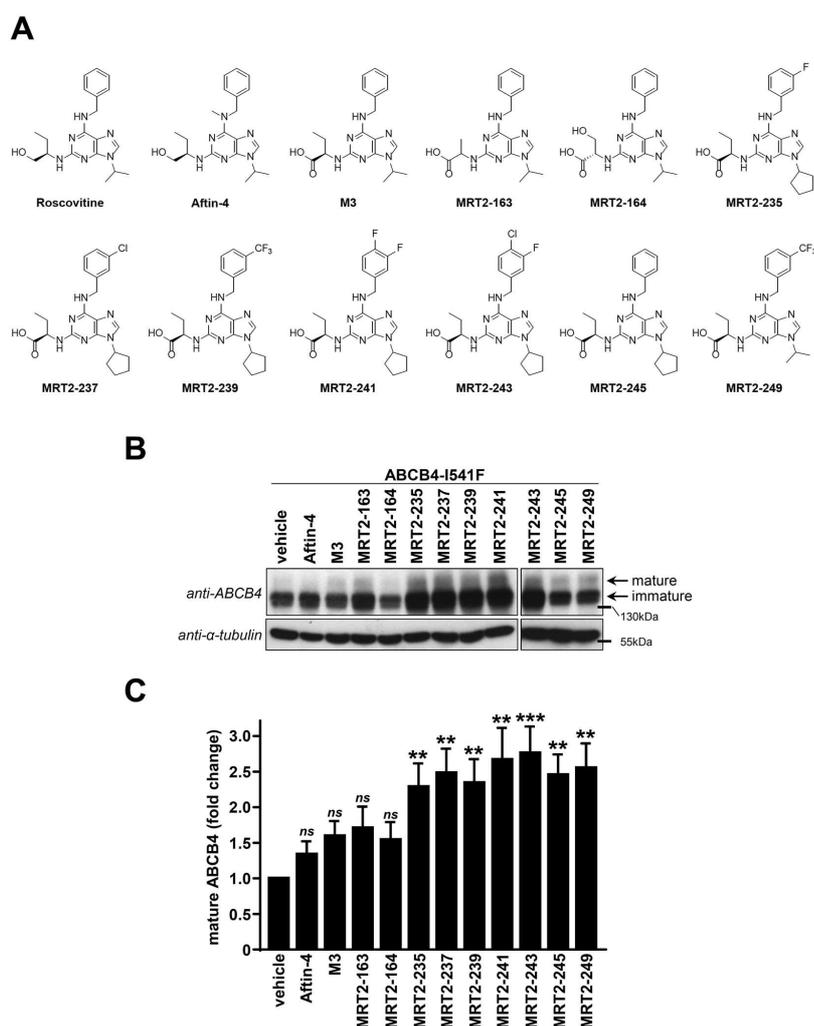


Figure 2. Structural analogues of roscovitine correct the maturation of ABCB4-I541F. **(A)** Structure of roscovitine and its analogues. **(B)** After transient expression of ABCB4-I541F and treatment with 100 μ M of the indicated compounds (or DMSO as vehicle), HEK cells were lysed and cell lysates were analysed by immunoblot using the indicated antibodies. The mature and immature forms of ABCB4 are shown. This panel is representative of five independent experiments. Presented data were cropped from full immunoblots shown in Supplementary Fig. S4. **(C)** Densitometry analysis of B. The percentages of the mature form of ABCB4 were quantified and then expressed as fold changes compared to the vehicle-treated condition. Means (\pm SEM) of five independent experiments are represented. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: not significant.

Roscovitine analogues rescue the maturation, the localisation and the activity of ABCB4-I541F.

The inhibition of ABCB4 activity induced by MRT2-235, MRT2-237 and MRT2-243 when used at 100 μ M led us to investigate these analogues at lower concentrations. After treatment with 5, 10 and 25 μ M of the three analogues, we observed a dose-dependent correction of ABCB4-I541F maturation in HEK cells (Fig. 5A; quantification in Fig. 5B). Treatment with 25 μ M of these analogues triggered partial relocalisation of ABCB4-I541F at bile canaliculi in HepG2 cells (Fig. 5C). Finally, we measured the PC secretion activity of ABCB4-I541F in HEK cells after treatment with or without roscovitine analogues at 25 μ M. Importantly, we noticed a marked correction

Kinases	CDK2/A ^a	CDK5/p25 ^a	CDK9/T ^a	CK1	CLK1	DYRK1A	GSK3
Roscovitine	0.080	0.210	0.533	4.3	2.9	3.33	>10
M3	9.0	20	>33	>33	>33	19	>10
MRT2-163	6.0	20	>33	20	>33	>10	>10
MRT2-164	2.2	10	17	28	>33	>10	>10
MRT2-235	5.9	8.3	7	7	11	21	>10
MRT2-237	3.4	7.7	9	3.33	8.5	13	>10
MRT2-239	8.0	11	20	4	9	21	>10
MRT2-241	5.1	17	8	11	13	20	>10
MRT2-243	3.0	6.3	5	6.1	20	12	>10
MRT2-245	6.3	15	28	17	13	21	>10
MRT2-249	9.0	27	>33	5.0	23	9	>10

Table 1. IC₅₀ of roscovitine and its analogues towards various protein kinases (μM). Abbreviations: CDK, cyclin-dependent kinase; CK1, casein kinase 1; CLK1, Cdc2-like kinase 1 (CLK1); DYRK1A, dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A; GSK3, glycogen synthase kinase 3B. ^aThe activators/regulators of CDKs are indicated after the slashes: A, cyclin A; p25, T, cyclin T.

of ABCB4-I541F activity from $7.1 \pm 0.8\%$ of residual activity with control treatment (vehicle) to $19.0 \pm 3.4\%$, $13.0 \pm 3.5\%$ and $22.5 \pm 6.2\%$ after treatment with 25 μM of MRT2-235, MRT2-237 and MRT2-243, respectively (Fig. 5D). Altogether, our results demonstrate that the three selected roscovitine analogues are able to retrieve the maturation and the canalicular localisation of the ER-retained ABCB4-I541F variant and to significantly correct its PC secretion activity.

Roscovitine analogues rescue the function of two other ER-retained ABCB4 variants. To extend this study, we analysed the effect of roscovitine analogues on two other ER-retained missense ABCB4 variants, I490T and L556R, identified in patients with liver cancer³⁰ or PFIC3⁷. Without treatment, these variants were mainly detected as immature proteins by immunoblot in HEK cells (Fig. 6A,B). However, after treatment with 5 to 25 μM of the three roscovitine analogues, we observed a dose-dependent rescue of the maturation of these two variants (Fig. 6A,B), as confirmed by the quantification of these experiments (Fig. 6C,D). These results were further validated by indirect immunofluorescence assays in HepG2 cells: both I490T and L556R variants were partially relocalised at bile canaliculi upon treatment with 25 μM of MRT2-235, MRT2-237 or MRT2-243 (Fig. 6E,F). As expected, the PC secretion activity of these two ER-retained variants in HEK cells was strongly impaired in vehicle-treated cells (Fig. 6G,H). However, after treatment with 25 μM of the three roscovitine analogues, we observed a significant increase of the residual activity of these variants (Fig. 6G,H). These results provide evidence that roscovitine analogues are able to rescue the localisation, the maturation and the PC secretion activity of several ER-retained ABCB4 variants.

Discussion

PFICs and hereditary cholestatic diseases in general represent a considerable fraction of indications for liver transplantation^{31,32}. In the absence of surgery and efficient pharmacological treatment able to cure patients, or at least to delay liver transplantation, the life expectancy is low³³. Roscovitine has been shown to partially rescue intracellular traffic and chloride channel activity of CFTR-F508del¹⁵. Thus, in this work, we investigated the possibility to repurpose this molecule in the frame of ABCB4-related diseases. While we observed that roscovitine was able to correct maturation and localisation of the ER-retained ABCB4-I541F variant in cell models, its important cytotoxicity and inhibition of ABCB4-WT function ruled out its use for further analyses. We then synthesized structural analogues of roscovitine, devoid of intrinsic CDK inhibition capacity (Table 1). Interestingly, three of these analogues (MRT2-235, MRT2-237 and MRT2-243) were less cytotoxic and less inhibitory of ABCB4-WT activity than the original molecule, and allowed partial rescue of the maturation and the localisation of distinct ER-retained ABCB4 variants. More importantly, these corrections were associated with a significant rescue of PC secretion for these variants. Thus, roscovitine analogues may be considered as good candidates in preclinical studies.

We and others have previously shown that cyclosporins, essentially CsA, are able to rescue the maturation and the cell surface localisation of ABCB4 defective variants^{9,17-19}. However, until now, attempts to rescue functional ABCB4 variants using substrates and/or inhibitors of ABCB1 such as CsA, FK506/Tacrolimus or Tariquidar were not successful¹⁸; our unpublished data), strengthening the requirement for developing new targeted pharmacotherapies. Here, we provide evidence that roscovitine analogues are efficient correctors of the intracellular traffic as well as the function of ER-retained ABCB4 variants. The chemical chaperone 4-phenylbutyrate, already used in clinics^{34,35}, has been shown to rescue other ER-retained ABCB4 variants³⁶, as well as defective variants of different ABC transporters¹⁰ and references therein). However, for patients who do not respond or comply to this therapy, or develop major side effects^{37,38}, roscovitine analogues may constitute good alternatives in the frame of personalized medicine.

Roscovitine has been shown by direct co-crystallisation approaches to bind to CDK2 and CDK5 in their catalytic site, and to directly compete with ATP^{39,40}. We can speculate that ABCB1 substrates, such as CsA, correct ABCB4 defective variants but inhibit its function by similar mechanisms. In the present study, while roscovitine

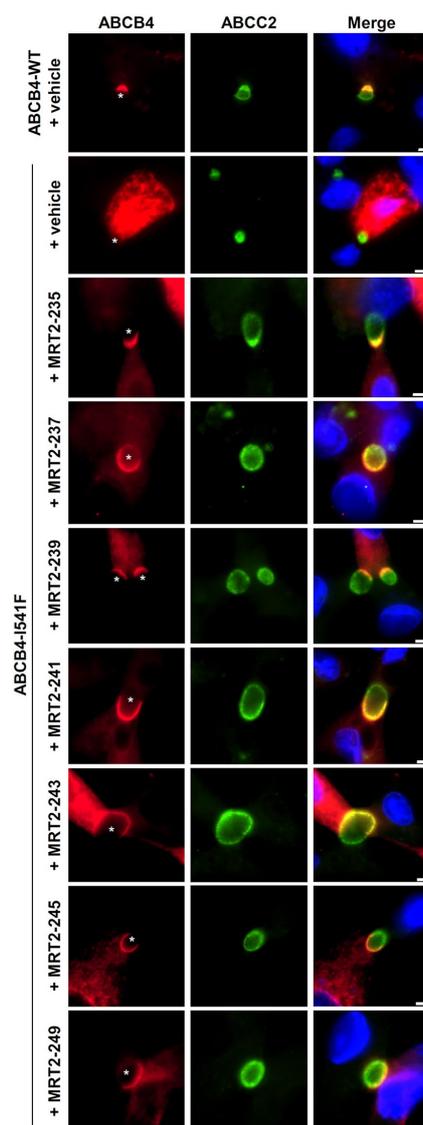


Figure 3. Structural analogues of roscovitine restore canalicular targeting of ABCB4-I541F in HepG2 cells. After transient expression of ABCB4-WT or ABCB4-I541F and 16 hours of treatment with the vehicle (DMSO) as control or 100 μM of the indicated compounds, HepG2 cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence and fluorescence microscopy to visualize ABCB4 (red, left panels) and ABCC2 (green, middle panels). Nuclei shown in the merge images were labelled with Hoechst 33342 (blue, right panels). Asterisks in the left panels indicate bile canaliculi. This figure is representative of at least three independent experiments per condition. Bars: 5 μm .

analogues allowed a better folding of ER-retained ABCB4 variants and thus their cell surface relocalisation, these molecules could impair the PC secretion activity by additional molecular mechanisms. Thus, roscovitine analogues seem to be dual molecules with two distinct functions: one allowing a better folding and traffic of ER-retained ABCB4 variants and the other interfering with the PC secretion activity of the transporter.

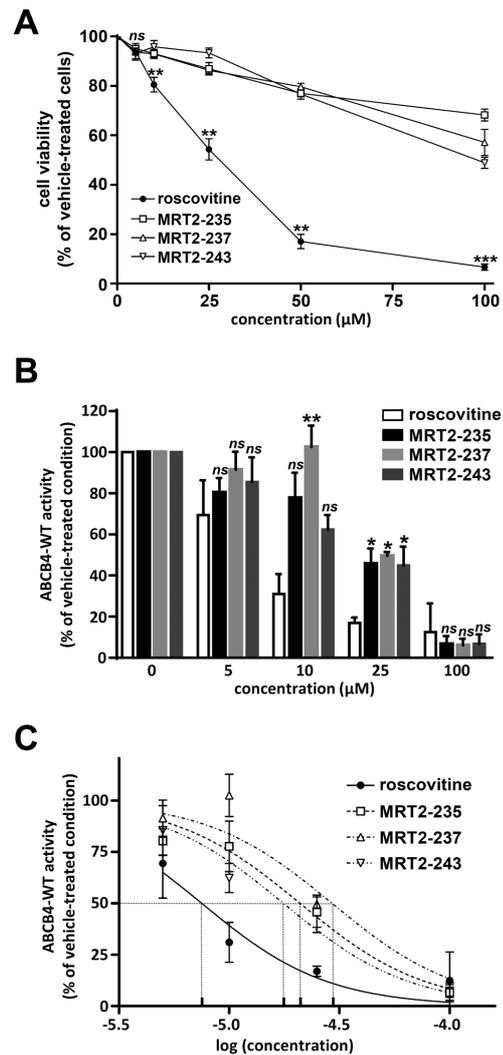


Figure 4. Roscovitine analogues are less cytotoxic and less inhibitory of ABCB4 activity than roscovitine. (A) After treatment with increasing concentrations of the indicated compounds during three days, cell viability was determined and expressed as in Fig. 1D. Means (\pm SEM) of at least four independent experiments per condition performed in triplicate are shown. Statistics indicate comparisons between roscovitine treatment and the other conditions for each tested concentration: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: not significant. (B) After transient expression of ABCB4-WT, HEK cells were treated with increasing doses of roscovitine or its analogues as indicated. Then the capacity of these cells to secrete PC was assessed and expressed as in Fig. 1E. Means (\pm SEM) of at least three independent experiments performed in triplicate for each tested condition are shown. Statistics indicate comparisons between treatments with roscovitine and its analogues for each tested concentration: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ns: not significant. (C) Results shown in B are represented as functions of $\log[\text{concentration}]$ for roscovitine and its analogues.

Roscovitine analogues may correct ABCB4 function through different molecular mechanisms, compared to the original molecule. Indeed, we observed that the immature band of ABCB4 is less pronounced after treatment with roscovitine, which was not the case with treatment at 27 °C, CsA or roscovitine analogues (Figs 1A and 2B).

Compounds	Roscovitine	MRT2-235	MRT2-237	MRT2-243
log IC ₅₀	-5.124 ± 0.078	-4.678 ± 0.086	-4.533 ± 0.092	-4.754 ± 0.084
IC ₅₀ (μM) (min-max)	7.51 (5.49-10.28)	20.97 (14.87-29.62)	29.31 (20.30-42.32)	17.63 (12.60-24.64)

Table 2. IC₅₀ of roscovitine and its analogues on the PC secretion activity of ABCB4-WT. IC₅₀ were calculated from dose-response curves shown in Fig. 4C.

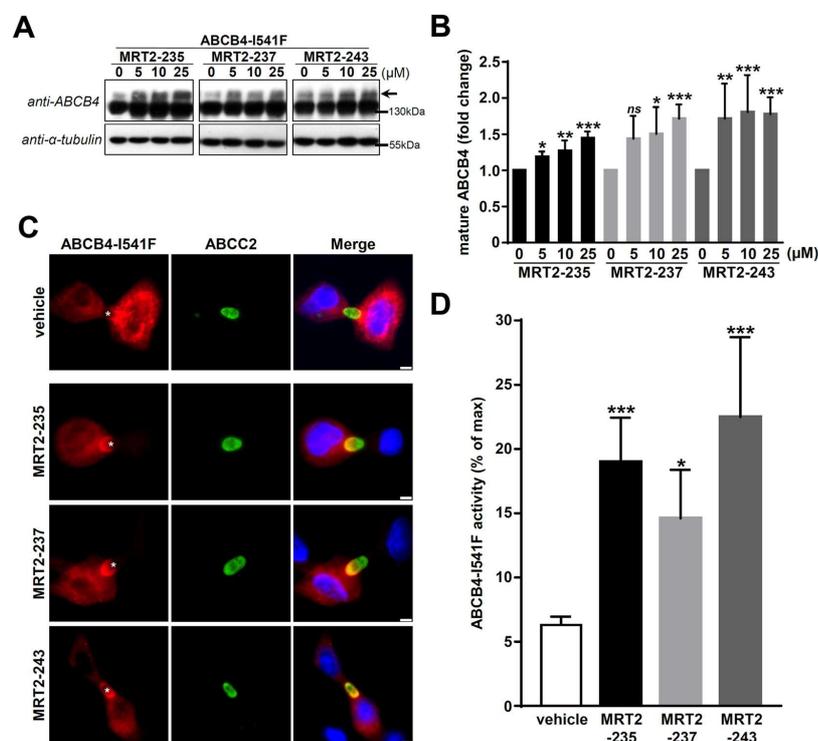


Figure 5. Roscovitine analogues rescue the maturation, the plasma membrane targeting and the PC secretion activity of ABCB4-I541F. (A) After transient expression of ABCB4-I541F in HEK cells and treatment with 0 (vehicle), 5, 10 or 25 μM of the indicated roscovitine analogues, cell lysates were prepared and analysed as in Fig. 2B. The arrow indicates the mature form of ABCB4. These immunoblots are representative of at least five independent experiments for each condition. Presented data were cropped from full immunoblots shown in Supplementary Fig. S5. (B) Densitometry analysis of A. The percentages of the mature form of ABCB4 were quantified and then expressed as fold changes compared to the vehicle-treated condition (0 μM) for each tested compound. Means (±SEM) of at least five independent experiments per roscovitine analogue are represented. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: not significant. (C) After transient expression of ABCB4-I541F, HepG2 cells were treated during 16 hours with 25 μM of the indicated roscovitine analogues. ABCB4 (red, left column) and ABCC2 (green, middle column) were immunolocalised as in Fig. 3. Nuclei (blue) are shown in the merge panels (right column). Asterisks in the left panels indicate bile canaliculi. This panel is representative of three independent experiments. Bars: 5 μm. (D) HEK cells expressing ABCB4-I541F were treated with 25 μM of roscovitine analogues, and ABCB4-mediated PC secretion was measured and represented as in Fig. 1E, the maximal activity being determined for cells expressing ABCB4-WT. Means (±SEM) of at least five independent experiments performed in triplicate for each tested condition are shown. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

This would reflect the involvement of distinct molecular mechanisms between roscovitine and its structural analogues. We also observed different rescuing efficiencies of roscovitine analogues on the three distinct ABCB4 variants (compare Figs 5A,B and 6A–D) which may reflect different structural defects induced by the missense variations. It is interesting to note that the presence of a carboxyl which prevents kinase inhibition (Fig. 2A, Table 1)

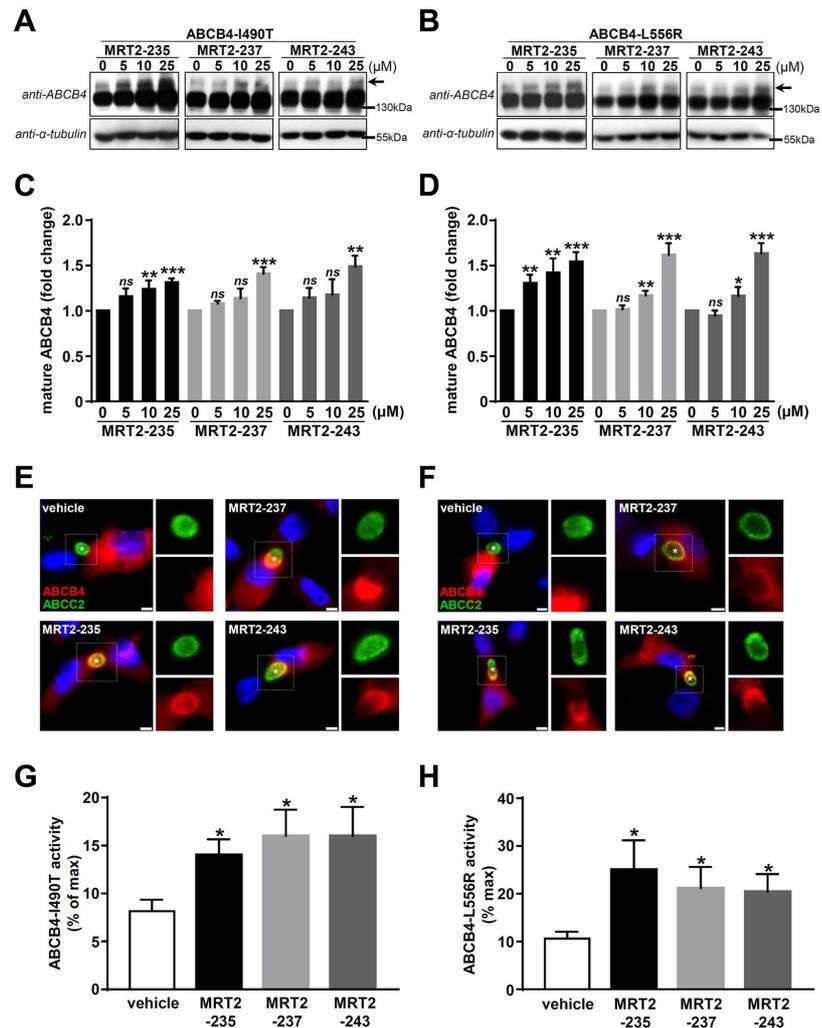


Figure 6. Roscovitine analogues are functional correctors of other ER-retained ABCB4 variants. (A,B) After treatment with 0 (vehicle), 5, 10 or 25 μM of the indicated roscovitine analogues, the maturation of ABCB4-I490T (A) and ABCB4-L556R (B) missense variants expressed in HEK cells was assessed by immunoblot as in Fig. 5A. These panels are representative of at least four independent experiments for each condition. Presented data were cropped from full immunoblots shown in Supplementary Fig. S6. (C,D) Densitometry analyses of A and B, respectively, as performed in Fig. 5B. Means (\pm SEM) of at least four independent experiments per condition are represented. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns: not significant. (E,F) After treatment without (vehicle) or with 25 μM of the indicated roscovitine analogues, HepG2 cells expressing ABCB4-I490T (E) or ABCB4-L556R (F) were processed for indirect immunofluorescence, as described in Fig. 5C. White dotted squares indicate magnified areas in the individual frames shown on the right of each merged picture. Asterisks indicate bile canaliculi. Each panel is representative of three independent experiments. Bars: 5 μm . (G,H) ABCB4-mediated PC secretion of HEK cells expressing ABCB4-I490T (G) or ABCB4-L556R (H) and treated with 25 μM of the indicated roscovitine analogues was analysed as in Fig. 5D. Means (\pm SEM) of at least four independent experiments performed in triplicate for each tested condition are shown. * $P < 0.05$.

does not prevent rescue of ER-retained ABCB4 variants. Moreover, the presence of a cyclopentyl at position 9 and substitutions (F, Cl, CF3) seem to contribute to the ABCB4 rescuing efficacy of the analogues. Although roscovitine has been reported to partially correct CFTR-F508del function²⁵, we did not observe such effect on ABCB4-I541F. These results may illustrate the difference of molecular mechanisms between the floppase activity of ABCB4 and the chloride channel function of CFTR. However, here, we provide evidence that roscovitine analogues are able to partially correct the function of ER-retained ABCB4 variants even if the mechanisms of their cell entry, passive diffusion or active uptake are not yet characterized. This opens the perspective to the use of these and related compounds as targeted pharmacotherapies for patients with ABCB4-related diseases.

The research of pharmacological therapies for ABCB4-related diseases as alternatives to liver transplantation is mainly focused on PFIC3, the most severe form of these diseases, for which the majority of homozygous or compound heterozygous patients have defects in both *ABCB4* alleles (for a review, see⁴¹). PC concentrations in bile of PFIC3 patients are very low due to a strongly impaired ABCB4 activity⁷. Thus, targeting patients harbouring this category of genetic variations using roscovitine analogues could be a promising therapeutic strategy in order to improve PC secretion into bile. Indeed, it has been proposed that patients with enough residual ABCB4 activity ($\geq 7\%$), are better responders to UDCA therapy⁴², as this is the case for patients with milder forms of ABCB4-related diseases such as low-phospholipid associated cholelithiasis syndrome and intrahepatic cholestasis of pregnancy^{41–44}. It is thus tempting to speculate that the partial rescue of ABCB4 function using roscovitine analogues would be sufficient for patients to positively respond to UDCA therapy. It is also interesting to note that UDCA treatment may contribute to the relocalisation of ABCB4 at the canalicular membrane of hepatocytes in *in vivo* systems, as proposed for ABCB11 and ABCB2 in cholestatic rat models^{45,46} and ABCB11 in PFIC2 patients⁴⁷.

The effect of roscovitine are currently evaluated in preclinical and clinical trials in the frame of several pathologies⁴⁸, including a recent phase 2 clinical trial in patients with cystic fibrosis (ROSCO-CF; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02649751>). The results obtained from these studies would allow to consider the repositioning of roscovitine, and more especially its more potent structural analogues, to treat ABCB4-related rare biliary diseases.

Materials and Methods

DNA constructs and mutagenesis. The subcloning of wild type (WT) ABCB4, isoform A (NM_000443.3), into pCDNA3 vector has been described²⁶. The I541F, I490T and L556R missense ABCB4 variants were previously reported and described^{9,26,49}. Site directed mutagenesis were performed using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Les Ulis, France), following manufacturer's instructions, and using the primers (Eurogentec, Angers, France) described in Supplementary Table S1. The sequences of all constructs were systematically verified by automated sequencing.

Cell culture and transfection. Human embryonic kidney (HEK-293, herein referred to as HEK; ATCC[®]-CRL-1573TM) cells and human hepatocellular carcinoma HepG2 (ATCC[®]-HB-8065TM) cells were obtained from ATCC (Manassas, VA). As we previously reported, both HEK and HepG2 cells do not express ABCB4^{9,50}. Cells were grown in an incubator at 37 °C with 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco-Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) containing 4.5 g/L D-glucose and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), 2 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 100 units/mL of penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Gibco-Thermo Fisher Scientific).

For transient transfection of HEK cells, they were seeded at subconfluent levels in the adequate tissue culture wells at least six hours before transfection. Turbofect (Thermo Fisher scientific) was used at a ratio of reagent:DNA of 2:1 according to manufacturer's instructions. For transient transfection of HepG2 cells, subconfluent cultures were seeded in the adequate culture wells 24 hours before transfection. Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) was used at a ratio of reagent:DNA of 1.5:1 according to manufacturer's instructions. Cell treatments and processing for further analyses were performed at least 16 hours post-transfection.

Chemicals and cell treatments. Cyclosporin A (CsA) was from Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX). (R)-roscovitine and its non-commercial structural analogues (Aftin-4, the metabolite M3, MRT2-163, MRT2-164, MRT2-235, MRT2-237, MRT2-239, MRT2-241, MRT2-243, MRT2-245, MRT2-248 and MRT2-249; see Fig. 2) were synthesized by ManRos Therapeutics (Roscoff, France). Each compound was solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) as 1000X concentrated stock solutions in order to treat cells with 5 µM to 100 µM final concentrations, using DMSO as control vehicle at the same dilution (0.1% DMSO for all conditions). The cells were treated 24 hours post-transfection with these drugs during 16 hours, except for the viability assays for which cells were treated during three days. After drug treatment, cells were used for immunoanalyses, cell viability assays or PC secretion assays.

Protein kinases and their activators or regulators (see Table 1) were expressed and purified, and their catalytic activity was assayed in the presence of a range of concentrations of each roscovitine analogue, as previously described^{28,29,40}. IC₅₀ values were calculated from the dose-response curves.

Immunoanalyses. Western blots and indirect immunofluorescence were performed as previously described^{9,50}. For immunoblot analyses, total cell lysates were prepared in denaturing and reducing sample buffer⁵¹, separated on 7.5% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes using Trans-Blot system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Saturated membranes were incubated with mouse monoclonal anti-ABCB4 (clone P₃II-26; Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France) or anti- α -tubulin (clone 1E4C11; ProteinTech, Manchester, United Kingdom) antibodies and then with peroxidase conjugated anti-mouse secondary antibodies (Sigma). Signals were detected with ECL prime western blotting detection reagent (GE Healthcare,

Velizy-Villacoublay, France) and quantified in the linear range of detection using ImageJ 1.50i software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD).

For indirect immunofluorescence, HepG2 cells were grown on glass coverslips and after transfection and treatments, they were fixed and permeabilized during 1 min at -20°C in ice-cold methanol. Then ABCB4 and ABCC2 were immunolabelled using the mouse monoclonal P₂II-26 (IgG2b) and M₂I-4 (IgG1) antibodies (Enzo Life Sciences), respectively. AlexaFluor[®] 555 and AlexaFluor[®] 488 conjugated isotype-specific secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific) and Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) were used to label ABCB4, ABCC2 and nuclei, respectively. Images were acquired using an IX83 inverted fluorescence microscope from Olympus (Rungis, France), equipped with a UPLSAPO 60XS2 silicone immersion objective and a Hamamatsu ORCA Flash4.0 digital CMOS camera, and analysed using Olympus CellSens Dimension Desktop version 1.16 and Adobe Photoshop version 8.0.1. For each experiment, all images were acquired with constant settings (acquisition time and correction of signal intensities).

Cell viability assays. Cell viability was assessed by the conversion of MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) into formazan crystals by living cells, as described³². In brief, HEK cells were seeded in 96-well plates in triplicate for each tested condition, including controls (no cells, no treatment, treatment with vehicle). After transient expression of ABCB4-WT as described above (to mimic the experimental conditions of the other experiments) and drug treatment during 72 hours, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MTT (final concentration) was added in each well and cells were re-incubated at 37°C during 2 hours. These conditions were optimized in order to maintain the absorbance at 540 nm of the blanks below 0.1 OD unit (negative controls) and the absorbance at 540 nm for untreated cells between 1.0 and 1.3 OD units (positive controls). Then culture media were gently washed out, cells were lysed in 100 μL of pure DMSO and absorbance at 540 nm was measured using a multiplate cytofluorimeter SpectraFluor from Tecan (Männedorf, Switzerland). Cell viability was calculated for each triplicate after background subtraction and expressed as percentage of the mean for cells treated with vehicle only.

Measurement of ABCB4-mediated phosphatidylcholine secretion. HEK cells were seeded in 0.01% poly-L-lysine (Sigma) pre-coated 6-well plates of 10 cm^2 area per well (1.3×10^6 cells per well). After transient transfection of the empty vector (control), plasmids encoding ABCB4-WT or its variants, cells were incubated during 24 hours at 37°C in serum-free medium supplemented with 0.5 mM sodium taurocholate (Sigma) and 0.02% fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma). Then, the secreted PC was quantified from the collected media using a fluoro-enzymatic assay previously described³⁰. Each condition was analysed in triplicate, after background subtraction, and results were normalized to the expression levels of ABCB4 determined by immunoblots of the corresponding cell lysates.

Statistics. Graphics and non-parametric analyses of variance tests (Kruskal-Wallis) were performed using Prism version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA). A *P* value of less than 0.05 was considered significant. If not specified in figure legends, symbols indicate the comparison between the control (or vehicle-treated) and the other tested conditions.

Data Availability

The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Boyer, J. L. Bile formation and secretion. *Compr Physiol* **3**, 1035–1078 (2013).
- Falguières, T., Ait-Slimane, T., Housset, C. & Maurice, M. ABCB4: insights from pathobiology into therapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **38**, 557–563 (2014).
- Admirand, W. H. & Small, D. M. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest* **47**, 1043–1052 (1968).
- Borst, P., Zelcer, N. & van Helvoort, A. ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta* **1486**, 128–144 (2000).
- Wang, D. Q., Cohen, D. E. & Carey, M. C. Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *J Lipid Res* **50**(Suppl), S406–411 (2009).
- Dixon, P. H. *et al.* Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet* **9**, 1209–1217 (2000).
- Jacquemin, E. *et al.* The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* **120**, 1448–1458 (2001).
- Rosmorduc, O., Hermelin, B. & Poupon, R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* **120**, 1459–1467 (2001).
- Delaunay, J. L. *et al.* A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Hepatology* **63**, 1620–1631 (2016).
- Vauthier, V., Housset, C. & Falguières, T. Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters. *Biochemical pharmacology* **136**, 1–11 (2017).
- Poupon, R. Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: An overview of their mechanisms of action. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **36**(Suppl 1), S3–S12 (2012).
- Rosmorduc, O. & Poupon, R. Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene. *Orphanet J Rare Dis* **2**, 29 (2007).
- Geenes, V. & Williamson, C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J Gastroenterol* **15**, 2049–2066 (2009).
- Jacquemin, E. *et al.* Ursodeoxycholic acid therapy in pediatric patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* **25**, 519–523 (1997).
- Davit-Spraul, A., Gonzales, E., Baussan, C. & Jacquemin, E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet journal of rare diseases* **4**, 1 (2009).
- Delaunay, J. L. *et al.* Functional defect of variants in the adenosine triphosphate-binding sites of ABCB4 and their rescue by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator, ivacaftor (VX-770). *Hepatology* **65**, 560–570 (2017).

17. Gautherot, J. *et al.* Effects of Cellular, chemical and pharmacological chaperones on the rescue of a trafficking-defective mutant of the ATP-binding cassette transporters ABCB1/ABCB4. *J Biol Chem* **287**, 5070–5078 (2012).
18. Andress, E. J. *et al.* A molecular mechanistic explanation for the spectrum of cholestatic disease caused by the S320F variant of ABCB4. *Hepatology* **59**, 1921–1931 (2014).
19. Park, H. J. *et al.* Functional characterization of ABCB4 mutations found in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Sci Rep* **6**, 26872 (2016).
20. Foxwell, B. M., Mackie, A., Ling, V. & Ryffel, B. Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein. *Mol Pharmacol* **36**, 543–546 (1989).
21. Tamai, I. & Safa, A. R. Competitive interaction of cyclosporins with the Vinca alkaloid-binding site of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Biol Chem* **265**, 16509–16513 (1990).
22. Meijer, L. *et al.* Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European journal of biochemistry* **243**, 527–536 (1997).
23. Meijer, L. & Raymond, E. Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Accounts of chemical research* **36**, 417–425 (2003).
24. Meijer, L. *et al.* Modulating Innate and Adaptive Immunity by (R)-Roscovitine: Potential Therapeutic Opportunity in Cystic Fibrosis. *Journal of innate immunity* **8**, 330–349 (2016).
25. Norez, C. *et al.* Roscovitine is a proteostasis regulator that corrects the trafficking defect of F508del-CFTR by a CDK-independent mechanism. *British journal of pharmacology* **171**, 4831–4849 (2014).
26. Delaunay, J. L. *et al.* A missense mutation in ABCB4 gene involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 leads to a folding defect that can be rescued by low temperature. *Hepatology* **49**, 1218–1227 (2009).
27. Sormunen, R., Eskelinen, S. & Lehto, V. P. Bile canalculus formation in cultured HEPG2 cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **68**, 652–662 (1993).
28. Tang, L. *et al.* Crystal structure of pyridoxal kinase in complex with roscovitine and derivatives. *J Biol Chem* **280**, 31220–31229 (2005).
29. Bettayeb, K. *et al.* Small-molecule inducers of Abeta-42 peptide production share a common mechanism of action. *Faseb j* **26**, 5115–5123 (2012).
30. Tougeron, D., Fotsing, G., Barbu, V. & Beauchant, M. ABCB4/MDR3 gene mutations and Cholangiocarcinomas. *J Hepatol* **57**, 467–468 (2012).
31. Jacquemin, E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **36**(Suppl 1), S26–35 (2012).
32. Mehl, A., Bohorquez, H., Serrano, M. S., Galliano, G. & Reichman, T. W. Liver transplantation and the management of progressive familial intrahepatic cholestasis in children. *World J Transplant* **6**, 278–290 (2016).
33. van Wessel, D. *et al.* The natural course of FIC1 deficiency and BSEP deficiency: Initial results from the NAPPED-consortium (Natural course and Prognosis of PFIC and Effect of biliary Diversion) [ABSTRACT]. *Journal of Hepatology* **68**, S626–S627 (2018).
34. Naoi, S. *et al.* Improved liver function and relieved pruritus after 4-phenylbutyrate therapy in a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J Pediatr* **164**, 1219–1227 (2014).
35. Gonzales, E. *et al.* Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology* **62**, 558–566 (2015).
36. Gordo-Gilart, R., Andueza, S., Hierro, L., Jara, P. & Alvarez, L. Functional Rescue of Trafficking-Impaired ABCB4 Mutants by Chemical Chaperones. *PLoS One* **11**, e0150098 (2016).
37. Schneider, B. L. & Vockley, J. Possible Phenylacetate Hepatotoxicity During 4-Phenylbutyrate Therapy of Byler Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **62**, 424–428 (2015).
38. Pena-Quintana, L., Llarena, M., Reyes-Suarez, D. & Aldamiz-Echevarria, L. Profile of sodium phenylbutyrate granules for the treatment of urea-cycle disorders: patient perspectives. *Patient preference and adherence* **11**, 1489–1496 (2017).
39. De Azevedo, W. F. *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *European journal of biochemistry* **243**, 518–526 (1997).
40. Bach, S. *et al.* Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase. *J Biol Chem* **280**, 31208–31219 (2005).
41. Reichert, M. C. & Lammert, F. ABCB4 Gene Aberrations in Human Liver Disease: An Evolving Spectrum. *Seminars in liver disease* **38**, 299–307 (2018).
42. Davit-Spraul, A., Gonzales, E., Baussan, C. & Jacquemin, E. The spectrum of liver diseases related to ABCB4 gene mutations: pathophysiology and clinical aspects. *Semin Liver Dis* **30**, 134–146 (2010).
43. Poupon, R. *et al.* Genotype-phenotype relationships in the low-phospholipid associated cholelithiasis syndrome. A study of 156 consecutive patients. *Hepatology* **58**, 1105–1110 (2013).
44. Bacq, Y. *et al.* Ursodeoxycholic acid therapy in intrahepatic cholestasis of pregnancy: Results in real-world conditions and factors predictive of response to treatment. *Dig Liver Dis* **49**, 63–69 (2017).
45. Beuers, U. *et al.* Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology* **33**, 1206–1216 (2001).
46. Dombrowski, F., Stieger, B. & Beuers, U. Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver. *Lab Invest* **86**, 166–174 (2006).
47. Varma, S. *et al.* Retargeting of bile salt export pump and favorable outcome in children with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *Hepatology* **62**, 198–206 (2015).
48. Cicenias, J. *et al.* Roscovitine in cancer and other diseases. *Annals of translational medicine* **3**, 135 (2015).
49. Andress, E. J., Nicolau, M., McGeoghan, F. & Linton, K. J. ABCB4 missense mutations D243A, K435T, G535D, I490T, R545C, and S978P significantly impair the lipid floppase and likely predispose to secondary pathologies in the human population. *Cell Mol Life Sci* **74**, 2513–2524 (2017).
50. Gautherot, J. *et al.* Phosphorylation of ABCB4 impacts its function: Insights from disease-causing mutations. *Hepatology* **60**, 610–621 (2014).
51. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
52. van Meerloo, J., Kaspers, G. J. & Cloos, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* **731**, 237–245 (2011).

Acknowledgements

We are grateful to Loïc Guillot (St-Antoine Research Center, Paris, France), Olivier Tabary (St-Antoine Research Center, Paris, France) and Caroline Norez (University of Poitiers, France) for their help in the initiation of this collaborative project. We also thank Michèle Maurice (retired) and Emmanuel Jacquemin (Bicêtre Hospital, Le Kremlin Bicêtre, France) for their input, as well as Emmanuel Gonzales (Bicêtre Hospital, Le Kremlin Bicêtre, France) for his expertise regarding clinical aspects, Yves Chrétien (St-Antoine Research Center, Paris, France) for statistical analyses and Romain Morichon (St-Antoine Research Center, Paris, France) for his help with fluorescence microscopy. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE14-0008-01) and the French Association for the Study of the Liver (AFEF) for T.F., and L.M. received financial support from “Vaincre la Mucoviscidose” (VLM).

Author Contributions

V.V., L.M. and T.F. designed the study. V.V., A.B.S., J.E., N.O., A.M.D.S., A.B. and T.F. performed the experiments. V.V., J.L.D., C.H., T.A.S., L.M. and T.F. analysed the data and provided intellectual contribution. V.V. and T.F. wrote the manuscript, which was reviewed and approved by all authors.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43111-y>.

Competing Interests: As co-founder of ManRos Therapeutics, L.M. is paid and has stocks from this company. J.E. and N.O. are employees of ManRos Therapeutics and are paid by this company.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

-RÉFÉRENCES-

1. Abu-Hayyeh S, Papacleovoulou G, Lovgren-Sandblom A, Tahir M, Oduwole O, Jamaludin NA, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy levels of sulfated progesterone metabolites inhibit farnesoid X receptor resulting in a cholestatic phenotype. *Hepatology*. 2013;57(2):716-26.
2. Abu-Hayyeh S, Williamson C. Progesterone metabolites as farnesoid X receptor inhibitors. *Dig Dis*. 2015;33(3):300-6.
3. Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med*. 2010;363(21):1991-2003.
4. Admirand WH, Small DM. The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man. *J Clin Invest*. 1968;47(5):1043-52.
5. Aida K, Hayashi H, Inamura K, Mizuno T, Sugiyama Y. Differential roles of ubiquitination in the degradation mechanism of cell surface-resident bile salt export pump and multidrug resistance-associated protein 2. *Mol Pharmacol*. 2014;85(3):482-91.
6. Aleksandrov L, Mengos A, Chang X, Aleksandrov A, Riordan JR. Differential interactions of nucleotides at the two nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*. 2001;276(16):12918-23.
7. Aleksandrov LA, Fay JF, Riordan JR. R-Domain Phosphorylation by Protein Kinase A Stimulates Dissociation of Unhydrolyzed ATP from the First Nucleotide-Binding Site of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Biochemistry*. 2018;57(34):5073-5.
8. Almutawa W, Smith C, Sabouny R, Smit RB, Zhao T, Wong R, et al. The R941L mutation in MYH14 disrupts mitochondrial fission and associates with peripheral neuropathy. *EBioMedicine*. 2019;45:379-92.
9. Alpini G, Baiocchi L, Glaser S, Ueno Y, Marzioni M, Francis H, et al. Ursodeoxycholate and tauroursodeoxycholate inhibit cholangiocyte growth and secretion of BDL rats through activation of PKC alpha. *Hepatology*. 2002;35(5):1041-52.
10. Alrefai WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res*. 2007;24(10):1803-23.
11. Alvaro D, Cantafora A, Attili AF, Ginanni Corradini S, De Luca C, Minervini G, et al. Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species. *Comp Biochem Physiol B*. 1986;83(3):551-4.
12. Ambadipudi R, Georges E. Sequences in Linker-1 domain of the multidrug resistance associated protein (MRP1 or ABCC1) bind to tubulin and their binding is modulated by phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;482(4):1001-6.
13. Amparan D, Avram D, Thomas CG, Lindahl MG, Yang J, Bajaj G, et al. Direct interaction of myosin regulatory light chain with the NMDA receptor. *J Neurochem*. 2005;92(2):349-61.
14. Angulo P. Use of ursodeoxycholic acid in patients with liver disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2002;4(1):37-44.
15. Aronson SJ, Bakker RS, Shi X, Duijst S, Ten Bloemendaal L, de Waart DR, et al. Liver-directed gene therapy results in long-term correction of progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 in mice. *J Hepatol*. 2019.
16. Baghdasaryan A, Chiba P, Trauner M. Clinical application of transcriptional activators of bile salt transporters. *Mol Aspects Med*. 2014;37:57-76.

17. Bajaj G, Rodriguez-Proteau R, Venkataraman A, Fan Y, Kioussi C, Ishmael JE. MDR1 function is sensitive to the phosphorylation state of myosin regulatory light chain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;398(1):7-12.
18. Bajaj G, Zhang Y, Schimerlik MI, Hau AM, Yang J, Filtz TM, et al. N-methyl-D-aspartate receptor subunits are non-myosin targets of myosin regulatory light chain. *J Biol Chem*. 2009;284(2):1252-66.
19. Benedetti A, Strazzabosco M, Ng OC, Boyer JL. Regulation of activity and apical targeting of the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(2):792-6.
20. Berkane N, Cocheton JJ, Brehier D, Merviel P, Wolf C, Lefevre G, et al. Ursodeoxycholic acid in intrahepatic cholestasis of pregnancy. A retrospective study of 19 cases. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000;79(11):941-6.
21. Bessonova L, Volkova N, Higgins M, Bengtsson L, Tian S, Simard C, et al. Data from the US and UK cystic fibrosis registries support disease modification by CFTR modulation with ivacaftor. *Thorax*. 2018;73(8):731-40.
22. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G, et al. Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver. *Hepatology*. 2001;33(5):1206-16.
23. Birch JL, Strathdee K, Gilmour L, Vallatos A, McDonald L, Kouzeli A, et al. A Novel Small-Molecule Inhibitor of MRCK Prevents Radiation-Driven Invasion in Glioblastoma. *Cancer Res*. 2018;78(22):6509-22.
24. Boberg KM, Schruppf E. [Treatment of cholestatic liver diseases with ursodeoxycholic acid]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 1997;117(23):3370-3.
25. Bompadre SG, Sohma Y, Li M, Hwang TC. G551D and G1349D, two CF-associated mutations in the signature sequences of CFTR, exhibit distinct gating defects. *J Gen Physiol*. 2007;129(4):285-98.
26. Borst P, Varadi A, van de Wetering K. PXE, a Mysterious Inborn Error Clarified. *Trends Biochem Sci*. 2019;44(2):125-40.
27. Borst P, Zelcer N, van Helvoort A. ABC transporters in lipid transport. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1486(1):128-44.
28. Bossard R, Stieger B, O'Neill B, Fricker G, Meier PJ. Ethinylestradiol treatment induces multiple canalicular membrane transport alterations in rat liver. *J Clin Invest*. 1993;91(6):2714-20.
29. Bouin AP, Kyumurkov A, Regent-Kloeckner M, Ribba AS, Faurobert E, Fournier HN, et al. ICAP-1 monoubiquitylation coordinates matrix density and rigidity sensing for cell migration through ROCK2-MRCKalpha balance. *J Cell Sci*. 2017;130(3):626-36.
30. Boyer JL. Adaptive Regulation of Hepatocyte Transporters in Cholestasis. In: Arias IM, editor. *The Liver Biology and Pathobiology*: Wiley-Blackwell; 2009.
31. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol*. 2013;3(3):1035-78.
32. Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Moustafa T, et al. Upregulation of a basolateral FXR-dependent bile acid efflux transporter OSTalpha-OSTbeta in cholestasis in humans and rodents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(6):G1124-30.
33. Branum GD, Bowers BA, Watters CR, Haebig J, Cucchiaro G, Farouk M, et al. Biliary response to glucagon in humans. *Ann Surg*. 1991;213(4):335-40.

34. Bretscher A, Reczek D, Berryman M. Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J Cell Sci.* 1997;110 (Pt 24):3011-8.
35. Brown JM, Yu L. Opposing Gatekeepers of Apical Sterol Transport: Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) and ATP-Binding Cassette Transporters G5 and G8 (ABCG5/ABCG8). *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem.* 2009;9(1):18-29.
36. Bruneau A*, Delaunay JL*, Hoffmann B, Durand-Schneider AM, Barbu V, Jacquemin E, et al. Functional defect of variants in the adenosine triphosphate-binding sites of ABCB4 and their rescue by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator, ivacaftor (VX-770). *Hepatology.* 2017;65(2):560-70.
37. Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M, et al. A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet.* 1998;18(3):219-24.
38. Burbank MG, Burban A, Sharanek A, Weaver RJ, Guguen-Guillouzo C, Guillouzo A. Early Alterations of Bile Canaliculi Dynamics and the Rho Kinase/Myosin Light Chain Kinase Pathway Are Characteristics of Drug-Induced Intrahepatic Cholestasis. *Drug Metab Dispos.* 2016;44(11):1780-93.
39. Buschman E, Arceci RJ, Croop JM, Che M, Arias IM, Housman DE, et al. mdr2 encodes P-glycoprotein expressed in the bile canalicular membrane as determined by isoform-specific antibodies. *J Biol Chem.* 1992;267(25):18093-9.
40. Buschman MD, Field SJ. MYO18A: An unusual myosin. *Adv Biol Regul.* 2018;67:84-92.
41. Calmus Y. [Immunosuppression after liver transplantation]. *Presse Med.* 2009;38(9):1307-13.
42. Cantore M, Reinehr R, Sommerfeld A, Becker M, Haussinger D. The Src family kinase Fyn mediates hyperosmolarity-induced Mrp2 and Bsep retrieval from canalicular membrane. *J Biol Chem.* 2011;286(52):45014-29.
43. Castro AF, Horton JK, Vanoye CG, Altenberg GA. Mechanism of inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport by protein kinase C blockers. *Biochem Pharmacol.* 1999;58(11):1723-33.
44. Cerqueira NM, Oliveira EF, Gesto DS, Santos-Martins D, Moreira C, Moorthy HN, et al. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry.* 2016;55(39):5483-506.
45. Chai J, Cai SY, Liu X, Lian W, Chen S, Zhang L, et al. Canalicular membrane MRP2/ABCC2 internalization is determined by Ezrin Thr567 phosphorylation in human obstructive cholestasis. *J Hepatol.* 2015;63(6):1440-8.
46. Chambers TC, Pohl J, Glass DB, Kuo JF. Phosphorylation by protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase of synthetic peptides derived from the linker region of human P-glycoprotein. *Biochem J.* 1994;299 (Pt 1):309-15.
47. Chambers TC, Pohl J, Raynor RL, Kuo JF. Identification of specific sites in human P-glycoprotein phosphorylated by protein kinase C. *J Biol Chem.* 1993;268(7):4592-5.
48. Chan W, Calderon G, Swift AL, Moseley J, Li S, Hosoya H, et al. Myosin II regulatory light chain is required for trafficking of bile salt export protein to the apical membrane in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 2005;280(25):23741-7.
49. Chandrasekar I, Goeckeler ZM, Turney SG, Wang P, Wysolmerski RB, Adelstein RS, et al. Nonmuscle myosin II is a critical regulator of clathrin-mediated endocytosis. *Traffic.* 2014;15(4):418-32.

50. Chang XB, Mengos A, Hou YX, Cui L, Jensen TJ, Aleksandrov A, et al. Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 17):2814-23.
51. Chen XQ, Tan I, Leung T, Lim L. The myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase is involved in the regulation of neurite outgrowth in PC12 cells. *J Biol Chem.* 1999;274(28):19901-5.
52. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* 2016;370(1):153-64.
53. Chi X, Wang S, Huang Y, Stamnes M, Chen JL. Roles of rho GTPases in intracellular transport and cellular transformation. *Int J Mol Sci.* 2013;14(4):7089-108.
54. Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 2009;50(10):1955-66.
55. Chin JE, Soffir R, Noonan KE, Choi K, Roninson IB. Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family. *Mol Cell Biol.* 1989;9(9):3808-20.
56. Chin S, Hung M, Won A, Wu YS, Ahmadi S, Yang D, et al. Lipophilicity of the Cystic Fibrosis Drug, Ivacaftor (VX-770), and Its Destabilizing Effect on the Major CF-causing Mutation: F508del. *Mol Pharmacol.* 2018;94(2):917-25.
57. Cho HJ, Gee HY, Baek KH, Ko SK, Park JM, Lee H, et al. A small molecule that binds to an ATPase domain of Hsc70 promotes membrane trafficking of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Am Chem Soc.* 2011;133(50):20267-76.
58. Choi SH, Czifra G, Kedei N, Lewin NE, Lazar J, Pu Y, et al. Characterization of the interaction of phorbol esters with the C1 domain of MRCK (myotonic dystrophy kinase-related Cdc42 binding kinase) alpha/beta. *J Biol Chem.* 2008;283(16):10543-9.
59. Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, Esther CR, Jr., Das J, Dokholyan NV, et al. Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of DeltaF508 CFTR in cystic fibrosis. *Sci Transl Med.* 2014;6(246):246ra96.
60. Clancy JP, Bebok Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, et al. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(7):1683-92.
61. Clancy JP, Rowe SM, Bebok Z, Aitken ML, Gibson R, Zeitlin P, et al. No detectable improvements in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by nasal aminoglycosides in patients with cystic fibrosis with stop mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37(1):57-66.
62. Cmejla R, Petrak J, Cmejlova J. A novel iron responsive element in the 3'UTR of human MRCKalpha. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(1):158-66.
63. Cmejla R, Ptackova P, Petrak J, Savvulidi F, Cerny J, Sebesta O, et al. Human MRCKalpha is regulated by cellular iron levels and interferes with transferrin iron uptake. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;395(2):163-7.
64. Cohn JA, Strong TV, Picciotto MR, Nairn AC, Collins FS, Fitz JG. Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human bile duct epithelial cells. *Gastroenterology.* 1993;105(6):1857-64.
65. Cole LK, Vance JE, Vance DE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(5):754-61.
66. Colombo C, Vajro P, Degiorgio D, Coviello DA, Costantino L, Tornillo L, et al. Clinical features and genotype-phenotype correlations in children with progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 related to ABCB4 mutations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52(1):73-83.

67. Cornell RB, Ridgway ND. CTP:phosphocholine cytidyltransferase: Function, regulation, and structure of an amphitropic enzyme required for membrane biogenesis. *Prog Lipid Res.* 2015;59:147-71.
68. Crawford AR, Smith AJ, Hatch VC, Oude Elferink RP, Borst P, Crawford JM. Hepatic secretion of phospholipid vesicles in the mouse critically depends on mdr2 or MDR3 P-glycoprotein expression. Visualization by electron microscopy. *J Clin Invest.* 1997;100(10):2562-7.
69. Csanady L, Vergani P, Gadsby DC. Structure, Gating, and Regulation of the Cftr Anion Channel. *Physiol Rev.* 2019;99(1):707-38.
70. Cui YJ, Cheng X, Weaver YM, Klaassen CD. Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (Mdr1a, Mdr1b, Mdr2) in mice. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(1):203-10.
71. Czuba LC, Hillgren KM, Swaan PW. Post-translational modifications of transporters. *Pharmacol Ther.* 2018;192:88-99.
72. Dassa E. Natural history of ABC systems: not only transporters. *Essays Biochem.* 2011;50(1):19-42.
73. Davies JC, Cunningham S, Harris WT, Lapey A, Regelman WE, Sawicki GS, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2-5 years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): an open-label, single-arm study. *Lancet Respir Med.* 2016;4(2):107-15.
74. Davies JC, Moskowitz SM, Brown C, Horsley A, Mall MA, McKone EF, et al. VX-659-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med.* 2018;379(17):1599-611.
75. Davies JC, Wainwright CE, Canny GJ, Chilvers MA, Howenstine MS, Munck A, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients aged 6 to 11 years with cystic fibrosis with a G551D mutation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(11):1219-25.
76. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis.* 2009;4:1.
77. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. The spectrum of liver diseases related to ABCB4 gene mutations: pathophysiology and clinical aspects. *Semin Liver Dis.* 2010;30(2):134-46.
78. Davit-Spraul A, Gonzales E, Jacquemin E. NR1H4 analysis in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis, drug-induced cholestasis or intrahepatic cholestasis of pregnancy unrelated to ATP8B1, ABCB11 and ABCB4 mutations. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology.* 2012;36(6):569-73.
79. De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2014;13(4):403-9.
80. de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(1):282-7.
81. Dean M. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily 2002.
82. Dean M, Annilo T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:123-42.
83. Deeley RG, Westlake C, Cole SP. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev.* 2006;86(3):849-99.

84. Degiorgio D, Crosignani A, Colombo C, Bordo D, Zuin M, Vassallo E, et al. ABCB4 mutations in adult patients with cholestatic liver disease: impact and phenotypic expression. *J Gastroenterol*. 2015.
85. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Delautier D, Rada A, Gautherot J, Jacquemin E, et al. A missense mutation in ABCB4 gene involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 leads to a folding defect that can be rescued by low temperature. *Hepatology*. 2009;49(4):1218-27.
86. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Dossier C, Falguières T, Gautherot J, Anne DS, et al. A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Hepatology*. 2016.
87. Demirel O, Bangert I, Tampe R, Abele R. Tuning the cellular trafficking of the lysosomal peptide transporter TAPL by its N-terminal domain. *Traffic*. 2010;11(3):383-93.
88. Denk GU, Soroka CJ, Takeyama Y, Chen WS, Schuetz JD, Boyer JL. Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat. *J Hepatol*. 2004;40(4):585-91.
89. Dermauw W, Van Leeuwen T. The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem Mol Biol*. 2014;45:89-110.
90. Di Ciaula A, Wang DQ, Bonfrate L, Portincasa P. Current views on genetics and epigenetics of cholesterol gallstone disease. *Cholesterol*. 2013;2013:298421.
91. Dikkers A, Tietge UJ. Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World J Gastroenterol*. 2010;16(47):5936-45.
92. Draheim V, Reichel A, Weitschies W, Moenning U. N-glycosylation of ABC transporters is associated with functional activity in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Eur J Pharm Sci*. 2010;41(2):201-9.
93. Du M, Keeling KM, Fan L, Liu X, Kovacs T, Sorscher E, et al. Clinical doses of amikacin provide more effective suppression of the human CFTR-G542X stop mutation than gentamicin in a transgenic CF mouse model. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(7):573-82.
94. Eckford PD, Li C, Ramjeesingh M, Bear CE. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *J Biol Chem*. 2012;287(44):36639-49.
95. Eckstein J, Holzhutter HG, Berndt N. The importance of membrane microdomains for bile salt-dependent biliary lipid secretion. *J Cell Sci*. 2018;131(5).
96. Einat H. Partial effects of the protein kinase C inhibitor chelerythrine in a battery of tests for manic-like behavior in black Swiss mice. *Pharmacol Rep*. 2014;66(4):722-5.
97. Emi Y, Nomura S, Yokota H, Sakaguchi M. ATP-binding cassette transporter isoform C2 localizes to the apical plasma membrane via interactions with scaffolding protein. *J Biochem*. 2011;149(2):177-89.
98. Esteller A. Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol*. 2008;14(37):5641-9.
99. Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell*. 2001;106(4):489-98.
100. Falguières T, Ait-Slimane T, Housset C, Maurice M. ABCB4: Insights from pathobiology into therapy. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2014;38(5):557-63.
101. Ferrandiz-Huertas C, Fernandez-Carvajal A, Ferrer-Montiel A. Rab4 interacts with the human P-glycoprotein and modulates its surface expression in multidrug resistant K562 cells. *Int J Cancer*. 2011;128(1):192-205.

102. Ferreira RJ, Ferreira MJ, Dos Santos DJ. Assessing the Stabilization of P-Glycoprotein's Nucleotide-Binding Domains by the Linker, Using Molecular Dynamics. *Mol Inform.* 2013;32(5-6):529-40.
103. Ferru-Clement R, Fresquet F, Norez C, Metaye T, Becq F, Kitzis A, et al. Involvement of the Cdc42 pathway in CFTR post-translational turnover and in its plasma membrane stability in airway epithelial cells. *PLoS One.* 2015;10(3):e0118943.
104. Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology.* 2004;127(1):261-74.
105. Fiorotto R, Villani A, Kourtidis A, Scirpo R, Amenduni M, Geibel PJ, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator controls biliary epithelial inflammation and permeability by regulating Src tyrosine kinase activity. *Hepatology.* 2016;64(6):2118-34.
106. Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, et al. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313(2):604-12.
107. Floquet C, Hatin I, Rousset JP, Bidou L. Statistical analysis of readthrough levels for nonsense mutations in mammalian cells reveals a major determinant of response to gentamicin. *PLoS Genet.* 2012;8(3):e1002608.
108. Ford RC, Beis K. Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans.* 2019;47(1):23-36.
109. Fu D, van Dam EM, Brymora A, Duggin IG, Robinson PJ, Roufogalis BD. The small GTPases Rab5 and RalA regulate intracellular traffic of P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773(7):1062-72.
110. Fu L, Rab A, Tang L, Bebok Z, Rowe SM, Bartoszewski R, et al. DeltaF508 CFTR surface stability is regulated by DAB2 and CHIP-mediated ubiquitination in post-endocytic compartments. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123131.
111. Gagliardi PA, di Blasio L, Puliafito A, Seano G, Sessa R, Chianale F, et al. PDK1-mediated activation of MRCKalpha regulates directional cell migration and lamellipodia retraction. *J Cell Biol.* 2014;206(3):415-34.
112. Ganne-Carrie N, Baussan C, Grando V, Gaudelus J, Cresteil D, Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 revealed by oral contraceptive pills. *J Hepatol.* 2003;38(5):693-4.
113. Garcia-Bermejo ML, Leskow FC, Fujii T, Wang Q, Blumberg PM, Ohba M, et al. Diacylglycerol (DAG)-lactones, a new class of protein kinase C (PKC) agonists, induce apoptosis in LNCaP prostate cancer cells by selective activation of PKCalpha. *J Biol Chem.* 2002;277(1):645-55.
114. Gasman S, Chasserot-Golaz S, Malacombe M, Way M, Bader MF. Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol Biol Cell.* 2004;15(2):520-31.
115. Gatmaitan ZC, Nies AT, Arias IM. Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver. *Am J Physiol.* 1997;272(5 Pt 1):G1041-9.
116. Gautherot J. Maturation et trafic intracellulaire du transporteur biliaire ABCB4 : effet de mutations: Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; 2012.
117. Gautherot J, Claudel T, Cuperus F, Fuchs CD, Falguieres T, Trauner M. Thyroid hormone receptor beta1 stimulates ABCB4 to increase biliary phosphatidylcholine excretion in mice. *J Lipid Res.* 2018;59(9):1610-9.

118. Gautherot J, Delautier D, Maubert MA, Ait-Slimane T, Bolbach G, Delaunay JL, et al. Phosphorylation of ABCB4 impacts its function: insights from disease-causing mutations. *Hepatology*. 2014;60(2):610-21.
119. Gautherot J, Durand-Schneider AM, Delautier D, Delaunay JL, Rada A, Gabillet J, et al. Effects of cellular, chemical, and pharmacological chaperones on the rescue of a trafficking-defective mutant of the ATP-binding cassette transporter proteins ABCB1/ABCB4. *J Biol Chem*. 2012;287(7):5070-8.
120. Ge T, Zhang X, Xiao Y, Wang Y, Zhang T. Novel compound heterozygote mutations of TJP2 in a Chinese child with progressive cholestatic liver disease. *BMC Med Genet*. 2019;20(1):18.
121. Geier A, Wagner M, Dietrich CG, Trauner M. Principles of hepatic organic anion transporter regulation during cholestasis, inflammation and liver regeneration. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(3):283-308.
122. Geillon FT, D.; Gondcaille, C.; Lizard, G.; Savary, S. Transporteurs ABC peroxysomaux et adrénoleucodystrophie liée au chromosome X. *Medecine/Sciences (Paris)* [Internet]. 2012; 28(12):[1087-94 pp.].
123. Gentric G, Desdouets C. Polyploidization in liver tissue. *Am J Pathol*. 2014;184(2):322-31.
124. Germann UA, Chambers TC, Ambudkar SV, Licht T, Cardarelli CO, Pastan I, et al. Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1996;271(3):1708-16.
125. Ghonem NS, Ananthanarayanan M, Soroka CJ, Boyer JL. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates human multidrug resistance transporter 3/ATP-binding cassette protein subfamily B4 transcription and increases rat biliary phosphatidylcholine secretion. *Hepatology*. 2014;59(3):1030-42.
126. Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life*. 2010;62(6):414-28.
127. Glantz A, Reilly SJ, Benthin L, Lammert F, Mattsson LA, Marschall HU. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Amelioration of pruritus by UDCA is associated with decreased progesterone disulphates in urine. *Hepatology*. 2008;47(2):544-51.
128. Golomb E, Ma X, Jana SS, Preston YA, Kawamoto S, Shoham NG, et al. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *J Biol Chem*. 2004;279(4):2800-8.
129. Gomes ER, Jani S, Gundersen GG. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell*. 2005;121(3):451-63.
130. Gomez-Ospina N, Potter CJ, Xiao R, Manickam K, Kim MS, Kim KH, et al. Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Commun*. 2016;7:10713.
131. Gonzales E, Davit-Spraul A, Baussan C, Buffet C, Maurice M, Jacquemin E. Liver diseases related to MDR3 (ABCB4) gene deficiency. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:4242-56.
132. Gonzales E, Grosse B, Cassio D, Davit-Spraul A, Fabre M, Jacquemin E. Successful mutation-specific chaperone therapy with 4-phenylbutyrate in a child with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J Hepatol*. 2012;57(3):695-8.
133. Gonzales E, Grosse B, Schuller B, Davit-Spraul A, Conti F, Guettier C, et al. Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology*. 2015;62(2):558-66.

134. Gordo-Gilart R, Andueza S, Hierro L, Jara P, Alvarez L. Functional Rescue of Trafficking-Impaired ABCB4 Mutants by Chemical Chaperones. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150098.
135. Gotthardt D, Runz H, Keitel V, Fischer C, Flechtenmacher C, Wirtenberger M, et al. A mutation in the canalicular phospholipid transporter gene, ABCB4, is associated with cholestasis, ductopenia, and cirrhosis in adults. *Hepatology*. 2008;48(4):1157-66.
136. Goubault P, Brunel T, Rode A, Bancel B, Mohkam K, Mabrut JY. Low-Phospholipid Associated Cholelithiasis (LPAC) syndrome: A synthetic review. *J Visc Surg*. 2019.
137. Grassie ME, Moffat LD, Walsh MP, MacDonald JA. The myosin phosphatase targeting protein (MYPT) family: a regulated mechanism for achieving substrate specificity of the catalytic subunit of protein phosphatase type 1delta. *Arch Biochem Biophys*. 2011;510(2):147-59.
138. Grisham JW. Organizational Principles of the Liver. In: Arias IM, editor. *The Liver Biology and Pathobiology*. 52009.
139. Groen A, Romero MR, Kunne C, Hoosdally SJ, Dixon PH, Wooding C, et al. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1927-37 e1-4.
140. Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*. 1986;47(3):371-80.
141. Gu HM, Li G, Gao X, Berthiaume LG, Zhang DW. Characterization of palmitoylation of ATP binding cassette transporter G1: effect on protein trafficking and function. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(6):1067-78.
142. Gupta S, Todd Stravitz R, Pandak WM, Muller M, Reno Vlahcevic Z, Hylemon PB. Regulation of multidrug resistance 2 P-glycoprotein expression by bile salts in rats and in primary cultures of rat hepatocytes. *Hepatology*. 2000;32(2):341-7.
143. Hagemeyer MC, Siegwart DJ, Strug LJ, Cebotaru L, Torres MJ, Sofoluwe A, et al. Translational research to enable personalized treatment of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2018;17(2S):S46-S51.
144. Hagey LR, Crombie DL, Espinosa E, Carey MC, Igimi H, Hofmann AF. Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J Lipid Res*. 1993;34(11):1911-7.
145. Halilbasic E, Claudel T, Trauner M. Bile acid transporters and regulatory nuclear receptors in the liver and beyond. *J Hepatol*. 2013;58(1):155-68.
146. Harris KP, Tepass U. Cdc42 and vesicle trafficking in polarized cells. *Traffic*. 2010;11(10):1272-9.
147. Hartman MA, Spudich JA. The myosin superfamily at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(Pt 7):1627-32.
148. Haussinger D, Schmitt M, Weiergraber O, Kubitz R. Short-term regulation of canalicular transport. *Seminars in Liver Disease*. 2000;20(3):307-21.
149. Hayashi H, Sugiyama Y. 4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps. *Hepatology*. 2007;45(6):1506-16.
150. Hegyi Z, Homolya L. Functional Cooperativity between ABCG4 and ABCG1 Isoforms. *PLoS One*. 2016;11(5):e0156516.
151. Henkel SA, Squires JH, Ayers M, Ganoza A, McKiernan P, Squires JE. Expanding etiology of progressive familial intrahepatic cholestasis. *World J Hepatol*. 2019;11(5):450-63.
152. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology*. 1992;8:67-113.

153. Hoffman AF. Bile Acids and the Enterohepatic Circulation. In: Arias IM, editor. *The Liver Biology and Pathobiology*: Wiley-Blackwell; 2009. p. 289 ; 300.
154. Homolya L, Fu D, Sengupta P, Jarnik M, Gillet JP, Vitale-Cross L, et al. LKB1/AMPK and PKA control ABCB11 trafficking and polarization in hepatocytes. *PLoS One*. 2014;9(3):e91921.
155. Honda A, Ikegami T, Nakamuta M, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, et al. Anticholestatic effects of bezafibrate in patients with primary biliary cirrhosis treated with ursodeoxycholic acid. *Hepatology*. 2013;57(5):1931-41.
156. Housset C, Chretien Y, Debray D, Chignard N. Functions of the Gallbladder. *Compr Physiol*. 2016;6(3):1549-77.
157. Hu HF, Xu WW, Wang Y, Zheng CC, Zhang WX, Li B, et al. Comparative Proteomics Analysis Identifies Cdc42-Cdc42BPA Signaling as Prognostic Biomarker and Therapeutic Target for Colon Cancer Invasion. *J Proteome Res*. 2018;17(1):265-75.
158. Huang JF, Wen CJ, Zhao GZ, Dai Y, Li Y, Wu LX, et al. Overexpression of ABCB4 contributes to acquired doxorubicin resistance in breast cancer cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2018;82(2):199-210.
159. Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, et al. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem*. 2003;278(51):51085-90.
160. Hundt M, John S. *Physiology, Bile Secretion*. StatPearls. Treasure Island (FL)2019.
161. Ikebuchi Y, Takada T, Ito K, Yoshikado T, Anzai N, Kanai Y, et al. Receptor for activated C-kinase 1 regulates the cellular localization and function of ABCB4. *Hepatol Res*. 2009;39(11):1091-107.
162. Ikeda Y, Morita SY, Hatano R, Tsuji T, Terada T. Enhancing effect of taurohyodeoxycholate on ABCB4-mediated phospholipid efflux. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2019.
163. Ikenaga N, Liu SB, Sverdlov DY, Yoshida S, Nasser I, Ke Q, et al. A new Mdr2(-/-) mouse model of sclerosing cholangitis with rapid fibrosis progression, early-onset portal hypertension, and liver cancer. *Am J Pathol*. 2015;185(2):325-34.
164. Ito M, Nakano T, Erdodi F, Hartshorne DJ. Myosin phosphatase: structure, regulation and function. *Mol Cell Biochem*. 2004;259(1-2):197-209.
165. Iwasaki T, Murata-Hori M, Ishitobi S, Hosoya H. Diphosphorylated MRLC is required for organization of stress fibers in interphase cells and the contractile ring in dividing cells. *Cell Struct Funct*. 2001;26(6):677-83.
166. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2012;36 Suppl 1:S26-35.
167. Jacquemin E, De Vree JM, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, et al. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1448-58.
168. Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(1):133-7.
169. Jacquemin E, Hermans D, Myara A, Habes D, Debray D, Hadchouel M, et al. Ursodeoxycholic acid therapy in pediatric patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*. 1997;25(3):519-23.
170. Javitt NB. History of hepatic bile formation: old problems, new approaches. *Adv Physiol Educ*. 2014;38(4):279-85.
171. Jih KY, Hwang TC. Vx-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(11):4404-9.

172. Juan YS, Chuang SM, Long CY, Lin RJ, Liu KM, Wu WJ, et al. Protein kinase C inhibitor prevents renal apoptotic and fibrotic changes in response to partial ureteric obstruction. *BJU Int.* 2012;110(2):283-92.
173. Jung D, Elferink MG, Stellaard F, Groothuis GM. Analysis of bile acid-induced regulation of FXR target genes in human liver slices. *Liver Int.* 2007;27(1):137-44.
174. Jung D, Kullak-Ublick GA. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha: a key mediator of the effect of bile acids on gene expression. *Hepatology.* 2003;37(3):622-31.
175. Kale VP, Hengst JA, Desai DH, Dick TE, Choe KN, Colledge AL, et al. A novel selective multikinase inhibitor of ROCK and MRCK effectively blocks cancer cell migration and invasion. *Cancer Lett.* 2014;354(2):299-310.
176. Kano M, Shoda J, Sumazaki R, Oda K, Nimura Y, Tanaka N. Mutations identified in the human multidrug resistance P-glycoprotein 3 (ABCB4) gene in patients with primary hepatolithiasis. *Hepatol Res.* 2004;29(3):160-6.
177. Kapoor K, Bhatnagar J, Chufan EE, Ambudkar SV. Mutations in intracellular loops 1 and 3 lead to misfolding of human P-glycoprotein (ABCB1) that can be rescued by cyclosporine A, which reduces its association with chaperone Hsp70. *J Biol Chem.* 2013;288(45):32622-36.
178. Karpen SJ. Nuclear receptor regulation of hepatic function. *J Hepatol.* 2002;36(6):832-50.
179. Katayama K, Yamaguchi M, Noguchi K, Sugimoto Y. Protein phosphatase complex PP5/PPP2R3C dephosphorylates P-glycoprotein/ABCB1 and down-regulates the expression and function. *Cancer Lett.* 2014;345(1):124-31.
180. Katayama KN, K.; Sugimoto, Y. Regulations of P-Glycoprotein/ABCB1/MDR1 in Human Cancer Cells. *New Journal of Science.* 2014;vol. 2014.
181. Kawaguchi K, Morita M. ABC Transporter Subfamily D: Distinct Differences in Behavior between ABCD1-3 and ABCD4 in Subcellular Localization, Function, and Human Disease. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6786245.
182. Kawamoto T, Okano G, Akino T. Biosynthesis and turnover of individual molecular species of phosphatidylcholine in liver and bile. *Biochim Biophys Acta.* 1980;619(1):20-34.
183. Keating D, Marigowda G, Burr L, Daines C, Mall MA, McKone EF, et al. VX-445-Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med.* 2018;379(17):1612-20.
184. Kellermayer R. Translational readthrough induction of pathogenic nonsense mutations. *Eur J Med Genet.* 2006;49(6):445-50.
185. Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, et al. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet.* 2008;372(9640):719-27.
186. Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, Accurso FJ, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, et al. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med.* 2014;2(7):539-47.
187. Kiehl S, Herkt SC, Richter AM, Fuhrmann L, El-Nikhely N, Seeger W, et al. ABCB4 is frequently epigenetically silenced in human cancers and inhibits tumor growth. *Sci Rep.* 2014;4:6899.
188. Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, et al. Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet.* 2002;31(3):320-5.

189. Kim H, Barroso M, Samanta R, Greenberger L, Sztul E. Experimentally induced changes in the endocytic traffic of P-glycoprotein alter drug resistance of cancer cells. *Am J Physiol.* 1997;273(2 Pt 1):C687-702.
190. Kim Y, Chen J. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science.* 2018;359(6378):915-9.
191. Kinting S, Hoppner S, Schindlbeck U, Forstner ME, Harfst J, Wittmann T, et al. Functional rescue of misfolding ABCA3 mutations by small molecular correctors. *Hum Mol Genet.* 2018;27(6):943-53.
192. Kioussi C, Appu M, Lohr CV, Fischer KA, Bajaj G, Leid M, et al. Co-expression of myosin II regulatory light chain and the NMDAR1 subunit in neonatal and adult mouse brain. *Brain Res Bull.* 2007;74(6):439-51.
193. Kipp H, Arias IM. Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver. *J Biol Chem.* 2000;275(21):15917-25.
194. Kipp H, Pichetshote N, Arias IM. Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J Biol Chem.* 2001;276(10):7218-24.
195. Klaassen CD, Aleksunes LM. Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol Rev.* 2010;62(1):1-96.
196. Kocher O, Comella N, Gilchrist A, Pal R, Tognazzi K, Brown LF, et al. PDZK1, a novel PDZ domain-containing protein up-regulated in carcinomas and mapped to chromosome 1q21, interacts with cMOAT (MRP2), the multidrug resistance-associated protein. *Lab Invest.* 1999;79(9):1161-70.
197. Kolling R, Losko S. The linker region of the ABC-transporter Ste6 mediates ubiquitination and fast turnover of the protein. *EMBO J.* 1997;16(9):2251-61.
198. Koshiba S, An R, Saito H, Wakabayashi K, Tamura A, Ishikawa T. Human ABC transporters ABCG2 (BCRP) and ABCG4. *Xenobiotica.* 2008;38(7-8):863-88.
199. Kusters A, Karpen SJ. Bile acid transporters in health and disease. *Xenobiotica.* 2008;38(7-8):1043-71.
200. Kovacs M, Wang F, Hu A, Zhang Y, Sellers JR. Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38132-40.
201. Kubitz R, Huth C, Schmitt M, Horbach A, Kullak-Ublick G, Haussinger D. Protein kinase C-dependent distribution of the multidrug resistance protein 2 from the canalicular to the basolateral membrane in human HepG2 cells. *Hepatology.* 2001;34(2):340-50.
202. Kubitz R, Sutfels G, Kuhlkamp T, Kolling R, Haussinger D. Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase. *Gastroenterology.* 2004;126(2):541-53.
203. Kurz AK, Graf D, Schmitt M, Vom Dahl S, Haussinger D. Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats. *Gastroenterology.* 2001;121(2):407-19.
204. Lam P, Xu S, Soroka CJ, Boyer JL. A C-terminal tyrosine-based motif in the bile salt export pump directs clathrin-dependent endocytosis. *Hepatology.* 2012;55(6):1901-11.
205. Lambert G, Becker B, Schreiber R, Boucherot A, Reth M, Kunzelmann K. Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression by BAP31. *J Biol Chem.* 2001;276(23):20340-5.

206. Lambert G, Krempf M. Une maladie métabolique à l'origine de la découverte des transporteurs ABCG5 et ABCG8 modulant l'absorption intestinale du cholestérol. *Médecine / Sciences*. 2001;06 - 07:815 - 6.
207. Lang C, Meier Y, Stieger B, Beuers U, Lang T, Kerb R, et al. Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(1):47-60.
208. Lapierre LA, Kumar R, Hales CM, Navarre J, Bhartur SG, Burnette JO, et al. Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol Biol Cell*. 2001;12(6):1843-57.
209. Lee IC, Leung T, Tan I. Adaptor protein LRAP25 mediates myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase (MRCK) regulation of LIMK1 protein in lamellipodial F-actin dynamics. *J Biol Chem*. 2014;289(39):26989-7003.
210. Lee LA, Karabina A, Broadwell LJ, Leinwand LA. The ancient sarcomeric myosins found in specialized muscles. *Skelet Muscle*. 2019;9(1):7.
211. Lefort K, Mandinova A, Ostano P, Kolev V, Calpini V, Kolfshoten I, et al. Notch1 is a p53 target gene involved in human keratinocyte tumor suppression through negative regulation of ROCK1/2 and MRCKalpha kinases. *Genes Dev*. 2007;21(5):562-77.
212. Leung T, Chen XQ, Tan I, Manser E, Lim L. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol Cell Biol*. 1998;18(1):130-40.
213. Li J, Dawson PA. Animal models to study bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(5):895-911.
214. Li L, Wu X, Yue HY, Zhu YC, Xu J. Myosin light chain kinase facilitates endocytosis of synaptic vesicles at hippocampal boutons. *J Neurochem*. 2016;138(1):60-73.
215. Li M, Soroka CJ, Harry K, Boyer JL. CFTR-associated ligand is a negative regulator of Mrp2 expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;312(1):C40-C6.
216. Li M, Wang W, Soroka CJ, Mennone A, Harry K, Weinman EJ, et al. NHERF-1 binds to Mrp2 and regulates hepatic Mrp2 expression and function. *J Biol Chem*. 2010;285(25):19299-307.
217. Li N, Cui Z, Fang F, Lee JY, Ballatori N. Heterodimerization, trafficking and membrane topology of the two proteins, Ost alpha and Ost beta, that constitute the organic solute and steroid transporter. *Biochem J*. 2007;407(3):363-72.
218. Li Z, Agellon LB, Vance DE. Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure. *J Biol Chem*. 2005;280(45):37798-802.
219. Li Z, Agellon LB, Vance DE. The role of phosphatidylethanolamine methyltransferase in a mouse model of intrahepatic cholestasis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1811(4):278-83.
220. Lincke CR, Smit JJ, van der Velde-Koerts T, Borst P. Structure of the human MDR3 gene and physical mapping of the human MDR locus. *J Biol Chem*. 1991;266(8):5303-10.
221. Ling V. Drug resistance and membrane alteration in mutants of mammalian cells. *Can J Genet Cytol*. 1975;17(4):503-15.
222. Linton KJ. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:122-30.
223. Liu Y, Binz J, Numerick MJ, Dennis S, Luo G, Desai B, et al. Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra- and extrahepatic cholestasis. *J Clin Invest*. 2003;112(11):1678-87.
224. Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23(6):487-93.

225. Lowe HI, Watson CT, Badal S, Toyang NJ, Bryant J. Cycloartane-3,24,25-triol inhibits MRCK α kinase and demonstrates promising anti prostate cancer activity in vitro. *Cancer Cell Int.* 2012;12(1):46.
226. Lozano E, Briz O, Macias RIR, Serrano MA, Marin JGG, Herraez E. Genetic Heterogeneity of SLC22 Family of Transporters in Drug Disposition. *J Pers Med.* 2018;8(2).
227. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell.* 2000;6(3):507-15.
228. Lucena JF, Herrero JI, Quiroga J, Sangro B, Garcia-Foncillas J, Zabalegui N, et al. A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis. *Gastroenterology.* 2003;124(4):1037-42.
229. Macalou S, Robey RW, Jabor Gozzi G, Shukla S, Grosjean I, Hegedus T, et al. The linker region of breast cancer resistance protein ABCG2 is critical for coupling of ATP-dependent drug transport. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(9):1927-37.
230. Madenci D, Egelhaaf SU. Self-assembly in aqueous bile salt solutions. *Curr Opin Colloid In.* 2010;15(1-2):109-15.
231. Maldonado-Valderrama J, Wilde P, Macierzanka A, Mackie A. The role of bile salts in digestion. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;165(1):36-46.
232. Mall MA, Sheppard DN. Chronic ivacaftor treatment: getting F508del-CFTR into more trouble? *J Cyst Fibros.* 2014;13(6):605-7.
233. Marigo V, Nigro A, Pecci A, Montanaro D, Di Stazio M, Balduini CL, et al. Correlation between the clinical phenotype of MYH9-related disease and tissue distribution of class II nonmuscle myosin heavy chains. *Genomics.* 2004;83(6):1125-33.
234. Mariotti V, Strazzabosco M, Fabris L, Calvisi DF. Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(4 Pt B):1254-61.
235. Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Egea G. Association of Cdc42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway with Golgi membranes. *Traffic.* 2004;5(11):838-46.
236. Matthes E, Goepf J, Carlile GW, Luo Y, Deigaard K, Billet A, et al. Low free drug concentration prevents inhibition of F508del CFTR functional expression by the potentiator VX-770 (ivacaftor). *Br J Pharmacol.* 2016;173(3):459-70.
237. Mauad TH, van Nieuwkerk CM, Dingemans KP, Smit JJ, Schinkel AH, Notenboom RG, et al. Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol.* 1994;145(5):1237-45.
238. Melin P, Thoreau V, Norez C, Bilan F, Kitzis A, Becq F. The cystic fibrosis mutation G1349D within the signature motif LSHGH of NBD2 abolishes the activation of CFTR chloride channels by genistein. *Biochem Pharmacol.* 2004;67(12):2187-96.
239. Mengesha AE, Bummer PM. Simple chromatographic method for simultaneous analyses of phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, and free fatty acids. *AAPS PharmSciTech.* 2010;11(3):1084-91.
240. Misra S, Ujhazy P, Gatmaitan Z, Varticovski L, Arias IM. The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver. *J Biol Chem.* 1998;273(41):26638-44.
241. Misra S, Ujhazy P, Varticovski L, Arias IM. Phosphoinositide 3-kinase lipid products regulate ATP-dependent transport by sister of P-glycoprotein and multidrug resistance associated protein 2 in bile canalicular membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(10):5814-9.

242. Misra S, Varticovski L, Arias IM. Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;285(2):G316-24.
243. Morita SY, Kobayashi A, Takanezawa Y, Kioka N, Handa T, Arai H, et al. Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4. *Hepatology*. 2007;46(1):188-99.
244. Musch A. The unique polarity phenotype of hepatocytes. *Exp Cell Res*. 2014;328(2):276-83.
245. Nakagawa H, Tamura A, Wakabayashi K, Hoshijima K, Komada M, Yoshida T, et al. Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of non-synonymous SNP variants of human ABC transporter ABCG2. *Biochem J*. 2008;411(3):623-31.
246. Nakagawa H, Toyoda Y, Wakabayashi-Nakao K, Tamaki H, Osumi M, Ishikawa T. Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of ABC transporters: a new aspect of genetic polymorphisms and clinical impacts. *J Pharm Sci*. 2011;100(9):3602-19.
247. Nakagawa H, Wakabayashi-Nakao K, Tamura A, Toyoda Y, Koshiba S, Ishikawa T. Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS J*. 2009;276(24):7237-52.
248. Nakagawa S, Makino I, Ishizaki T, Dohi I. Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid. *Lancet*. 1977;2(8034):367-9.
249. Naoi S, Hayashi H, Inoue T, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, et al. Improved liver function and relieved pruritus after 4-phenylbutyrate therapy in a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J Pediatr*. 2014;164(5):1219-27 e3.
250. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2014;371(21):1994-2004.
251. Nemcova-Furstova V, Kopperova D, Balusikova K, Ehrlichova M, Brynychova V, Vaclavikova R, et al. Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporters. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016;310:215-28.
252. Newell-Litwa KA, Horwitz R, Lamers ML. Non-muscle myosin II in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Dis Model Mech*. 2015;8(12):1495-515.
253. Ng Y, Tan I, Lim L, Leung T. Expression of the human myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase gamma is regulated by promoter DNA methylation and Sp1 binding. *J Biol Chem*. 2004;279(33):34156-64.
254. Nicolaou M, Andress EJ, Zolnerciks JK, Dixon PH, Williamson C, Linton KJ. Canalicular ABC transporters and liver disease. *J Pathol*. 2012;226(2):300-15.
255. Norez C, Noel S, Wilke M, Bijvelds M, Jorna H, Melin P, et al. Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett*. 2006;580(8):2081-6.
256. Norez C, Vandebrouck C, Bertrand J, Noel S, Durieu E, Oumata N, et al. Roscovitine is a proteostasis regulator that corrects the trafficking defect of F508del-CFTR by a CDK-independent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2014;171(21):4831-49.
257. O'Brien VP, Bokelmann K, Ramirez J, Jobst K, Ratain MJ, Brockmoller J, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 regulates the expression of the organic cation transporter 1 via binding to an evolutionary conserved region in intron 1 of the OCT1 gene. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;347(1):181-92.

258. Ortiz DF, Moseley J, Calderon G, Swift AL, Li S, Arias IM. Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and regulates its abundance in the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. 2004;279(31):32761-70.
259. Park I, Han C, Jin S, Lee B, Choi H, Kwon JT, et al. Myosin regulatory light chains are required to maintain the stability of myosin II and cellular integrity. *Biochem J*. 2011;434(1):171-80.
260. Park SW, Schonhoff CM, Webster CR, Anwer MS. Protein kinase Cdelta differentially regulates cAMP-dependent translocation of NTCP and MRP2 to the plasma membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;303(5):G657-65.
261. Pasmant E, Goussard P, Baranes L, Laurendeau I, Quentin S, Ponsot P, et al. First description of ABCB4 gene deletions in familial low phospholipid-associated cholelithiasis and oral contraceptives-induced cholestasis. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(3):277-82.
262. Paulusma CC, Groen A, Kunne C, Ho-Mok KS, Spijkerboer AL, Rudi de Waart D, et al. Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport. *Hepatology*. 2006;44(1):195-204.
263. Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology*. 2002;36(3):525-31.
264. Paytubi S, Morrice NA, Boudeau J, Proud CG. The N-terminal region of ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor eIF2 and is a target for regulatory phosphorylation by CK2. *Biochem J*. 2008;409(1):223-31.
265. Pecci A, Ma X, Savoia A, Adelstein RS. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. *Gene*. 2018;664:152-67.
266. Perkins LA, Fisher GW, Naganbabu M, Schmidt BF, Mun F, Bruchez MP. High-Content Surface and Total Expression siRNA Kinase Library Screen with VX-809 Treatment Reveals Kinase Targets that Enhance F508del-CFTR Rescue. *Mol Pharm*. 2018;15(3):759-67.
267. Perland E, Fredriksson R. Classification Systems of Secondary Active Transporters. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(3):305-15.
268. Podda M, Ghezzi C, Battezzati PM, Bertolini E, Crosignani A, Petroni ML, et al. Effect of different doses of ursodeoxycholic acid in chronic liver disease. *Dig Dis Sci*. 1989;34(12 Suppl):59S-65S.
269. Popov Y, Patsenker E, Fickert P, Trauner M, Schuppan D. Mdr2 (Abcb4)^{-/-} mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J Hepatol*. 2005;43(6):1045-54.
270. Portal I, Clerc T, Sbarra V, Portugal H, Pauli AM, Lafont H, et al. Importance of high-density lipoprotein-phosphatidylcholine in secretion of phospholipid and cholesterol in bile. *Am J Physiol*. 1993;264(6 Pt 1):G1052-6.
271. Portincasa P, Calamita G. Water channel proteins in bile formation and flow in health and disease: when immiscible becomes miscible. *Mol Aspects Med*. 2012;33(5-6):651-64.
272. Pranke I, Bidou L, Martin N, Blanchet S, Hatton A, Karri S, et al. Factors influencing readthrough therapy for frequent cystic fibrosis premature termination codons. *ERJ Open Res*. 2018;4(1).
273. Presa N, Clugston RD, Lingrell S, Kelly SE, Merrill AH, Jr., Jana S, et al. Vitamin E alleviates non-alcoholic fatty liver disease in phosphatidylethanolamine N-methyltransferase deficient mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019;1865(1):14-25.
274. Prince LS, Peter K, Hatton SR, Zaliauskiene L, Cotlin LF, Clancy JP, et al. Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a tyrosine-based signal. *J Biol Chem*. 1999;274(6):3602-9.

275. Quistgaard EM, Low C, Moberg P, Guettou F, Maddi K, Nordlund P. Structural and biophysical characterization of the cytoplasmic domains of human BAP29 and BAP31. *PLoS One*. 2013;8(8):e71111.
276. Rao PS, Bickel U, Srivenugopal KS, Rao US. Bap29varP, a variant of Bap29, influences the cell surface expression of the human P-glycoprotein. *Int J Oncol*. 2008;32(1):135-44.
277. Raymond M, Rose E, Housman DE, Gros P. Physical mapping, amplification, and overexpression of the mouse *mdr* gene family in multidrug-resistant cells. *Mol Cell Biol*. 1990;10(4):1642-51.
278. Reardon J, Hussaini T, Alsaifi M, Azalgarra VM, Erb SR, Partovi N, et al. Ursodeoxycholic Acid in Treatment of Non-cholestatic Liver Diseases: A Systematic Review. *J Clin Transl Hepatol*. 2016;4(3):192-205.
279. Reshetnyak VI. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J Gastroenterol*. 2013;19(42):7341-60.
280. Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF, Keppler D. Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(4):G640-9.
281. Roelofsen H, Soroka CJ, Keppler D, Boyer JL. Cyclic AMP stimulates sorting of the canalicular organic anion transporter (Mrp2/cMoat) to the apical domain in hepatocyte couplets. *J Cell Sci*. 1998;111 (Pt 8):1137-45.
282. Rojas R, Ruiz WG, Leung SM, Jou TS, Apodaca G. Cdc42-dependent modulation of tight junctions and membrane protein traffic in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell*. 2001;12(8):2257-74.
283. Roma MG, Milkiewicz P, Elias E, Coleman R. Control by signaling modulators of the sorting of canalicular transporters in rat hepatocyte couplets: role of the cytoskeleton. *Hepatology*. 2000;32(6):1342-56.
284. Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1459-67.
285. Rosmorduc O, Poupon R. Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2:29.
286. Rost D, Kartenbeck J, Keppler D. Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology*. 1999;29(3):814-21.
287. Rubenstein RC, Egan ME, Zeitlin PL. In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest*. 1997;100(10):2457-65.
288. Ruetz S, Gros P. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell*. 1994;77(7):1071-81.
289. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:137-74.
290. Russell DW. Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S120-5.
291. Sabirzhanova I, Lopes Pacheco M, Rapino D, Grover R, Handa JT, Guggino WB, et al. Rescuing Trafficking Mutants of the ATP-binding Cassette Protein, ABCA4, with Small Molecule Correctors as a Treatment for Stargardt Eye Disease. *J Biol Chem*. 2015;290(32):19743-55.
292. Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, Komano T. Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem*. 1993;268(9):6077-80.

293. Sai Y, Nies AT, Arias IM. Bile acid secretion and direct targeting of mdr1-green fluorescent protein from Golgi to the canalicular membrane in polarized WIF-B cells. *J Cell Sci.* 1999;112 (Pt 24):4535-45.
294. Sambrotta M, Thompson RJ. Mutations in TJP2, encoding zona occludens 2, and liver disease. *Tissue Barriers.* 2015;3(3):e1026537.
295. Schell MJ, Maurice M, Stieger B, Hubbard AL. 5'nucleotidase is sorted to the apical domain of hepatocytes via an indirect route. *J Cell Biol.* 1992;119(5):1173-82.
296. Schinkel AH, Kemp S, Dolle M, Rudenko G, Wagenaar E. N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein. *J Biol Chem.* 1993;268(10):7474-81.
297. Schonhoff CM, Webster CR, Anwer MS. Taurolithocholate-induced MRP2 retrieval involves MARCKS phosphorylation by protein kinase C in HUH-NTCP Cells. *Hepatology.* 2013;58(1):284-92.
298. Schroeder BM, M. Endocytosis as an essential process in liver function and pathology. In: Arias IM, editor. *The Liver Biology and Pathobiology: Wiley-Blackwell; 2009.*
299. Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, et al. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(10):1262-72.
300. Sharanek A, Burban A, Burbank M, Le Guevel R, Li R, Guillouzo A, et al. Rho-kinase/myosin light chain kinase pathway plays a key role in the impairment of bile canaliculi dynamics induced by cholestatic drugs. *Sci Rep.* 2016;6:24709.
301. Shi B, Li S, Ju H, Liu X, Li D, Li Y. Protein kinase C inhibitor chelerythrine attenuates partial unilateral ureteral obstruction induced kidney injury in neonatal rats. *Life Sci.* 2019;216:85-91.
302. Short B. The first buds of Cdc42. *J Cell Biol.* 2015;209(6):780.
303. Shutova MS, Svitkina TM. Common and Specific Functions of Nonmuscle Myosin II Paralogs in Cells. *Biochemistry (Mosc).* 2018;83(12):1459-68.
304. Siew SM, Cunningham SC, Zhu E, Tay SS, Venuti E, Bolitho C, et al. Prevention of cholestatic liver disease and reduced tumorigenicity in a murine model of PFIC type 3 using hybrid AAV-piggyBac gene therapy. *Hepatology.* 2019.
305. Singaraja RR, Kang MH, Vaid K, Sanders SS, Vilas GL, Arstikaitis P, et al. Palmitoylation of ATP-binding cassette transporter A1 is essential for its trafficking and function. *Circ Res.* 2009;105(2):138-47.
306. Sissung TM, Deeken J, Leibrand CR, Price DK, Ehrlich S, Steinberg SM, et al. Identification of novel SNPs associated with risk and prognosis in patients with castration-resistant prostate cancer. *Pharmacogenomics.* 2016;17(18):1979-86.
307. Slimane TA, Trugnan G, Van ISC, Hoekstra D. Raft-mediated trafficking of apical resident proteins occurs in both direct and transcytotic pathways in polarized hepatic cells: role of distinct lipid microdomains. *Mol Biol Cell.* 2003;14(2):611-24.
308. Smit JJ, Schinkel AH, Mol CA, Majoor D, Mooi WJ, Jongsma AP, et al. Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab Invest.* 1994;71(5):638-49.
309. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, et al. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell.* 1993;75(3):451-62.
310. Smith A, L'Imperio V, Ajello E, Ferrario F, Mosele N, Stella M, et al. The putative role of MALDI-MSI in the study of Membranous Nephropathy. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1865(7):865-74.

311. Smith AJ, de Vree JM, Ottenhoff R, Oude Elferink RP, Schinkel AH, Borst P. Hepatocyte-specific expression of the human MDR3 P-glycoprotein gene restores the biliary phosphatidylcholine excretion absent in Mdr2 (-/-) mice. *Hepatology*. 1998;28(2):530-6.
312. Smith AJ, van Helvoort A, van Meer G, Szabo K, Welker E, Szakacs G, et al. MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem*. 2000;275(31):23530-9.
313. Sumi T, Matsumoto K, Shibuya A, Nakamura T. Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *J Biol Chem*. 2001;276(25):23092-6.
314. Sundaram V, Bjornsson ES. Drug-induced cholestasis. *Hepatol Commun*. 2017;1(8):726-35.
315. Symons M, Rusk N. Control of vesicular trafficking by Rho GTPases. *Curr Biol*. 2003;13(10):R409-18.
316. Talaga ZJ, Vaidya PN. Dubin Johnson Syndrome. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2019.
317. Tan HJ, Deng M, Qiu JW, Wu JF, Song YZ. Monozygotic Twins Suffering From Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Deficiency: A Case Report. *Front Pediatr*. 2018;6:354.
318. Tan I, Cheong A, Lim L, Leung T. Genomic organization of human myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha reveals multiple alternative splicing and functional diversity. *Gene*. 2003;304:107-15.
319. Tan I, Lai J, Yong J, Li SF, Leung T. Chelerythrine perturbs lamellar actomyosin filaments by selective inhibition of myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase. *FEBS Lett*. 2011;585(9):1260-8.
320. Tan I, Ng CH, Lim L, Leung T. Phosphorylation of a novel myosin binding subunit of protein phosphatase 1 reveals a conserved mechanism in the regulation of actin cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21209-16.
321. Tan I, Seow KT, Lim L, Leung T. Intermolecular and intramolecular interactions regulate catalytic activity of myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *Mol Cell Biol*. 2001;21(8):2767-78.
322. Tan I, Yong J, Dong JM, Lim L, Leung T. A tripartite complex containing MRCK modulates lamellar actomyosin retrograde flow. *Cell*. 2008;135(1):123-36.
323. Taylor-Cousar JL, Mall MA, Ramsey BW, McKone EF, Tullis E, Marigowda G, et al. Clinical development of triple-combination CFTR modulators for cystic fibrosis patients with one or two F508del alleles. *ERJ Open Res*. 2019;5(2).
324. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, van der Ent CK, Moeller A, Simard C, et al. Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med*. 2017;377(21):2013-23.
325. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(8):678-93.
326. Tosheska Trajkovska K, Topuzovska S. High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: strategies for raising HDL cholesterol. *Anatol J Cardiol*. 2017;18(2):149-54.
327. Tougeron D, Fotsing G, Barbu V, Beauchant M. ABCB4/MDR3 gene mutations and cholangiocarcinomas. *J Hepatol*. 2012;57(2):467-8.
328. Treyer A, Musch A. Hepatocyte polarity. *Compr Physiol*. 2013;3(1):243-87.

329. Unbekandt M, Belshaw S, Bower J, Clarke M, Cordes J, Crighton D, et al. Discovery of Potent and Selective MRCK Inhibitors with Therapeutic Effect on Skin Cancer. *Cancer Res.* 2018;78(8):2096-114.
330. Unbekandt M, Croft DR, Crighton D, Mezna M, McArthur D, McConnell P, et al. A novel small-molecule MRCK inhibitor blocks cancer cell invasion. *Cell Commun Signal.* 2014;12:54.
331. Unbekandt M, Olson MF. The actin-myosin regulatory MRCK kinases: regulation, biological functions and associations with human cancer. *J Mol Med (Berl).* 2014;92(3):217-25.
332. Van der Blik AM, Baas F, Ten Houte de Lange T, Kooiman PM, Van der Velde-Koerts T, Borst P. The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver. *EMBO J.* 1987;6(11):3325-31.
333. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Cao D, Neuberger T, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(44):18825-30.
334. Van Goor F, Straley KS, Cao D, Gonzalez J, Hadida S, Hazlewood A, et al. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290(6):L1117-30.
335. van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, et al. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell.* 1996;87(3):507-17.
336. van Hengel J, D'Hooge P, Hooghe B, Wu X, Libbrecht L, De Vos R, et al. Continuous cell injury promotes hepatic tumorigenesis in *cdc42*-deficient mouse liver. *Gastroenterology.* 2008;134(3):781-92.
337. Vance DE. Physiological roles of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(3):626-32.
338. Vance JE, Nguyen TM, Vance DE. The biosynthesis of phosphatidylcholine by methylation of phosphatidylethanolamine derived from ethanolamine is not required for lipoprotein secretion by cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1986;875(3):501-9.
339. Vauthier V, Ben Saad A, Elie J, Oumata N, Durand-Schneider AM, Bruneau A, et al. Structural analogues of roscovitine rescue the intracellular traffic and the function of ER-retained ABCB4 variants in cell models. *Sci Rep.* 2019;9(1):6653.
340. Vauthier V, Housset C, Falguieres T. Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters. *Biochem Pharmacol.* 2017;136:1-11.
341. Vaz FM, Paulusma CC, Huidekoper H, de Ru M, Lim C, Koster J, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) deficiency: conjugated hypercholanemia without a clear clinical phenotype. *Hepatology.* 2015;61(1):260-7.
342. Vazhappilly R, Wee KS, Sucher NJ, Low CM. A non-muscle myosin II motor links NR1 to retrograde trafficking and proteasomal degradation in PC12 cells. *Neurochem Int.* 2010;56(4):569-76.
343. Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, et al. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell.* 2016;27(3):424-33.
344. Veit G, Avramescu RG, Perdomo D, Phuan PW, Bagdany M, Apaja PM, et al. Some gating potentiators, including VX-770, diminish DeltaF508-CFTR functional expression. *Sci Transl Med.* 2014;6(246):246ra97.

345. Veit G, Xu H, Dreano E, Avramescu RG, Bagdany M, Beitel LK, et al. Structure-guided combination therapy to potentially improve the function of mutant CFTRs. *Nat Med.* 2018;24(11):1732-42.
346. Venot Q, Delaunay JL, Fouassier L, Delautier D, Falguieres T, Housset C, et al. A PDZ-Like Motif in the Biliary Transporter ABCB4 Interacts with the Scaffold Protein EBP50 and Regulates ABCB4 Cell Surface Expression. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146962.
347. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(11):778-90.
348. Wakabayashi Y, Dutt P, Lippincott-Schwartz J, Arias IM. Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(42):15087-92.
349. Wakabayashi Y, Lippincott-Schwartz J, Arias IM. Intracellular trafficking of bile salt export pump (ABCB11) in polarized hepatic cells: constitutive cycling between the canalicular membrane and rab11-positive endosomes. *Mol Biol Cell.* 2004;15(7):3485-96.
350. Wakabayashi YA, I. M. . Apical recycling of Canalicular ABC Transporters. In: Arias IM, editor. *The Liver Biology and Pathobiology*: Wiley-Blackwell; 2009. p. 349 ; 56.
351. Wakabayashi-Nakao K, Tamura A, Furukawa T, Nakagawa H, Ishikawa T. Quality control of human ABCG2 protein in the endoplasmic reticulum: ubiquitination and proteasomal degradation. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(1):66-72.
352. Wan S, Kuipers F, Havinga R, Ando H, Vance DE, Jacobs RL, et al. Impaired Hepatic Phosphatidylcholine Synthesis Leads to Cholestasis in Mice Challenged With a High-Fat Diet. *Hepatol Commun.* 2019;3(2):262-76.
353. Wang Y, Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Modulating the folding of P-glycoprotein and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator truncation mutants with pharmacological chaperones. *Mol Pharmacol.* 2007;71(3):751-8.
354. Watson JR, Owen D, Mott HR. Cdc42 in actin dynamics: An ordered pathway governed by complex equilibria and directional effector handover. *Small GTPases.* 2017;8(4):237-44.
355. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature.* 2007;447(7140):87-91.
356. Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat Cell Biol.* 2005;7(3):255-61.
357. Wilschanski M, Famini C, Blau H, Rivlin J, Augarten A, Avital A, et al. A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(3 Pt 1):860-5.
358. Wilschanski M, Miller LL, Shoseyov D, Blau H, Rivlin J, Aviram M, et al. Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2011;38(1):59-69.
359. Wojtal KA, de Vries E, Hoekstra D, van Ijzendoorn SC. Efficient trafficking of MDR1/P-glycoprotein to apical canalicular plasma membranes in HepG2 cells requires PKA-RIIalpha anchoring and glucosylceramide. *Mol Biol Cell.* 2006;17(8):3638-50.
360. Woods A, Heslegrave AJ, Muckett PJ, Levene AP, Clements M, Mobberley M, et al. LKB1 is required for hepatic bile acid transport and canalicular membrane integrity in mice. *Biochem J.* 2011;434(1):49-60.
361. Woodward OM, Kottgen A, Kottgen M. ABCG transporters and disease. *FEBS J.* 2011;278(18):3215-25.
362. Woodward OM, Tukaye DN, Cui J, Greenwell P, Constantoulakis LM, Parker BS, et al. Gout-causing Q141K mutation in ABCG2 leads to instability of the nucleotide-binding domain and can be corrected with small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(13):5223-8.

363. Xie C, Li N, Chen ZJ, Li BL, Song BL. The small GTPase Cdc42 interacts with Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) and controls its movement from endocytic recycling compartment to plasma membrane in a cholesterol-dependent manner. *J Biol Chem*. 2011;286(41):35933-42.
364. Xie Y, Burcu M, Linn DE, Qiu Y, Baer MR. Pim-1 kinase protects P-glycoprotein from degradation and enables its glycosylation and cell surface expression. *Mol Pharmacol*. 2010;78(2):310-8.
365. Yeh HI, Sohma Y, Conrath K, Hwang TC. A common mechanism for CFTR potentiators. *J Gen Physiol*. 2017;149(12):1105-18.
366. Yu H, Burton B, Huang CJ, Worley J, Cao D, Johnson JP, Jr., et al. Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *J Cyst Fibros*. 2012;11(3):237-45.
367. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, et al. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):16237-42.
368. Yuan H, Zhang H, Wu X, Zhang Z, Du D, Zhou W, et al. Hepatocyte-specific deletion of Cdc42 results in delayed liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2009;49(1):240-9.
369. Zanolungo S, Rigotti A, Nervi F. Hepatic cholesterol transport from plasma into bile: implications for gallstone disease. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15(3):279-86.
370. Zhang Q, Yang W, Song H, Wu H, Lu Y, He J, et al. Tissue distribution and ontogeny of multidrug resistance protein 2, a phosphatidylcholine translocator, in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2016;41(1):87-91.
371. Zhang Z, Liu F, Chen J. Conformational Changes of CFTR upon Phosphorylation and ATP Binding. *Cell*. 2017;170(3):483-91 e8.
372. Zhang Z, Wu JY, Hait WN, Yang JM. Regulation of the stability of P-glycoprotein by ubiquitination. *Mol Pharmacol*. 2004;66(3):395-403.
373. Zhao Z, Manser E. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases (MRCK), the ROCK-like effectors of Cdc42 and Rac1. *Small GTPases*. 2015;6(2):81-8.
374. Zhao ZS, Manser E. PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J*. 2005;386(Pt 2):201-14.
375. Zhou C, Verma S, Blumberg B. The steroid and xenobiotic receptor (SXR), beyond xenobiotic metabolism. *Nucl Recept Signal*. 2009;7:e001.
376. Zhu X, Song J, Mar MH, Edwards LJ, Zeisel SH. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) knockout mice have hepatic steatosis and abnormal hepatic choline metabolite concentrations despite ingesting a recommended dietary intake of choline. *Biochem J*. 2003;370(Pt 3):987-93.
377. Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet*. 1995;29:777-807.
378. Zioli M, Barbu V, Rosmorduc O, Frassati-Biaggi A, Barget N, Hermelin B, et al. ABCB4 heterozygous gene mutations associated with fibrosing cholestatic liver disease in adults. *Gastroenterology*. 2008;135(1):131-41.
379. Zollner G, Trauner M. Nuclear receptors as therapeutic targets in cholestatic liver diseases. *Br J Pharmacol*. 2009;156(1):7-27.
380. Zollner G, Wagner M, Moustafa T, Fickert P, Silbert D, Gumhold J, et al. Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-regulated organic solute transporter-alpha/beta in the adaptive response to bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(5):G923-32.

381. Zucchetti AE, Barosso IR, Boaglio A, Pellegrino JM, Ochoa EJ, Roma MG, et al. Prevention of estradiol 17beta-D-glucuronide-induced canalicular transporter internalization by hormonal modulation of cAMP in rat hepatocytes. *Mol Biol Cell*. 2011;22(20):3902-15.