



HAL
open science

Pharmacothérapie ciblée dans la cholestase intra hépatique familiale progressive de type 2 (PFIC2)

Rachida Amzal

► **To cite this version:**

Rachida Amzal. Pharmacothérapie ciblée dans la cholestase intra hépatique familiale progressive de type 2 (PFIC2). Biologie moléculaire. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS187 . tel-03275309

HAL Id: tel-03275309

<https://theses.hal.science/tel-03275309>

Submitted on 1 Jul 2021

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.

Pharmacothérapie ciblée de la cholestase familiale intrahépatique progressive de type 2 (PFIC2)

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à Orsay, Université Paris-Sud

École doctorale n°568 BIOSIGNE
Spécialité de doctorat : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 9 Juillet 2019, par

Rachida Amzal

Composition du Jury :

Tounsia Aït-Slimane Maître de conférences, UPMC (UMR_S 938)	Rapporteur
Marion Bouchecareilh Chargée de recherche CNRS, Université Bordeaux 2 (UMR 1053)	Rapporteur
Alain Lachaux PU-PH, Université Lyon 1 (UMR_S 851)	Examineur
Jean-Charles Duclos-Vallée PU-PH, Université Paris-Sud (UMR_S 1193)	Président
Emmanuel Gonzales PU-PH, Université Paris-Sud (UMR_S 1174)	Directeur de thèse

A mes chers parents

Remerciements

Je tiens à remercier en tout premier lieu mes rapporteurs : le Dr. Tounsia Aït-Slimane et le Dr. Marion Bouchecareilh ainsi que mes examinateurs : le Pr. Alain Lachaux et le Pr. Jean-Charles Duclos-Vallée qui me font l'honneur de juger mon travail, de me consacrer du temps pour lire ce document et m'écouter.

Je remercie mon directeur de thèse, le Pr. Emmanuel Gonzales pour la qualité de son encadrement, son suivi bienveillant et pour tout le temps qu'il a consacré à la préparation de cette thèse et le Pr. Emmanuel Jacquemin de m'avoir accordé une place dans son équipe et pour le temps qu'il a consacré pour faire avancer mes travaux. Je suis honorée d'avoir travaillé avec vous. J'ai appris tant de choses. Merci du fond du cœur.

Je remercie également « l'Association Maladie Foie Enfant, AMFE », « l'Association pour la Recherche en Hépatologie Pédiatrique, ARHP » et « l'Association Robert Debré pour la Recherche Médicale, ARDRM » ainsi que « la Plateforme d'expertise maladies rares Paris-Sud », en particulier Agnès Linglart qui ont bien voulu financer et soutenir mon projet. C'est grâce à elles que je suis arrivée à ce résultat.

J'adresse tout particulièrement un immense merci à Brigitte Grosse pour m'avoir transmis une partie de son savoir-faire, pour tous les conseils qu'elle m'a donnés, son entière disponibilité et sa bienveillance. Sans ton aide précieuse, je n'aurais jamais pu faire cette thèse. Je te dois tout. Je ne t'oublierai jamais Brigitte !

J'exprime aussi ma gratitude à Martine Lapalus et Elodie Mareux pour leur aide, disponibilité et conseils pour la concrétisation de ce projet. Votre gentillesse et votre soutien m'ont tellement apportés. Un grand et sincère merci pour tous ces moments de fous rires et de complicité que nous avons partagés ensemble. J'espère qu'on sera amenées à travailler de nouveau ensemble. Vous allez me manquer les filles ;)

Merci également à Mauricette Collado. Depuis que tu as rejoint notre équipe et surtout notre bureau, tu as été comme un rayon de soleil. Mômô, tu as égayé nos journées,

merci pour tout ce que tu as fait pour moi : le confocal, Photoshop, etc. Toujours disponible pour résoudre tous les problèmes. Je te serai toujours reconnaissante.

Je n'oublie pas Isabelle Garcin. Toujours à l'écoute. Ta pédagogie pour expliquer les choses est impressionnante. Merci pour tout Isa.

Merci Latifa. Ta bonne humeur est contagieuse. Merci ma chère amie d'être toujours à mon écoute. J'ai appris plein de choses en ta compagnie surtout pendant nos rendez-vous du midi. Tu vas me manquer Latifa.

Une pensée à tous les doctorants et post doctorants que j'ai côtoyés : Elodie, Marion, Camille, Laure, Nikolas, Amine, Tom, Gregory et Emilie. Merci pour votre soutien. Je n'oublierai jamais tous les moments que nous avons partagés ensemble.

Mes remerciements vont aussi au directeur de l'unité UMR_S1174, le Dr. Laurent Combettes, le Dr. Thierry Tordjmann ainsi qu'à tous les membres de l'Unité. Merci à tous pour votre aide au quotidien, j'ai passé des moments de bonheur avec vous, vous allez tous me manquer.

Au cours de ma thèse, j'ai eu la chance de collaborer avec Olivier Namy, Laure Bidou et Delphine Joseph. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre réactivité. Sans oublier Michel Lepoivre et Rodolphe Auger qui m'ont accueillie dans leur laboratoire pour mes expériences de radioactivité. Rodolphe, ton aide m'était très précieuse.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé chacune à sa façon à la réalisation de ce travail et toutes les personnes qui m'ont soutenues.

Je ne remercierai jamais assez mon très cher mari Mustapha et ma chère amie Naima pour leur soutien indéfectible. Je n'y serai jamais arrivée sans vous. Merci de m'avoir supportée et surtout d'avoir cru en moi. Merci d'être présents à mes côtés, j'ai vraiment de la chance de vous avoir.

A mes chers parents, toute ma famille et mes amis. Merci maman pour tes sacrifices. Ma réussite est la tienne, j'espère que tu seras fière de moi.

Table des matières

Introduction bibliographique.....	1
I- Généralités sur le foie	1
II- Rôle physiologique de la sécrétion biliaire.....	3
III- Composition de la bile.....	4
IV- La synthèse et la conjugaison des acides biliaires	5
V- Cycle entérohépatique	8
VI- La régulation de la synthèse des acides biliaires	9
VII- Transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire	11
1- Transporteurs sinusoidaux.....	16
A- Na ⁺ -taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP).....	16
B- Organic anion transporters polypeptides (OATPs).....	18
C- Organic solute transporter (OST α/β)	19
D- Les autres transporteurs	20
a- Multidrug resistant associated protein 3 (MRP3)	21
b- Multidrug resistant associated protein 4 (MRP4)	21
2- Transporteurs cytoplasmiques	22
3- Transporteurs canaliculaires	22
A- Multidrug resistance protein 1 (MDR1)	23
B- Multidrug resistance protein 3 (MDR3/ Mdr2)	24
C- Membres 5 et 8 de la sous famille G des transporteurs ABC : <i>ABCG5/8</i>	25
D- Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)	26
E- Familial intrahepatic cholestasis 1 (FIC1)	27
F- Bile salt export pump (BSEP).....	29
VIII- Biosynthèse et trafic intracellulaire d' <i>ABCB11</i>	33
1- Régulation transcriptionnelle de l'expression d' <i>ABCB11</i>	33
2- Biosynthèse de la chaîne polypeptidique et maturation	35
3- Trafic intracellulaire d' <i>ABCB11</i> dans les hépatocytes	37
A- Le ciblage polarisé	37
B- La stabilité membranaire, le recyclage et le réservoir intracellulaire	38
C- Les protéines partenaires du trafic intracellulaire	40
D- Les voies de dégradation des transporteurs ABC	42
a- Le protéasome	42
b- Le système lysosomal.....	43
IX- Les cholestases	44
1- Définition et étiologie.....	44

2-	Cholestases Familiales Intrahepatiques Progressives (PFIC).....	45
X-	La Cholestase Familiale Intrahepatique Progressive de type 2 : PFIC2.....	48
1-	Les mutations d'ABCB11/BSEP identifiées chez les patients.....	50
A-	Mutations et corrélation génotype-phénotype	51
B-	Effets des mutations sur le transporteur.....	53
2-	Les approches thérapeutiques ciblant les effets d'un défaut d'ABCB11	54
A-	Les thérapies actuelles : l'UDCA et la transplantation hépatique	54
B-	La pharmacothérapie ciblée	56
a-	Cibler les récepteurs nucléaires.....	58
b-	Les « supprimeurs » de codons stop.....	59
❖	Mécanisme de translecture	59
❖	Molécules inductrices de translecture.....	63
❖	Nature de l'acide aminé incorporé.....	65
c-	Les correcteurs	66
❖	Les chaperones chimiques	67
❖	Les chaperones pharmacologiques	67
❖	La modulation des chaperones moléculaires	70
d-	Les potentiateurs	71
C-	Autres thérapies alternatives	73
a-	La transplantation d'hépatocytes.....	73
b-	La thérapie génique	74
	Objectifs des travaux de thèse.....	76
	Matériels et méthodes	78
I-	Quantification de la translecture par mesure d'activité enzymatique : identification de mutations sensibles à la translecture.....	78
1-	Clonage des séquences cibles dans un plasmide rapporteur.....	78
2-	Cultures cellulaires, transfections et traitements	80
A-	Lignées cellulaires et conditions de culture	80
B-	Transfection	81
C-	Traitements	81
D-	Mesure de l'activité enzymatique	81
II-	Effet de la gentamicine et du PTC124, sur l'expression et la localisation de mutants stop de Bsep dans la lignée HEK293 et Can 10	82
1-	Présentation du plasmide vecteur	82
2-	Clonage des mutants.....	83
A-	Amplification et purification des plasmides mutés.....	84
B-	Vérification des plasmides par séquençage	84

3-	Cultures cellulaires, transfections et traitements	84
A-	Lignées cellulaires et conditions de culture	84
B-	Transfection transitoire des HEK293 et Can 10	85
C-	Traitements	86
D-	Immunofluorescence indirecte :	86
E-	Analyses microscopiques	86
F-	Quantification des cellules exprimant Bsep	87
G-	Western blot	87
III-	Étude fonctionnelle par mesure du transport vectoriel du taurocholate tritié.....	87
1-	Lignée cellulaire MDCK et conditions de culture	87
2-	Génération de clone MDCK stables exprimant Bsep et Ntcp de rat	88
3-	Transport vectoriel du taurocholate tritié	90
A-	Mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) et la perméabilité paracellulaire (au jaune de Lucifer) des clones MDCK	90
B-	Transport du taurocholate tritié.....	90
IV-	Analyses statistiques	92
Résultats		93
I-	Résumé de l'article : Aminoglycosides rescue some nonsense <i>ABCB11</i> mutations identified in PFIC2 patients	93
II-	Résumé de l'article : Chaperone therapy for missense <i>BSEP^{R1128C}</i> mutation responsible for progressive familial intrahepatic cholestasis type 2	95
III-	Article: Aminoglycosides rescue some nonsense <i>ABCB11</i> mutations identified in PFIC2 patients	97
IV-	Article: Chaperone therapy for missense <i>BSEP^{R1128C}</i> mutation responsible for progressive familial intrahepatic cholestasis type 2	134
V-	Résultats complémentaires	160
1-	Caractérisation des mutants faux sens Bsep ^{R1090C} et Bsep ^{R1090W}	160
A-	Localisation et quantification de l'adressage aux canalicules: les mutants faux sens Bsep ^{R1090C} et Bsep ^{R1090W} sont correctement adressés.....	160
B-	Analyse fonctionnelle : les mutants Bsep ^{R1090C} et Bsep ^{R1090W} ne sont pas fonctionnels	162
2-	Validation, <i>in vitro</i> , sur le plan fonctionnel des données précédemment publiées .	164
3-	Identification de nouvelles molécules avec un potentiel effet chaperon	168
Discussion		170
Conclusion générale et perspectives		187

Liste des abréviations

4-PB: 4-Phénylbutyrate

AB: acide biliaire

ABC : ATP-binding cassette

AC: Acide cholique

ADNc: Acide desoxyribonucléique complémentaire

AMPC: Adénosine monophosphate cyclique

AP-2: Adaptator protein 2

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ARNt : ARN de transfert

BSEP: Bile salt export pump

Ca²⁺ : Calcium

CAR: Constitutive androstane receptor

CB: Canalicule biliaire

CDCA : Acide chénodéoxycholique

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CSP : Codon-stop prématuré

CYP27: Stérol 27-hydroxylase

CYP7A: Cholestérol 7 α -hydroxylase

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

ERAD: Endoplasmic reticulum associated degradation

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes

FIC1: Familial intrahepatic cholestasis 1

FXR: Farnesoid X Receptor

GFP: Green fluorescent protein

GPB: Glycerolphenylbutyrate

HAX-1: HS1-associated protein X-1

HEK293: Human embryonic kidney 293

HMPB: Hydroxy-methyl phenylbutyrate

HNF4: Hepatocyte nuclear factor 4

ICP: Intrahepatic cholestasis of pregnancy

LPAC: Low phospholipid associated cholelithiasis
LRH-1: Liver receptor homologue-1
MDCK: Madin-darby canine kidney
MDR: Multi-drug resistance
MHMPB: Methyl-hydroxy-methyl phenylbutyrate
Myo5b: Myosine 5b
NBD: Nucleotid binding domain
NMD: Nonsense mediated mRNA decay
NTCP: Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptide
OATP: Organic anion transporting olypeptides
OTNC: Oxo-tetrahydro-naphthalene-carboxylate
PA: Phenylacetate
PABP: Poly(A)-binding protein
PBS: Phosphate buffer saline
PC: Phosphatidylcholine
PE: Phosphatidyléthanoline
P-gP: P-glycoprotein
PFIC: cholestase intrahépatique familiale progressive
PP2B: Protéine phosphatase 2B
PS: Phosphatidylsérine
PXR: Pregnane x receptor
Rab11a: Ras-related protein Rab-11A
RAR: Retinoic acid receptor
RE: Réticulum endoplasmique
RXR: Retinoic x receptor
SAHA: Acide suberoylanilide hydroxamique
SERCA: Sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
SHP: Small heterodimer partner
SLC: Solute carriers
TMD: Transmembrane domain
UDCA: Acide ursodésoxycholique
WT: Wild type
γ -GT: Gamma glutamyl transferase

Index des figures et tableaux

Figure 1: Schématisation du lobule hépatique	2
Figure 2: Composition de la bile. Répartition des produits organiques non aqueux	5
Figure 3: Voies de biosynthèse des acides biliaires	7
Figure 4: Le cycle entérohépatique des acides biliaires	9
Figure 5: Mécanisme de rétrocontrôle et d'inhibition de la synthèse des acides biliaires	11
Figure 6: Systèmes de transport hépatobiliaire dans le foie et les tissus extrahépatiques	12
Figure 7 : Mécanisme de la sécrétion de la phosphatidylcholine dans la bile	25
Figure 8 : Régulation de l'expression de MRP2 par les récepteurs nucléaires	27
Figure 9 : Rôle de l'asymétrie lipidique au niveau de la membrane canaliculaire	28
Figure 10 : Structure prédictive de quelques membres de la superfamille des transporteurs ABC	31
Figure 11 : Modèle topologique prédictif de la protéine BSEP	32
Figure 12 : Régulation transcriptionnelle d' <i>ABCB11</i>	34
Figure 13 : Modèle de biosynthèse d' <i>ABCC7/CFTR</i>	36
Figure 14 : Les partenaires du trafic régulant le recyclage endosomal de BSEP dans l'hépatocyte	41
Figure 15 : Étiologie des cholestases intrahépatiques et extrahépatiques	45
Figure 16 : Cholestases intrahépatiques familiales progressives (PFIC) : Types, gènes impliqués et défauts de transports	48
Figure 17 : Histopathologie de la PFIC2.....	49
Figure 18 : Illustration 2D et 3D des variants d' <i>ABCB11</i> identifiés.....	51
Figure 19 : La survie avec un foie natif est associée avec la sévérité de la mutation	53
Figure 20 : La pharmacothérapie ciblée de la PFIC2.....	57
Figure 21 : Terminaison de la traduction et processus de la translecture du CSP	60
Figure 22 : Les facteurs modulant la fidélité de la terminaison de la traduction	61
Figure 23 : Inhibition de la voie NMD.....	62
Figure 24 : Structure de la Généticine, gentamicine et du PTC124.....	65

Tableau 1 : Composition de la bile hépatique versus la bile dans la vésicule biliaire	4
Tableau 2 : Nomenclature, localisation et fonction des principaux transporteurs membranaires hépatobiliaires dans le foie et les tissus extrahépatiques.....	14
Tableau 3: Synthèse des molécules qui peuvent être utilisées en pharmacothérapie ciblée de la PFIC2	73
Tableau 4 : Classification des mutations d' <i>ABCB11</i> associées à une PFIC2.....	190

Introduction bibliographique

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée au transporteur d'acides biliaires BSEP (*bile salt export pump*) dans le foie. Les mutations de cette protéine sont responsables de cholestases génétiques. J'aborderai dans l'introduction la physiologie de la sécrétion biliaire avec les différents transporteurs impliqués, puis, je me focaliserai sur le transporteur *ABCB11/BSEP*, les pathologies qui y sont associées et enfin, les stratégies thérapeutiques (pharmacothérapies ciblées) développées pour restaurer l'expression et l'activité de ce transporteur.

I- Généralités sur le foie

Le foie est l'un des organes le plus volumineux de l'organisme. Il pèse entre 1,4 et 1,6 kg chez l'Homme adulte. Il est constitué de deux lobes : le lobe droit (deux tiers du volume total) et le lobe gauche (un tiers). Le foie possède la particularité d'être irrigué via la veine porte drainant le tube digestif (circulation des nutriments vers le foie) et les veines sus-hépatiques qui ramènent le sang épuré des substances toxiques au cœur. Doté de diverses fonctions, il a un rôle majeur dans la production/sécrétion de la bile. Celle-ci est stockée dans la vésicule biliaire puis déversée après chaque repas dans le tube digestif afin d'éliminer les graisses. Le foie est le siège de nombreuses voies métaboliques telles que le métabolisme glucidique, protéique et lipidique et il a un rôle dans le stockage du glucose sous forme de glycogène (maintenir le taux de glycémie) et des vitamines. La plupart des protéines sanguines sont synthétisées dans cet organe notamment les globines, l'albumine et les facteurs de la coagulation. Il élimine les déchets azotés en synthétisant l'urée. Le foie a, également, un rôle dans la détoxification : dégradation des substances toxiques qui arrivent au foie en substances non toxiques.

Le parenchyme hépatique est constitué de plusieurs types cellulaires qui lui permettent d'assurer ses fonctions : les hépatocytes : unité fonctionnelle du foie (représentent 80% du volume hépatique), les cellules endothéliales (bordent les capillaires sinusoidaux), les cellules épithéliales biliaires : les cholangiocytes (qui bordent les canaux biliaires intrahépatiques), les cellules de Küpffer (macrophages résiduels du foie), les myofibroblastes (impliqués dans les processus de fibrose hépatique) et les cellules étoilées (métabolisme de la vitamine A et synthèse de nombreuses molécules de la matrice extracellulaire). Les hépatocytes sont des cellules épithéliales polygonales organisées en travée, formant des unités morphologiques fonctionnelles appelées lobules hépatiques (Figure 1). Ces cellules sont hautement polarisées avec un pôle basal du côté sinusoidal et un pôle apical du côté canaliculaire. Le canalicule biliaire (lumière biliaire) est très petit ($\sim 1 \mu\text{m}$) et se forme entre deux ou plusieurs hépatocytes adjacents dont les membranes apicales adjacentes sont scellées par des jonctions serrées (par exemple : zonula occludens, ZO-1). C'est la seule barrière physique entre le sang et le canalicule, ce qui détermine la « perméabilité paracellulaire » entre le sang et la bile (1).

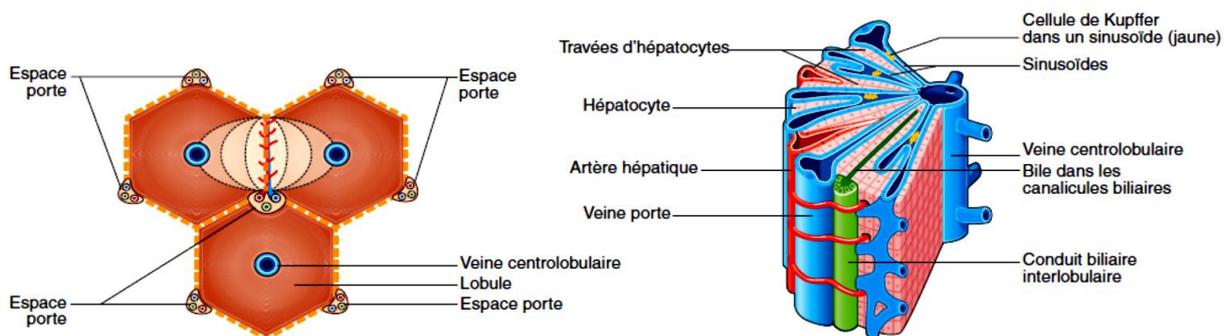


Figure 1: Schématisation du lobule hépatique

Les lobules hépatiques sont centrés autour d'une veine centrolobulaire. Entre les espaces portes et la veine centrolobulaire, les travées d'hépatocytes sont séparées par des sinusoides (2).

II- Rôle physiologique de la sécrétion biliaire

La sécrétion biliaire est une fonction physiologique majeure ATP-dépendante spécifique du foie. Elle met en jeu différents transporteurs, localisés sur le pôle apical ou canaliculaire de l'hépatocyte assurant la sécrétion des principaux composants de la bile. Cette dernière est élaborée et sécrétée de manière conjointe par les hépatocytes et les cholangiocytes (cellules épithéliales biliaires). Au niveau digestif, la bile est nécessaire à la digestion des graisses et des vitamines liposolubles grâce à l'action détergente des sels biliaires présents dans la bile. Amphiphiles avec un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile, les sels biliaires permettent d'émulsionner les lipides alimentaires pour être ensuite dégradés par les lipases intestinales et pancréatiques avant d'être absorbés par la muqueuse intestinale (3). La bile est la principale voie excrétrice pour les substances lipophiles exogènes potentiellement nocives ainsi que d'autres substrats endogènes tels que la bilirubine, le cholestérol et les sels biliaires dont les poids moléculaires sont compris entre 300 et 500 Da et ne sont pas facilement filtrés ni excrétés par les reins. En effet, le flux biliaire permet le passage de ces xénobiotiques (métabolites des médicaments) et endobiotiques potentiellement toxiques dans les selles. La bile protège l'organisme des infections entériques en sécrétant l'immunoglobuline A, les cytokines inflammatoires et en stimulant le système immunitaire inné de l'intestin.

L'importance de la sécrétion de la bile pour la santé de l'organisme est mise en évidence lorsque cette fonction est altérée par des maladies cholestatiques génétiques ou acquises. C'est ce qui a été observé chez des enfants nés avec une atrésie des voies biliaires qui développent des lésions hépatiques progressives, une cirrhose biliaire et, à terme, une insuffisance hépatique et le décès (1).

III- Composition de la bile

La bile est une sécrétion aqueuse complexe provenant d'hépatocytes avec un domaine sécrétoire qui représente 10 à 15% de la surface cellulaire. Ensuite, elle est modifiée de manière distale par des systèmes de transport absorbant et sécrétoire dans l'épithélium des voies biliaires. La bile entre alors dans la vésicule biliaire où elle est concentrée (~10 fois) (Tableau 1) puis livrée directement dans la lumière intestinale.

Tableau 1 : Composition de la bile hépatique versus la bile dans la vésicule biliaire

Adapté d'après (Farina, 2009) (4).

Composition	Bile hépatique	Bile vésiculaire
Eau	11 mg/mL	60 mg/mL
Sels biliaires	0,4 mg/mL	3 mg/mL
Bilirubine	1 mg/mL	9 mg/mL
Cholestérol	1,2 mg/mL	12 mg/mL
Acides gras	0,4 mg/mL	3 mg/mL
Lécithine	145 Mm	130 mM
Sodium	2,5 Mm	12 mM
Potassium	5 mM	12 mM
Calcium	100 Mm	25 mM
Bicarbonates	28 mM	10 mM

La bile se compose d'environ 85% d'eau dans laquelle sont dissouts un certain nombre de constituants endogènes solides y compris les acides biliaires (ABs) (11.5%), les phospholipides (3%), le cholestérol (0.5%) et d'autres composants (1%) comme les anions anorganiques, les peptides, et les pigments biliaires dont le principal est la bilirubine (5) (Figure 2).

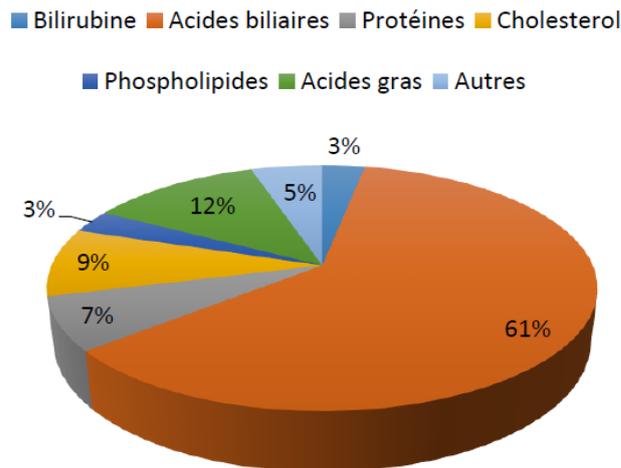


Figure 2: Composition de la bile et répartition des produits organiques non aqueux

La production quotidienne de bile représente un volume d'environ 750 mL/jour et environ 75% se forment au niveau du canalicule biliaire chez l'adulte. Chez l'homme, environ 50% de la bile canaliculaire dépend des sels biliaires (sécrétion hépatocytaire dépendante des ABs), tandis qu'une fraction variable (environ 25%) de la production totale quotidienne de la bile provient des canaux biliaires (sécrétion cholangiocytaire) en réponse à la libération de la sécrétine induite par les repas. La bile humaine est riche en lipides. La concentration en phospholipides varie de 25 à 810 mg/100 mL et celle du cholestérol de 60 à 320 mg/100 mL avec un ratio phospholipides/ABs de 0,3 et cholestérol/ABs de 0,07. Le passage de la bile dans le canal biliaire implique diverses modifications. Les cholangiocytes participent à la fluidification et à l'alcalinisation de la bile en sécrétant de l'eau, du chlore et des bicarbonates (4).

IV- La synthèse et la conjugaison des acides biliaries

Les ABs sont des stéroïdes endogènes synthétisés à partir du cholestérol par les hépatocytes au niveau du cytosol, du réticulum endoplasmique, des mitochondries et des peroxysomes. La synthèse et la sécrétion d'ABs constituent la principale voie du catabolisme du cholestérol chez les mammifères. La synthèse fournit un moyen direct de convertir le cholestérol, qui est à la fois hydrophobe et insoluble, en une molécule (AB) soluble dans l'eau et facilement excrétée. Un foie adulte normal produit environ 500 mg d'AB/jour (6). Les étapes de biosynthèse qui accomplissent cette transformation confèrent également des propriétés détergentes à l'AB, qui

sont exploitées par l'organisme pour faciliter la sécrétion de cholestérol par le foie. La synthèse d'ABs nécessite 17 enzymes. Deux voies de biosynthèse ont été décrites : la voie classique dite neutre (la fonction carboxylique en fin de chaîne aliphatique propre aux ABs n'apparaît que dans les étapes finales de la synthèse) dont l'enzyme clé est la cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) et la voie alternative dite acide (car l'oxydation de la chaîne latérale du cholestérol précède les biotransformations du noyau stéroïde et produit des intermédiaires acides) dont l'enzyme clé est la stérol 27-hydroxylase (CYP27A1) (7) (Figure 3).

Les seuls ABs primaires à être synthétisés par le foie sont l'acide cholique (CA) et l'acide chénodéoxycholique (CDCA). Ils représentent 80% des sels biliaires de la bile. Chez la souris, le CDCA est hydroxylé en acide α -muricholique et en acides 6 β -muricholiques, qui constituent ses deux ABs primaires majeurs. Chez l'homme et la souris, le CDCA peut être épimérisé et former l'acide ursodéoxycholique (UDCA) qui est hautement soluble et qui ne représente que 1 à 4% des ABs (8). Chez l'homme, la plupart des ABs sont conjugués à des acides aminés *via* le groupe carboxyle (amidation) avec un rapport de glycine *versus* la taurine d'environ 3 à 1 (8, 9) tandis que chez la souris, la plupart des ABs (> 95%) sont conjugués à la taurine. La conjugaison des ABs augmente l'ionisation et la solubilité au pH physiologique, empêche la précipitation du calcium (Ca²⁺), réduit l'absorption passive et résiste au clivage par les carboxypeptidases pancréatiques. Dans l'intestin distal, le CA et le CDCA conjugués sont d'abord déconjugués, puis la 7 α -déshydroxylase bactérienne convertit le CA et le CDCA en acide désoxycholique (DCA) et en acide lithocholique (LCA), respectivement. Le DCA et le LCA sont les ABs secondaires (ABs endommagés). La plupart des LCA sont excrétés dans les matières fécales et de petites quantités de LCA sont distribuées dans le foie et rapidement conjuguées (sulfatation) et excrétées dans la bile. La sulfatation est la principale voie de détoxification des ABs hydrophobes chez l'homme (10).

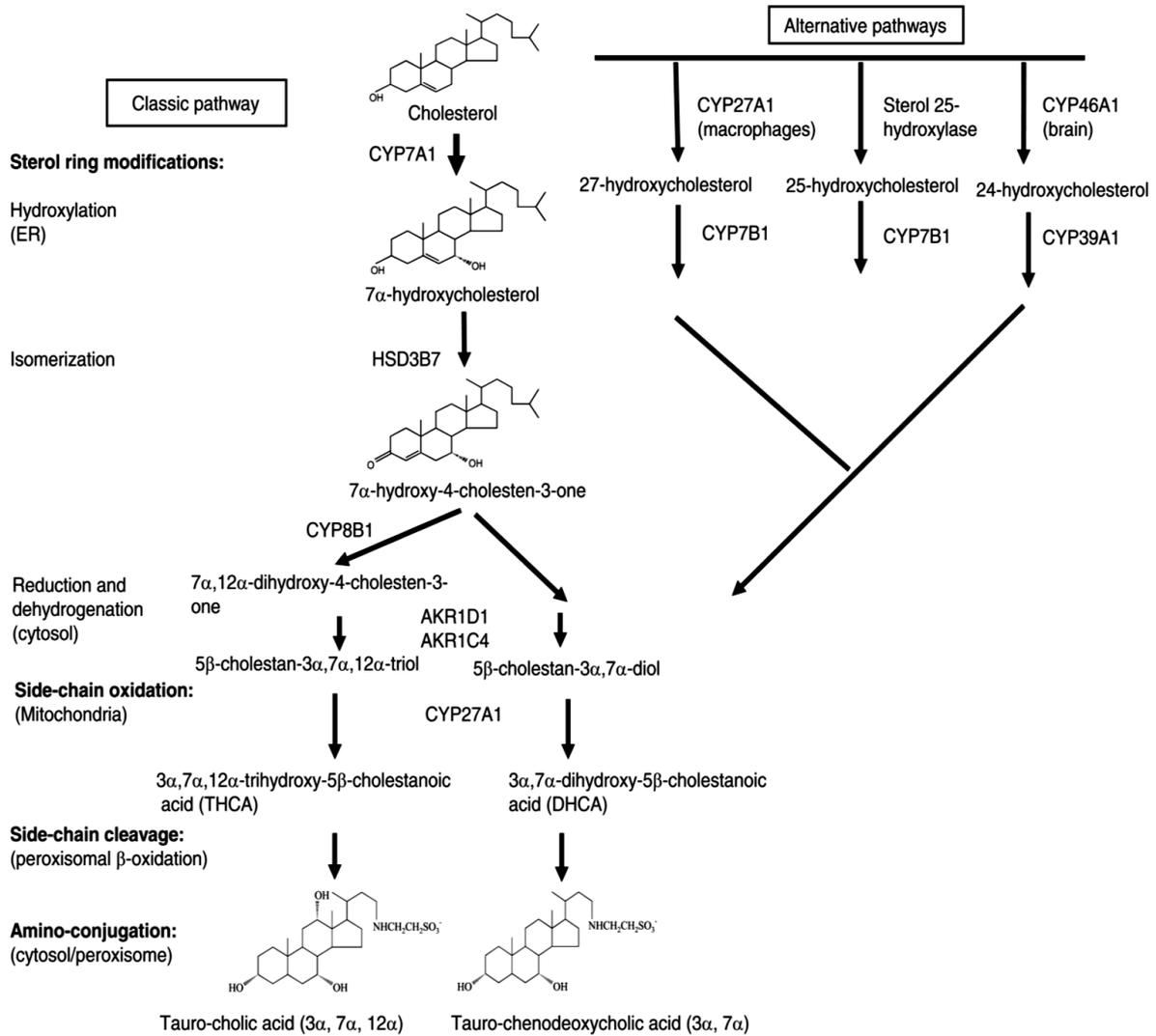


Figure 3: Voies de biosynthèse des acides biliaires

La voie neutre (ou classique) est initiée par le cholestérol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) située dans le réticulum endoplasmique du foie, tandis que la voie acide (ou alternative) est initiée par la stérol mitochondrial 27-hydroxylase (CYP27A1). Après plusieurs modifications faisant intervenir différentes enzymes, deux ABs primaires sont synthétisés : l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique. Ces deux ABs primaires sont ensuite glyco- ou tauro-conjugués pour devenir du glycocholate, du taurocholate, du glycochénodésoxycholate ou du taurochénodésoxycholate. ER: réticulum endoplasmique (9).

V- Cycle entérohépatique

Les acides biliaires synthétisés par le foie sont soumis à un cycle entérohépatique (Figure 4) qui permet la conservation de 95% du pool des ABs en conditions physiologiques. Ce cycle entérohépatique implique la réabsorption intestinale, le transport dans le sang portal, le captage par le foie, le transport intrahépatocyttaire, la sécrétion biliaire et l'excrétion dans la lumière intestinale des ABs. Certains ABs sécrétés dans les voies biliaires sont réabsorbés dans les cholangiocytes et recyclés dans les hépatocytes : c'est le shunt cholangio-hépatique (11). Les ABs sont stockés et concentrés dans la vésicule biliaire. Après chaque repas, la cholécystokinine sécrétée par l'intestin stimule la contraction de la vésicule biliaire pour vider les ABs dans le tractus intestinal. Lors du passage dans le tractus intestinal, de petites quantités d'ABs non conjugués sont réabsorbés dans le haut de l'intestin par diffusion passive. La plupart des ABs (95%) sont réabsorbés dans la membrane de la bordure en brosse de l'iléon terminal, diffusent à travers la membrane basolatérale des entérocytes, puis sont sécrétés dans la circulation sanguine porte vers les sinusoides hépatiques et sont recaptés dans les hépatocytes. Par exemple, le DCA est réabsorbé dans le côlon et recyclé avec le CA et le CDCA dans le foie. Un pool d'ABs d'environ 3 g, composé d'environ 40% de CA, 40% de CDCA, 20% de DCA et de traces de LCA, est recyclé 4 à 12 fois par jour. Les ABs perdus dans les matières fécales (environ 0,5 g/jour) sont reconstitués par synthèse de novo dans le foie afin de maintenir un pool d'ABs constant.

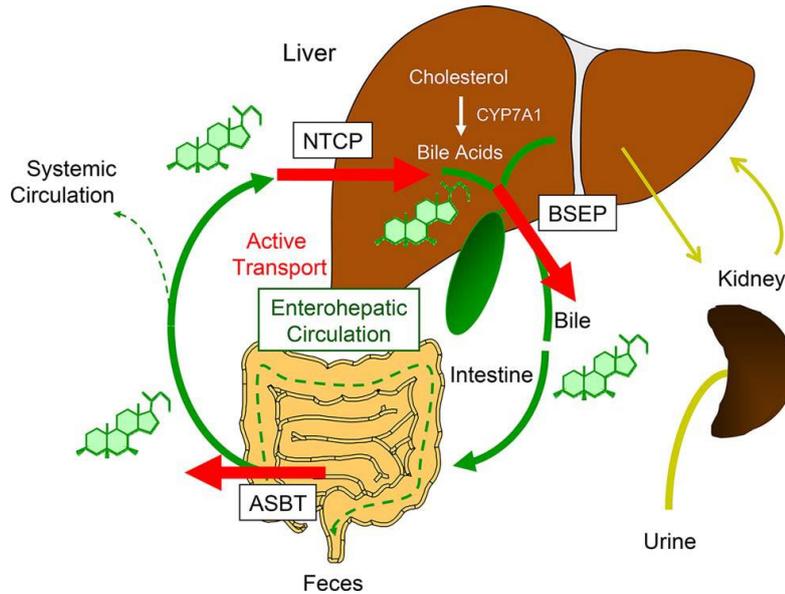


Figure 4: Le cycle entérohépatique des acides biliaries

Après la synthèse hépatique et la sécrétion biliaire, les ABs rentrent dans le cycle entérohépatique. BSEP est le principal transporteur canaliculaire des ABs dans le foie. Dans l'iléon, les ABs sont réabsorbés par le transporteur apical sodium-dépendent bile acid transporter (ASBT/*SLC10A2*). Les ABs diffusent à travers les entérocytes et transitent dans le foie à travers le sang portal où ils seront captés et absorbés par le transporteur basolatéral couplé au sodium NTCP/*SLC10A1* dans les hépatocytes (12).

VI- La régulation de la synthèse des acides biliaries

Les ABs remplissent diverses fonctions dans l'organisme. Pour cela, leur synthèse est soumise à une régulation très fine pour assurer un apport constant en ABs dans l'organisme. Cette régulation est importante pour maintenir des taux faibles en AB dans le foie et la circulation sanguine afin de protéger les hépatocytes des dommages provoqués par un excès de sels biliaries. Ainsi, les mutations héréditaires qui altèrent la synthèse des ABs provoquent un spectre de maladies humaines. Cela va de l'insuffisance hépatique dans la petite enfance à la neuropathie progressive chez l'adulte.

Les ABs constituent le premier niveau de régulation de leur propre biosynthèse et de leur transport en exerçant un rétrocontrôle négatif, au cours du cycle entérohépatique. Cela nécessite une interaction avec le récepteur nucléaire *Farnesoid X Receptor* (FXR) qui est exprimé dans le foie, les reins et l'intestin. FXR est le senseur d'ABs qui joue un rôle essentiel dans le maintien de leur homéostasie. Le deuxième niveau de régulation intervient dans leur processus de synthèse. La première étape de synthèse des ABs par la voie classique/neutre fait intervenir l'enzyme CYP7A1 qui catalyse la réaction d'hydroxylation du cholestérol dans le foie. Cette étape constitue l'étape limitante pour la synthèse. L'activité de cette enzyme est elle-même inhibée par les ABs (13). La régulation de la CYP7A1 passe par un mécanisme transcriptionnel impliquant aussi le récepteur nucléaire FXR. Dans le foie, les ABs activent FXR en se fixant dessus. Il s'agit principalement du CDCA qui a une très grande affinité pour ce récepteur suivi de LCA, DCA, et le CA, tandis que les ABs hydrophiles tels que l'UDCA et le MCA ne l'activent pas. FXR activé va induire l'activation d'un autre récepteur nucléaire appelé *Small Heterodimer partner* (SHP) qui va, à son tour, se fixer et inhiber le récepteur nucléaire *Liver receptor homologue-1* (LRH-1) et *Hepatocyte nuclear factor 4* (HNF4) responsables de l'expression des gènes CYP7A1 et CYP8B1 (impliqués dans la synthèse du CA) en se liant à leurs promoteurs (14) (Figure 5).

Dans l'intestin, les ABs activent le FXR pour induire la production du facteur de croissance des fibroblastes (FGF), qui est sécrété dans la circulation portale afin d'activer le récepteur du complexe hépatique FGFR4/ β -Klotho. Ceci conduit ensuite à l'activation des voies JNK et ERK1/2 MAPK qui vont inhiber la transcription des gènes CYP7A1 et CYP8B1 (15).

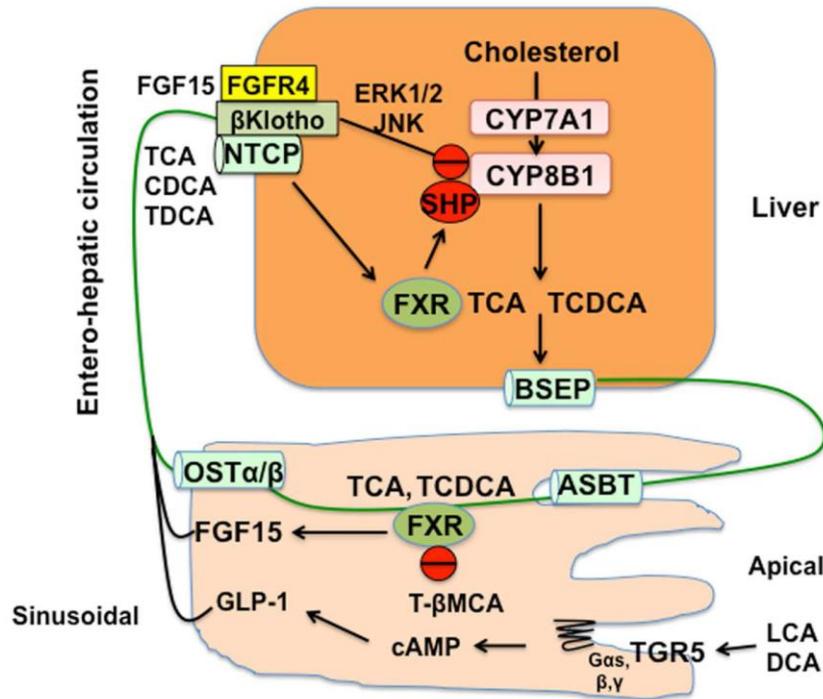


Figure 5: Mécanisme de rétrocontrôle et d'inhibition de la synthèse des acides biliaries

Dans le foie, FXR induit l'expression de SHP (inhibiteur de la transcription des gènes CYP7A1 and CYP8B1). Les ABs sont sécrétés dans l'hépatocyte via BSEP. Dans l'intestin, FXR activé par les ABs, stimule la production de FGF, qui en se fixant sur son récepteur FGFR4, forme un complexe avec β -Klotho, qui inhibe la transcription du gène CYP7A1 par les voies JNK, ERK1/2 et MAPK. Les ABs secondaires produits dans le côlon, le LCA et le DCA, activent TGR5 intestinal via la voie de signalisation de l'AMPC. Celle-ci va stimuler la sécrétion du glucagon-like-1 peptide (GLP-1) à partir de cellules L entéroendocrines (16).

VII- Transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire

Les sels biliaries sont concentrés dans la bile par des systèmes de transport actif (Figure 6, Tableau 2). L'absorption hépatique des constituants biliaries et de leurs précurseurs est initiée au niveau de la membrane basolatérale, qui est en contact direct avec le plasma sanguin de la veine porte *via* les cellules endothéliales sinusoidales et dans l'espace de Disse. Après absorption dans les hépatocytes, les sels biliaries et d'autres choléphilés atteignent le pôle

canaliculaire par diffusion, soit dans le cytoplasme aqueux, soit dans les membranes lipidiques intracellulaires, en fonction de leur hydrophobicité.

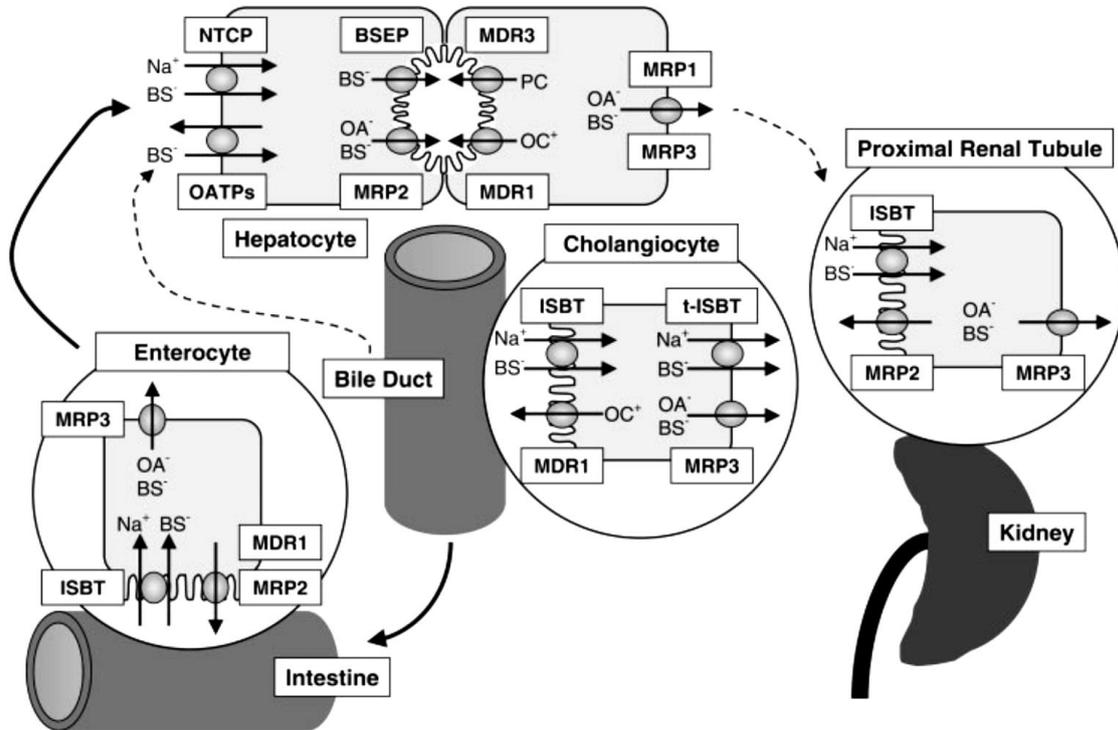


Figure 6: Systèmes de transport hépatobiliaire dans le foie et les tissus extrahépatiques

Les sels biliaires (SB) sont absorbés par les hépatocytes via NTCP et OATP. Les SB monovalents sont excrétés par BSEP au niveau du canalicule tandis que les SB divalents et les anions conjugués (OA) sont excrétés par la pompe canaliculaire d'exportation MRP2. Les phosphatidylcholines (PC) sont excrétées par MDR3. La PC forme des micelles mixtes dans la bile avec les SB et le cholestérol. Les médicaments cationiques (CO) sont excrétés par la pompe MDR1. MRP1 et MRP3 (isoformes basolatéraux de MDR1) constituent une voie alternative pour l'élimination des SB non conjugués des hépatocytes dans la circulation systémique. Les SB sont réabsorbés dans l'iléon terminal par l'intermédiaire du transporteur iléal de sels biliaires dépendant du Na^+ (ISBT) et efflués par MRP3. MRP2 est également présent dans la membrane apicale des entérocytes et des tubules rénaux proximaux, tandis que MDR1 est également présent dans les voies biliaires et l'intestin (17).

La membrane canaliculaire représente le pôle excréteur de l'hépatocyte et forme la frontière du canalicule biliaire. L'excrétion canaliculaire des constituants biliaries représente l'étape limitante de la sécrétion biliaire puisque les constituants biliaries sont excrétés contre un gradient élevé de concentration d'ABs dans la bile. Les membranes basolatérales et canaliculaires diffèrent par leurs compositions biochimiques et leurs caractéristiques fonctionnelles. Elles sont séparées par des jonctions serrées qui obturent les canalicules biliaries et forment ainsi la seule barrière anatomique maintenant les gradients de concentration entre le sang et la bile (18).

Tableau 2 : Nomenclature, localisation et fonction des principaux transporteurs membranaires hépatobiliaires dans le foie et les tissus extrahépatiques

Adapté d'après (Trauner, 2003) (17).

Nom	Abréviation (Nom du gène)	Fonction
Sodium-taurocholate cotransporting polypeptide	NTCP (<i>SLC10A1</i>)	Membrane canaliculaire des hépatocytes Transporteur primaire pour l'absorption de SB conjugués dépendants du sodium à partir du sang portal
Organic anion transporting proteins	OATPs (<i>SLC21A</i>)	Transporteurs multi spécifiques d'anions organiques pour la captation de SB indépendants du sodium et un large éventail d'autres anions et cations
Multidrug resistance-Associated protein 3	MRP3 (<i>ABCC3</i>)	Membrane canaliculaire des hépatocytes Transporteur multi spécifique des solutés organiques, faiblement exprimé dans le foie normal mais surexprimé sur la membrane basolatérale des hépatocytes de la cholestase ; capable d'extraire les SB conjugués du foie
Multidrug resistance-1 P-glycoprotein *	MDR1 (<i>ABCB1</i>)	Sécrétion dépendante de l'ATP de divers cations organiques, de xénobiotiques et de cytotoxines dans la bile
Multidrug resistance-3 P-glycoprotein (phospholipid transporter) *	MDR3 (<i>ABCB4</i>)	Translocation ATP-dépendante des phosphatidylcholines du feuillet interne au feuillet externe de la bicouche membranaire ; la pompe d'exportation de phospholipides
Multidrug resistance-associated protein-2 *	MRP2 (<i>ABCC2</i>)	Transport multi spécifique d'anions organiques dépendant de l'ATP (la bilirubine diglucuronide, sulfates, glutathion conjugué) dans la bile ; déterminant majeur du flux biliaire indépendant de SB par transport de GSH
Canalicular bile salt-export pump*/(sister of P-glycoprotein	BSEP (SPGP) (<i>ABCB11</i>)	Transporteur majeur de SB dépendant de l'ATP dans la bile ; stimule le flux biliaire dépendant des SB
Familial intrahepatic cholestasis-1	FIC1 (<i>ATP8B1</i>)	ATPase responsable de la translocation des aminophospholipides
Chloride bicarbonate anion exchanger isoform-2	AE2 (<i>SLC4A2</i>)	Chargeur acide. Sécrète du bicarbonate dans la bile et stimule le flux biliaire indépendant des SB

Nom	Abréviation (Nom du gène)	Fonction
		Cholangiocytes
Ileal (apical) sodium-dependent bile salt transporter	ISBT (ABST) (<i>SLC10A2</i>)	Localisé sur la membrane luminale ; élimine les SB de la bile et facilite l'élimination des SB lors de la cholestase ; identique au transporteur iléal.
Cystic fibrosis transmembrane regulator	CFTR (<i>ABCC7</i>)	Canal de chlorure sur la membrane luminale ; facilite l'entrée du chlorure dans la bile pour l'échange avec les anions HCO ₃ ⁻
Chloride-bicarbonate anion exchanger isoform 2	AE2 (<i>SLC4A2</i>)	Localisé sur la membrane luminale ; facilite la sécrétion de bicarbonates dans la bile et contribue au flux biliaire indépendamment des SB
Multidrug resistance-associated protein 3*	MRP3 (<i>ABCC3</i>)	Exprimé sur la membrane basolatérale
		Intestin
Ileal sodium dependent Bile salt transporter	ISBT (ABST) (<i>SLC10A2</i>)	Transporteur primaire dépendant du sodium impliqué dans l'absorption de SB dans l'iléon ; déterminant critique de la circulation entérohépatique des SB
Multidrug resistance-associated protein 3*	MRP3 (<i>ABCC3</i>)	Exprimé sur la membrane basolatérale de l'éon et du côlon ; peut-être le transporteur majeur responsable du retour des SB dans la circulation portale
		Rein
Ileal sodium dependent bile salt transporter	ISBT (ABST) (<i>SLC10A2</i>)	Localisé sur la membrane luminale du tubule proximal ; extrait les SB du filtrat glomérulaire ; régulé négativement lors de la cholestase pour faciliter la sécrétion des SB dans l'urine ; identique au transporteur iléal
Multidrug-resistance-associated protein 2*	MRP2 (<i>ABCC2</i>)	Localisé sur la membrane luminale du tube proximal, transporteur ATP-dépendant d'anions organiques conjugués (sulfates, glucuronides et glutathion) dans l'urine

SB, sels biliaires ; GSH, glutathion réduit ; * Transporteurs membres de la famille des ABC

1- Transporteurs sinusoidaux

La captation hépatique des ABs s'effectue au niveau de la membrane sinusoidale contre un gradient électrochimique par des mécanismes dépendant et indépendant du sodium (Na^+). La captation dépendante du Na^+ est réalisée par le transporteur *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide* (NCTP), en revanche, ce sont les membres de la famille des OATP (*Organic anion transporting polypeptides*) tels que OATP1A2 et OATP1B1 qui sont responsables du transport indépendant du Na^+ . Le NTCP et les OATPs font partie de la famille des *Solute carriers* (SLC) et permettent l'entrée des ABs dans l'hépatocyte par diffusion facilitée ou transport actif secondaire. Il existe aussi des transporteurs non spécifiques à la membrane basolatérale des hépatocytes et des entérocytes permettant le passage des ABs et des stéroïdes. Il s'agit des *Organic solute transporters* ($\text{OST}\alpha/\beta$) qui font aussi partie de la famille des SLC.

A- Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP)

Le transporteur NTCP est codé par le gène SLC10A situé sur le chromosome 14q24. C'est une glycoprotéine membranaire de 349 acides aminés (362 acides aminés chez le foie de rat) avec sept domaines transmembranaires, un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire. Sa masse moléculaire est de 51 kDa. Il représente le principal transporteur responsable de l'absorption hépatique des sels biliaires conjugués (comme le taurocholate) du sang sinusoidal vers l'hépatocyte. NTCP est un transporteur couplé au sodium et puise son énergie du gradient de sodium maintenu par la pompe à sodium dépendante de l'ATP, Na^+/K^+ ATPase. La pompe à sodium est également localisée dans la membrane basolatérale et est exprimée dans le lobule hépatique (19-21). La pompe à sodium établit deux forces motrices importantes pour les mécanismes de transport de l'absorption hépatique : d'une part, il y a un gradient chimique dirigé vers l'intérieur pour le Na^+ , où 3 ions

Na⁺ sont échangés contre 2 ions K⁺, ce qui entraîne des concentrations intracellulaires de ces cations d'environ 15 et 130 mEq/L, respectivement. D'autre part, il existe un gradient électrique intracellulaire négatif d'environ -35 à -40 mV (22). Les deux gradients chimiques et électriques produits par la pompe à sodium sont capables de déplacer les solutés dans l'hépatocyte contre leurs gradients de concentration, un processus connu sous le nom de transport actif secondaire.

L'inhibition de NTCP induit une augmentation du taux de sels biliaries dans le sérum, mais ces effets peuvent être variables. L'hépatocyte exprime aussi des transporteurs de sels biliaries qui sont sodium indépendant tels que les OATPs et qui peuvent partiellement compenser l'inhibition de NTCP. Cependant, ces inhibiteurs peuvent parfois inhiber les OATPs en plus de NTCP comme c'est le cas de la rifampicine chez le rat (23) et la cyclosporine chez l'homme (24). Cette inhibition augmente le taux de sels biliaries dans les hépatocytes et elle dépend de l'affinité de ces inhibiteurs pour ces transporteurs.

La régulation de la transcription de NTCP est indirectement dépendante de FXR. En effet, l'expression de Ntcp chez le rat est diminuée par des concentrations élevées d'ABs qui se fixent sur FXR. Or cette action de FXR est médiée par la stimulation de l'expression de SHP qui inhibe le dimère *Retinoic acid receptor/Retinoic X receptor* (RAR/RXR) fixé sur le promoteur de Ntcp, entraîne l'inhibition de la transcription de ce transporteur (25). De plus, NTCP est régulée au niveau post-traductionnel par la voie de signalisation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui stimule l'insertion à la membrane plasmique des vésicules contenant Ntcp. L'AMPC induit une augmentation du taux de calcium (Ca²⁺) intracellulaire nécessaire à l'activité de la protéine phosphatase 2B (PP2B). La PP2B déphosphoryle NTCP (26) maintenant sa rétention à la membrane plasmique et empêchant son élimination, ce qui conduit à une augmentation de son activité d'absorption d'ABs (27).

L'homologue iléal de NTCP est le transporteur apical des ABs sodium-dépendant (ASBT), connu aussi sous le nom de ISBT (*ileal sodium-dependent bile acid transporter*), codé par le

gène *SLC10A2*. ASBT est une protéine de 348 acides aminés responsable de l'absorption initiale des ABs à travers la membrane de la bordure en brosse des entérocytes. Les ABs sont ensuite, efficacement transférés à travers la cellule et exportés à travers la membrane basolatérale par l'hétéromère OST α -OST β . Le fonctionnement d'ASBT nécessite le cotransport de deux molécules de Na⁺ avec une molécule d'AB. Comme pour NTCP, la pompe Na⁺/K⁺-ATPase crée un gradient électrochimique nécessaire pour l'absorption des sels biliaires dans les entérocytes iléaux et les cellules du tubule proximal rénal (28). De manière similaire à NTCP, ASBT transporte préférentiellement les ABs tauro et glycoconjugués et avec une affinité plus importante comparés aux ABs non conjugués (29). À l'inverse de la localisation basolatérale de NTCP, ASBT est fortement exprimé à la membrane apicale des entérocytes de l'iléon terminal (30). Les mutations du gène *ASBT* humain engendrent une malabsorption primaire des ABs, une interruption de la circulation entérohépatique de ces derniers et une réduction du taux plasmatique de cholestérol (31).

B- Organic anion transporters polypeptides (OATPs)

Contrairement aux sels biliaires conjugués, les sels biliaires non conjugués sont absorbés au niveau de la membrane sinusoidale basolatérale des hépatocytes par des mécanismes indépendants du sodium : les OATPs. L'absorption des sels biliaires indépendants du sodium est quantitativement moins importante que l'absorption dépendante du sodium et semble être largement médiée par un échange facilité avec des anions intracellulaires (par exemple, glutathion (GSH), HCO⁻³) (32). Les OATPs appartiennent à la superfamille des gènes *SLCO* (anciennement *SLC21*) qui est subdivisée en 6 familles (OATP1-OATP6) et 13 sous familles. Ce sont de glycoprotéines de 643 à 724 acides aminés ayant un poids moléculaire de 80 kDa, organisés en 12 domaines transmembranaires (33). Les extrémités amino et carboxy terminales sont localisées toutes les deux en intracellulaire. Ces transporteurs transportent un large spectre de substrats : anions et cations organiques hydrophiles, bilirubine, certains

médicaments, substances xénobiotiques, stéroïdes et hormones thyroïdiennes. Leur distribution tissulaire s'étend au-delà du foie. En effet, les OATPs sont retrouvés dans le cerveau, les reins, les intestins et les testicules. Au pôle sinusoidal de l'hépatocyte humain, il existe quatre transporteurs OATP qui ont été caractérisés : OATP1A2 anciennement OATPA (symbole du gène *SLCO1A2*), OATP1B1 anciennement OATPC, OATP1B3, anciennement OATP8 et OATP2B1 anciennement OATPB. OATP1B1 et OATP1B3 sont spécifiques des hépatocytes et fonctionnellement les plus importants (34, 35). OATP1A2 est exprimé uniquement dans les cholangiocytes. Il semblerait qu'il soit impliqué dans la réabsorption des xénobiotiques excrétés dans la bile (36).

L'expression des OATPs est en grande partie contrôlée et régulée au niveau transcriptionnel. L'expression constitutive (transactivation) d'OATP1B1 dans les hépatocytes dépend de HNF1 α (37) tandis que l'OATP1B3 est régulée négativement par HNF3 β (38) et positivement par FXR qui se fixe sur son promoteur (39).

C- Organic solute transporter (OST α/β)

OST α et OST β sont codés par les gènes SLC51A et SLC51B situés sur différents chromosomes, et ne présentent aucune identité de séquence l'un avec l'autre (40). OST α possède sept domaines transmembranaires, tandis que OST β possède seulement un seul domaine transmembranaire. Une hétéromérisation des OST α et des OST β est nécessaire pour la formation d'un complexe fonctionnel stable à la membrane plasmique (41). OST α et OST β sont exprimés dans presque tous les tissus, mais ils sont plus abondants dans les tissus impliqués dans l'homéostasie des ABs et des stéroïdes (40). Les deux protéines OST sont localisées à la membrane basolatérale des cellules épithéliales, notamment les hépatocytes, les entérocytes, les cellules tubulaires rénales, et les cholangiocytes (42). Des études sur des cellules MDCK triplement transfectées avec l'OST α et l'OST β de souris ainsi que l'ASBT humain ont montré que l'OST α -OST β est capable de transporter une variété d'ABs conjugués à la taurine et à la

glycine (42, 43). Ces cellules exprimant les deux sous-unités OST induisent un transport important du taurocholate du pôle basolatéral au pôle apical et un transport faible dans l'autre sens (43). Il semblerait que les ABs conjugués à la taurine soient transportés plus efficacement que ceux conjugués à la glycine à travers la membrane basolatérale par OST α -OST β (42). En plus des sels biliaires, OST α -OST β transporte des stérols conjugués au sulfate ou à l'acide glucuronique, notamment la déhydroépiandrostérone sulfate et la prégnénone sulfate. Ces composés sont des substrats possédant une affinité élevée pour ces transporteurs (44).

Les deux sous-unités OST α -OST β sont fortement régulées par les sels biliaires via FXR. Deux éléments de réponse FXR ont été identifiés dans le promoteur de OST α et un dans OST β (45). Dans les conditions cholestatiques, OST α -OST β peut expulser les sels biliaires du foie dans la circulation systémique dans le cadre de la réponse adaptative à l'augmentation de la concentration de sels biliaires dans le foie (46).

D- Les autres transporteurs

Il s'agit des transporteurs d'efflux des ABs localisés dans la membrane basolatérale des hépatocytes. Ces transporteurs sont des pompes de type ABC (ATP-Binding Cassette) assurant le passage des ABs de l'hépatocyte vers la circulation systémique pour être, ensuite, éliminés dans les urines. Ceci se fait par un transport actif primaire. Ces transporteurs appartiennent à la famille des MRPs « multidrug resistance-associated protein » *ABCC* qui sont faiblement exprimés mais peuvent être induits dans les conditions cholestatiques. Chez l'humain, cette famille comporte dix membres : MRP1-10. MRP3 et 4 sont décrits brièvement ci-dessous.

a- Multidrug resistant associated protein 3 (MRP3)

MRP3 est une protéine de 1527 acides aminés, codée par le gène *ABCC3*, localisée à la fois, dans le pôle basolatéral de l'hépatocyte, la membrane du cholangiocyte, des entérocytes et la membrane des cellules rénales (47). MRP3 transporte une large gamme de substrats constitués principalement de solutés conjugués aux gluconates et au GSH (48). MRP3/Mrp3 excrète les sels biliaires conjugués au sulfate (taurolithocholate et taurochénodésoxycholate) qui sont deux métabolites des sels biliaires pouvant s'accumuler dans le foie en cas de maladies cholestatiques, ainsi qu'un certain nombre de médicaments (49).

b- Multidrug resistant associated protein 4 (MRP4)

MRP4 est une protéine de 1325 acides aminés, codée par le gène *ABCC4*. Le transporteur MRP4 est exprimé dans le foie, le cerveau, les reins, le colon, les poumons et le placenta. Il est localisé à la membrane basolatérale des hépatocytes et à la membrane apicale des cellules du tubule proximal rénal (50). Sa principale fonction est de pomper les anions organiques à travers les membranes biologiques contre un gradient de concentration. Parmi ses substrats endogènes, la plupart sont des molécules de signalisation (par exemple, les eicosanoïdes prostaglandine E2, leucotriène B4 et thromboxane 2) et des seconds messagers (les nucléotides cycliques AMPc et GMPc), ainsi que les ABs, les stéroïdes conjugués et l'acide folique (50, 51). MRP4 a également la capacité d'efflux d'une gamme d'agents thérapeutiques, en particulier des médicaments anticancéreux, tels que les thiopurines et le méthotrexate; les antiviraux à base de nucléosides, notamment le ganciclovir et le nelfinavir (50-52). Des études expérimentales ont montré que MRP4 était impliqué dans la résistance à l'agent anticancéreux topotécan, suggérant que les agents modulateurs du transport membranaire de MRP4 pourraient améliorer l'efficacité thérapeutique de médicaments qui sont des substrats de MRP4 (53). Comme MRP3, MRP4 est

surexprimé dans les cholestases (54-56). Il a été montré que la concentration des ABs dans le sérum est plus faible chez les souris MRP4^{-/-} comparée aux souris sauvages. Ceci est dû probablement à une altération de la sécrétion d'ABs de la membrane basolatérale des hépatocytes (57).

2- Transporteurs cytoplasmiques

Après la captation des ABs et d'autres substances anioniques hydrophiles dans l'hépatocyte, ceux-ci se lient aux protéines cytosoliques, telles que la 3 α -hydroxylstéroïde déshydrogénase (3 α -HSD), la GSH S-transférase et la protéine de liaison des acides gras du foie *Liver fatty acid binding protein* (L-FABP), puis ils diffusent rapidement vers la membrane canaliculaire pour y être sécrétés. La 3 α -HSD est la protéine cytosolique de liaison des sels biliaires la plus importante. En revanche, les substrats lipophiles peuvent s'associer aux membranes intracellulaires pour y être métabolisés avant excrétion, alors que les cations organiques peuvent être séquestrés dans les structures lysosomales chargées négativement retardant ainsi leur excrétion dans la bile (58). L'expression de HSD et de L-FABP est induite par les sels biliaires via FXR (59) et HNF1 régule leur expression (60).

3- Transporteurs canaliculaires

Les acides biliaires conjugués captés par le foie *via* la circulation entérohépatique se joignent aux acides biliaires nouvellement synthétisés pour atteindre la membrane canaliculaire, pour être ensuite, excrétés dans la bile. Le transport de ces ABs à travers la membrane canaliculaire constitue l'étape critique limitant la vitesse de la circulation entérohépatique. Il est le principal générateur de la circulation biliaire. La sécrétion d'ABs dans la bile se produit contre un gradient de concentration élevé (la concentration d'ABs dans la lumière canaliculaire

est 100 à 1000 fois plus élevée que celle retrouvée dans le cytoplasme) (17, 61). Plusieurs transporteurs canaliculaires appartiennent à la super famille des transporteurs ABC. Les principaux ABC transporteurs sont MDR1 (*ABCB1*) responsable de l'excrétion biliaire de xénobiotiques, BSEP (*ABCB11*) principal transporteur des ABs, MRP2 (*ABCC2*) responsable du transport de la bilirubine conjuguée et du GSH (principal déterminant de la fraction indépendante des ABs) et MDR3 (*ABCB4*) responsable du transport des phospholipides (la phosphatidylcholine, PC). Il existe aussi, d'autres transporteurs localisés dans la membrane canaliculaire des hépatocytes qui ne sont pas de type ABC tels que *Familial intrahepatic cholestasis 1* (*FIC1/ATP8B1*). C'est une ATPase responsable de la translocation de la phosphatidylsérine dans les deux feuillettes de la membrane plasmique.

A- Multidrug resistance protein 1 (MDR1)

MDR1 est le premier transporteur ABC humain à avoir été cloné. MDR1 a été appelée à l'origine *permease glycoprotein* (P-gP) car il confère une résistance aux médicaments en exportant entre autres des médicaments anticancéreux (vincristine, vinblastine) hors de la cellule (62). C'est une glycoprotéine transmembranaire de 1280 acides aminés, d'un poids moléculaire de 170 kDa chez l'homme (son homologue chez la souris : Mdr1 est de 150 kDa). Elle est exprimée au pôle apical des hépatocytes, des cellules épithéliales de la lumière intestinale, des cellules proximales rénales, des cholangiocytes et des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (63). Dans le foie, elle est impliquée dans l'excrétion biliaire de xénobiotiques. En effet, des études chez des souris knock-out *Mdr1^{-/-}* ont montré l'importance de ce transporteur dans l'excrétion biliaire de divers composants qui sont pour la plupart des cations organiques incluant des métabolites exogènes et endogènes, des médicaments et des toxines, des peptides hydrophobes des glycolipides et des hormones stéroïdiennes (64, 65). D'autres études sur les membranes canaliculaires de vésicules ont

montré que MDR1 peut transporter des sels biliaires avec une affinité 5 fois moindre comparée à BSEP (66).

B- Multidrug resistance protein 3 (MDR3/ Mdr2)

Contrairement à MDR1, MDR3 (Mdr2 chez la souris) ne confère pas de résistance aux médicaments malgré son homologie de séquence (77%). MDR3 est une floppase qui maintient les PC sur la face externe de la bicouche membranaire canaliculaire (67, 68). Cette fonction importante de MDR3 a été établie après avoir découvert que la suppression du gène codant Mdr2 chez la souris a entraîné l'absence de PC dans la bile malgré la capacité normale de transport biliaire des sels biliaires (69, 70). De ce fait, les phospholipides deviennent alors, disponibles pour l'excrétion dans la bile, et participent à la formation de micelles mixtes avec les sels biliaires et le cholestérol (71) protégeant ainsi les voies biliaires des effets délétères de la bile (Figure 7). En effet, il a été montré que la translocation de la PC vers le feuillet externe des vésicules de la membrane canaliculaire des hépatocytes de rat augmentait en présence du taurocholate (TC), un AB capable de former des micelles et que ce processus était ATP dépendant (72).

MRD3 est une protéine glycosylée de 1279 acides aminés et son poids moléculaire est de 170 kDa chez l'homme (Mdr2 est à 150 kDa chez la souris et le rat). Les ABs, en particulier le taurocholate et le taurodéoxycholate induisent une augmentation transcriptionnelle d'*ABCB4* via FXR et LXR. À l'inverse, *ABCB4* est diminué par le cholestérol (73, 74). Les mutations du gène *ABCB4* sont associées à plusieurs maladies ou syndromes. Les mutations homozygotes de MDR3 sont responsables de la cholestase familiale intrahépatique progressive de type 3 (PFIC3) (75, 76) alors que les mutations hétérozygotes prédisposent les femmes lors de la grossesse à une cholestase gravidique (ICP) (77) et d'autres à des lithiases intrahépatiques liées à un faible taux de phospholipides (LPAC) (78).

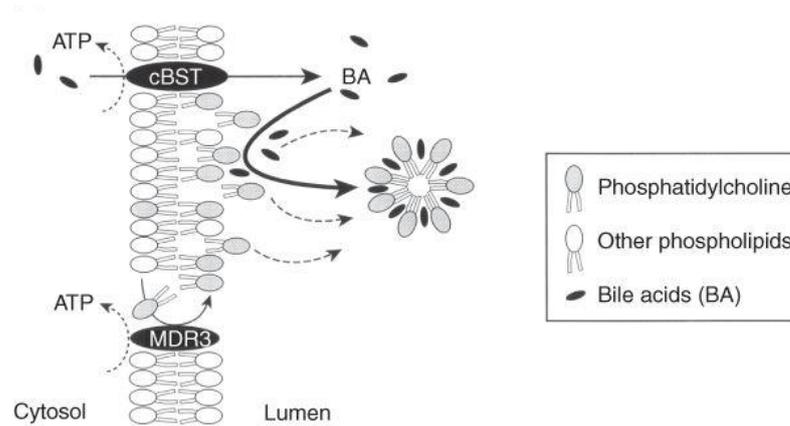


Figure 7 : Mécanisme de la sécrétion de la phosphatidylcholine dans la bile

Les sels biliaires sont transportés dans la lumière canaliculaire par le transporteur canaliculaire de sels biliaires (BSEP). La PC s'accumule du côté luminal de la membrane canaliculaire par l'action de MDR3. Les sels biliaires, dans la lumière, extraient ensuite la PC de la membrane et forment des micelles avec le cholestérol (1).

C- Membres 5 et 8 de la sous famille G des transporteurs ABC : ABCG5/8

En plus de l'excrétion biliaire des phospholipides, la bile constitue une voie majeure d'élimination du cholestérol. *ABCG5* et *ABCG8* codant respectivement les transporteurs du stérol végétal, sterolin-1 et sterolin-2 sont responsables du transport du cholestérol dans l'hépatocyte (membrane canaliculaire) et de son absorption dans les entérocytes (membrane apicale) (79, 80). Les protéines *ABCG5* et *ABCG8* forment un hétérodimère dans le réticulum endoplasmique qui est adressé à la membrane apicale et forme ainsi un complexe fonctionnel capable de transporter des stérols neutres dans la bile ou dans la lumière intestinale (81). L'expression des gènes *ABCG5* et *ABCG8* est contrôlée par LXR (82). LXR est activé par les oxystérols et est donc considéré comme «un senseur cellulaire du cholestérol» (83).

Les mutations du gène *ABCG5* ou d'*ABCG8* sont responsables de la sitostérolémie, maladie autosomique récessive rare, caractérisée principalement par une augmentation de l'absorption du cholestérol et des sitostérols et aussi de la diminution de la sécrétion de ces

stéroïls dans la bile (65). Chez la souris G5G8^{-/-} (invalidée pour les gènes *ABCG5/8*), une diminution significative du taux de cholestérol biliaire et une accumulation de cholestérol dans le foie (après une alimentation en cholestérol seulement), sont observées (80).

D- Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)

Codée par le gène *ABCC2*, MRP2 est une phosphoglycoprotéine de 190 kDa, connue sous le nom de cMOAT pour transporteur multispécifique canaliculaire d'anions organiques. Elle est localisée à la membrane apicale des cellules polarisées comme les hépatocytes, les entérocytes et les cellules du tubule proximal rénal où elle facilite l'excrétion des médicaments et des produits chimiques. En effet, MRP2 intervient dans l'efflux dépendant de l'ATP de divers médicaments (y compris les médicaments anticancéreux), xénobiotiques et anions organiques. La plupart d'entre eux sont des conjugués amphipathiques divalents avec le GSH, du glucuronate et du sulfate (84). Les sels biliaires sulfatés et glucuronidés tels que le tauro- ou glycolithocholate sulfaté sont transportés par Mrp2/MRP2, alors que les sels biliaires monovalents ne sont pas des substrats pour Mrp2/MRP2 (85). Les isoformes de MRP2 (MRP1 et MRP3) sont localisés à la membrane basolatérale où ils peuvent servir de système compensatoire lorsque la fonction excrétrice de MRP2 est altérée (86). L'expression de MRP2 est régulée par FXR, le *constitutive androstane receptor* (CAR), et le *pre-gnane X receptor* PXR (Figure 8). En effet, il a été montré que les ligands de FXR, PXR et CAR activent la transcription du gène codant MRP2 dans le but d'excréter des agents toxiques conjugués des hépatocytes dans la bile (87).

Des mutations du gène *ABCC2* ont été identifiées et entraînent le syndrome de Dubin-Johnson, maladie autosomique récessive rare caractérisée par une altération de l'excrétion canaliculaire d'un large éventail de composés amphipathiques endogènes et exogènes et par conséquent une hyperbilirubinémie bénigne et le dépôt d'un pigment noir dans les hépatocytes (88).

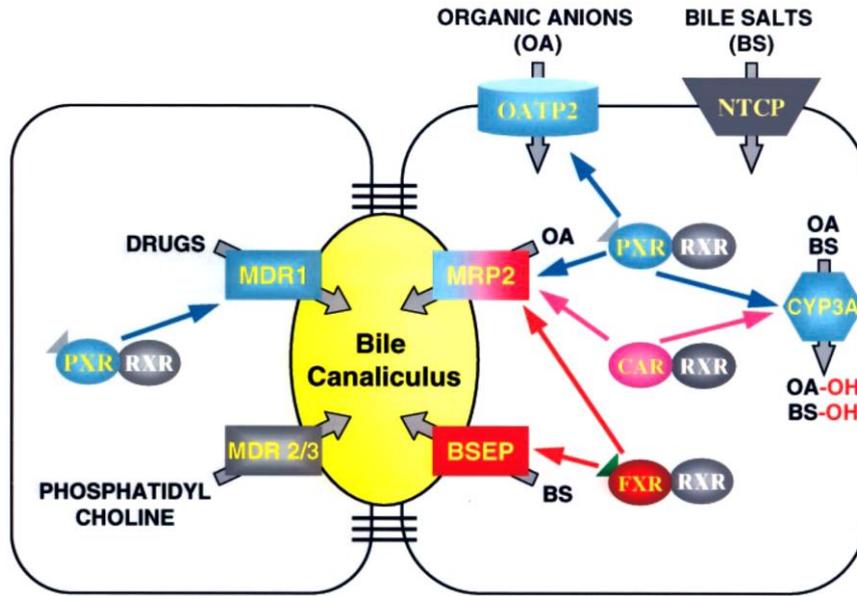


Figure 8 : Régulation de l'expression de MRP2 par les récepteurs nucléaires

L'activation de l'hétérodimère hépatique FXR/RXR stimule l'exportation des sels biliaries (BS) et les anions organiques (OA) des hépatocytes dans la bile en augmentant l'expression de BSEP et MRP2. FXR et ses gènes cibles sont montrés en rouge. L'activation de l'hétérodimère PXR/RXR augmente l'absorption d'OA du sang à travers la membrane basale en augmentant l'expression d'OATP2. PXR et ses gènes cibles sont montrés en bleu. Dans les hépatocytes, les OA et les BS sont ensuite métabolisés par le CYP3A, qui est lui-même régulé par les récepteurs PXR et RXR. Ces métabolites sont alors transportés de l'hépatocyte aux canalicules biliaries via MRP2. L'expression de MRP2 est induite par les récepteurs PXR/RXR ou CAR/RXR activés (en rose). En plus de FXR/RXR, PXR/RXR augmente également l'expression de MDR2/3, qui transporte les PC à travers la membrane canaliculaire de manière ATP dépendante. NTCP facilite l'absorption des ABs par le sang (87).

E- Familial intrahepatic cholestasis 1 (FIC1)

La protéine *Familial intrahepatic cholestasis 1* (FIC1) est codée par le gène *ATP8B1*. FIC1 fait partie de la famille des ATPase de type 4. Les ATPases de type 4 sont des protéines transmembranaires qui interviennent dans la translocation des phospholipides de la bicouche des membranes biologiques. FIC1 est situé sur la membrane canaliculaire des hépatocytes. Elle

agit comme une flippase qui entraîne le déplacement de la phosphatidylsérine (PS) et de la phosphatidyléthanolamine (PE) du feuillet externe au feuillet interne de la membrane plasmique de l'hépatocyte (84). Cette activité de flippase aide à maintenir une distribution asymétrique des phospholipides dans la bicouche membranaire (concentration plus élevée de PS et de PE dans la couche interne), ce qui aide à protéger la membrane des fortes concentrations de sels biliaries dans la lumière canaliculaire (85) et à maintenir son intégrité (89). En effet, les lipides sont répartis asymétriquement dans les membranes plasmiques. Le feuillet interne de la membrane contient des aminophospholipides (PS et PE), alors que le feuillet externe contient principalement de la PC et de la sphingomyéline (Figure 9).

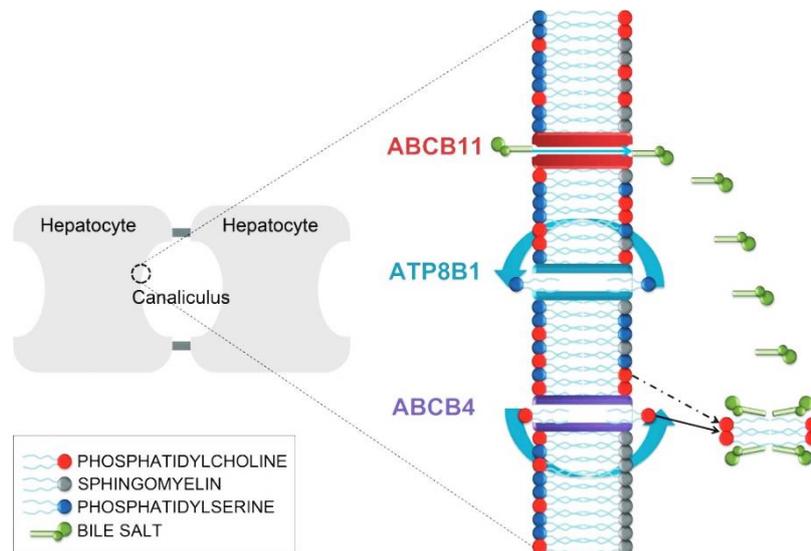


Figure 9 : Rôle de l'asymétrie lipidique au niveau de la membrane canaliculaire

L'asymétrie lipidique au niveau de la membrane plasmique est connue pour être importante pour la fonction de barrière. Les sels biliaries sont exportés dans le canalicule biliaire par BSEP/*ABCB11*. La floppase MDR3/*ABCB4* bascule les PC dans le feuillet externe de la membrane canaliculaire, où ils sont extraits dans la bile par les sels biliaries. L'excès du basculement de la PC déstabilise la membrane canaliculaire, ce qui provoque un flop spontané du PS dans le feuillet externe. La dilution de la sphingomyéline dans le feuillet externe induit une phase liquide désordonnée et rend la membrane canaliculaire plus sensible à la solubilisation des détergents. La flippase ATP8B1 doit donc rebasculer la PS dans le feuillet interne de la membrane canaliculaire pour maintenir cette asymétrie (90).

Le maintien de cette distribution asymétrique est nécessaire pour une activité optimale de divers transporteurs (91). FIC1 est également fortement exprimée dans les tissus extrahépatiques : l'intestin grêle, les reins et le pancréas (92). FIC1 fonctionne en association avec la protéine accessoire CDC50 et forme un complexe (93). En l'absence de cette flippase, l'asymétrie lipidique membranaire est perturbée et la fonction de BSEP est altérée conduisant à une cholestase (94).

Des mutations du gène codant FIC1 sont responsables de la cholestase intrahépatique familiale progressive de type 1 (PFIC1).

F- Bile salt export pump (BSEP)

La pompe d'exportation de sels biliaires (BSEP) est le principal transporteur responsable de la sécrétion biliaire dépendante des ABs. Il est exprimé de manière exclusive dans la membrane apicale/canaliculaire des hépatocytes. BSEP fournit la force motrice du flux biliaire entre les hépatocytes et la vésicule biliaire, où des gradients de concentration élevés d'ABs doivent être surmontés.

À l'origine, la pompe canaliculaire d'exportation des sels biliaires BSEP/Bsep (*ABCB11/Abcb11*) était décrite comme étant la sœur de la glycoprotéine P (SPGP/Spgp). En 1995, l'équipe de Childs S. a réalisé le clonage partiel de la Spgp dans le foie de porc (95). Ce n'est qu'en 1998 que cette équipe ainsi qu'une autre ont réussi à cloner l'ADNc complet de la Spgp à partir de foie de rat (96, 97). L'expression fonctionnelle de cette glycoprotéine P de rat dans les cellules d'insecte Sf9 a démontré qu'elle fonctionne comme un transporteur de sels biliaires dépendant de l'ATP avec des caractéristiques de transport comparables à celles des vésicules de la membrane plasmique canaliculaire du foie (97). Ces données fonctionnelles, associées à l'expression spécifique dans les hépatocytes, à la surface des microvillosités canaliculaires, indiquent que la Spgp représente la pompe d'exportation canaliculaire de sels

biliaires chez les mammifères. La SPGP a ensuite été renommée BSEP. Elle a été décrite comme étant une protéine de deux domaines transmembranaires (DTM) constitué de six hélices chacun. Les deux DTMs sont séparés par un grand domaine cytoplasmique et le deuxième DTM est suivi par un autre grand domaine cytoplasmique. Ces deux domaines cytoplasmiques constituent les NBDs (*nucleotide binding domains*) qui participe au site de liaison à l'ATP (fournissant l'énergie nécessaire à la translocation du substrat) (97). Cette organisation structurale constitue la principale base structurale typique de transporteurs ABC (98, 99) (Figure 10). Les NBDs contiennent des motifs conservés qui sont le Walker A et Walker B ainsi le motif de signature de la famille des transporteurs ABC (LSGGQ), ainsi que les boucles A-D-H et Q.

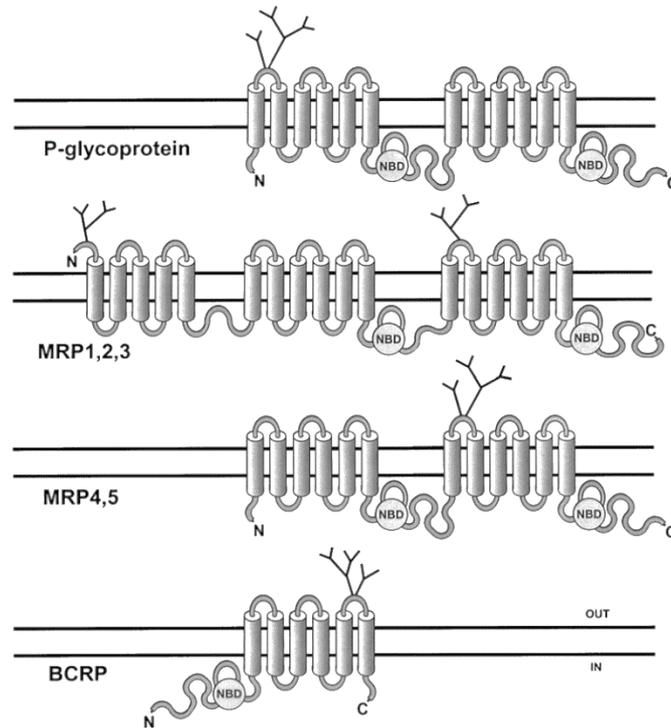


Figure 10 : Structure prédictive de quelques membres de la superfamille des transporteurs ABC

Quatre classes sont ici représentées. Elles sont basées à la fois sur la structure prédite et sur l'homologie des séquences d'acides aminés. (1) La P-glycoprotéine (*ABCB1*), comme *ABCB11*, est composée de deux DTMs contenant chacun 6 segments transmembranaires, et deux NBDs. Elle est N-glycosylée sur sa première boucle extracellulaire. (2) Les MRPs 1, 2 et 3 (*ABCC1*, 2 et 3) ont un domaine supplémentaire de 5 segments transmembranaires du côté N-terminal. (3) Les MRPs 4 et 5 (*ABCC4* et 5) n'ont pas ce domaine supplémentaire. (4) BCRP (*ABCG2*) est un héli-transporteur inversé, comme *ABCG5* et *ABCG8*. Il est N-glycosylé sur la troisième boucle extracellulaire. Au contraire des autres transporteurs, le domaine NBD est du côté N-terminal et le domaine DTM est du côté C-terminal (100).

Le gène *ABCB11* codant BSEP est situé sur le chromosome 2q24-31, possède 27 exons et code pour 1321 acides aminés. Chez la souris et le rat, Bsep présente une homologie de séquence à plus de 80%, avec BSEP humain et la différence entre ces espèces se trouvent principalement dans les hélices transmembranaires prédites, tandis que les boucles cytoplasmiques présentent une très faible variabilité (58, 60, 101). BSEP est une glycoprotéine

à quatre sites putatifs de N-glycosylation et d'un poids moléculaire de 140 à 170 kDa (60, 97, 102-104) (Figure 11). Bsep de rat est N-glycosylé sur les quatre sites de glycosylation putatifs. En effet il a été montré que cette N-glycosylation est requise pour la stabilité de la protéine, son trafic intracellulaire et son fonctionnement à la membrane apicale (105). Outre la glycosylation, la phosphorylation et l'ubiquitination représentent les autres modifications post-traductionnelles de Bsep (101).

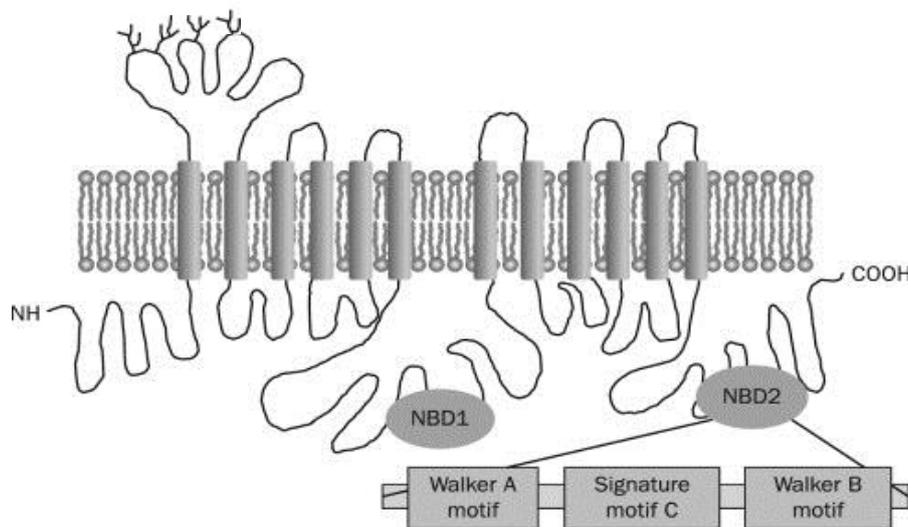


Figure 11 : Modèle topologique prédictif de la protéine BSEP

La protéine contient deux domaines transmembranaires (DTMs) et les domaines de liaison à l'ATP (NBDs). Les domaines fonctionnels Walker A et B, et la signature ABC (motif C) ainsi que les sites de glycosylation sont indiqués (106).

En tant que principal transporteur canaliculaire d'ABs, BSEP/Bsep transporte principalement les ABs conjugués de manière ATP-dépendante avec un ordre d'affinité : l'acide taurochénodésoxycholique > l'acide taurocholique > l'acide tauroursodésoxycholique > l'acide glycocholique (60, 104). En revanche, dans les vésicules de cellules d'insecte Sf9, Bsep ne transporte pas l'acide cholique (102). Bien que BSEP transporte principalement des ABs, il peut également transporter des médicaments tels que la pravastatine (hypolipidémiant

de la famille des statines qui inhibe la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA réductase) (107). En effet, jusqu'à présent, seule la pravastatine a été identifiée comme un substrat non biliaire de BSEP. L'équipe de Hirano a montré que BSEP peut l'accepter comme substrat et que l'absorption de ce médicament par BSEP humain est significativement plus importante que par Bsep de rat.

BSEP/Bsep est une cible majeure des lésions cholestatiques induites par les médicaments dans le foie (108). Les études sur les vésicules d'insectes Sf9 ont montré que les médicaments cholestatiques ou leurs métabolites peuvent, soit inhiber le transporteur directement du côté cytoplasmique comme le bosentan, le glibenclamide, la rifampicine et la cyclosporine (104, 109, 110), ou indirectement après excrétion dans le canalicule par MRP2 comme c'est le cas pour l'estradiol-17 β -glucuronide (110).

VIII- Biosynthèse et trafic intracellulaire d'*ABCB11*

1- Régulation transcriptionnelle de l'expression d'*ABCB11*

Les principaux régulateurs de l'expression de BSEP sont les suivants : FXR, LRH-1 et *nuclear erythroid 2 p45-regulated factor 2* (Nrf2) (Figure 12). L'expression de BSEP est fortement régulée par FXR chez l'homme, la souris et le rat *via* son hétérodimérisation avec RXR α et sa liaison avec FXRE (*FXR response element*) et IR-1 (*inverse repeat 1*) sur le promoteur de BSEP (111-113). L'agoniste physiologique de FXR (le CDCA) et les agonistes synthétiques potentiels de FXR les plus puissants (le GW4064 et l'acide 6-éthylchénodésoxycholique), induisent l'expression de l'ARNm et de la protéine BSEP dans de nombreuses lignées cellulaires et modèles animaux. Le CDCA, facilite également le recrutement du complexe ASCOM conduisant à la méthylation des histones dans la région promotrice. Ce processus se révèle être essentiel pour l'expression de Bsep dépendante de

FXR (114). Le coactivateur du récepteur stéroïdien -2 (SRC-2) a également été montré comme interagissant de manière coopérative lors de la stimulation du promoteur de BSEP par FXR. L'AMPK active SRC-2 en le phosphorylant puis à son tour active BSEP en synergie avec le récepteur nucléaire FXR, entraînant la sécrétion d'ABs hépatiques et l'absorption des graisses alimentaires (115). Le rôle physiologique de FXR dans la régulation de Bsep est également, démontré chez les souris *Fxr*^{-/-} où le niveau basal d'expression de Bsep est nettement réduit et ne peut être induit par les ABs (59).

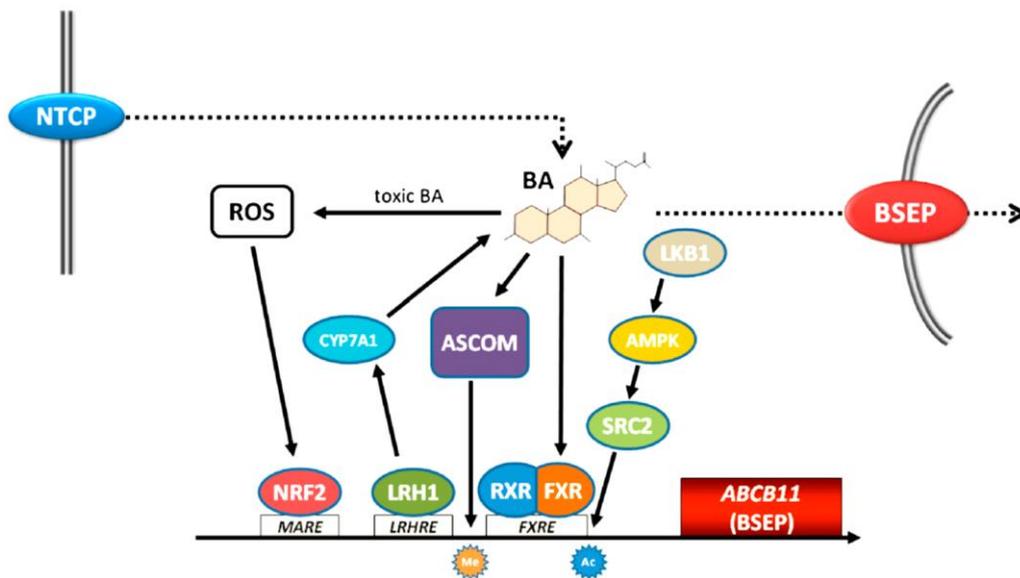


Figure 12 : Régulation transcriptionnelle d'ABCB11

Les ABs sont des régulateurs majeurs de l'expression de BSEP par FXR. Le complexe d'activation ASCOM est recruté par les ABs/FXR pour la méthylation (Me) des histones dans le promoteur de BSEP. NRF2 est activé par le stress oxydatif, se lie à un élément de reconnaissance et transactive le promoteur de BSEP. Le co-activateur des récepteurs stéroïdiens-2 (SRC2) est activé par la kinase du foie B1 (LKB1) et l'AMPK et active l'expression génique par acétylation (Ac) d'histones. LRH1 transactive BSEP et CYP7A. La transcription accrue de BSEP augmente éventuellement l'expression protéique de BSEP et l'élimination des ABs intracellulaires. Les flèches indiquent une stimulation/activation, les lignes en pointillé représentent le flux des ABs (116).

La kinase du foie (LKB1), qui est une sérine/thréonine kinase, agit en amont de l'AMPK et active en outre d'autres kinases de la famille des AMPK. LKB1 régule la polarité cellulaire et l'homéostasie énergétique cellulaire *via* l'AMPK. L'inactivation de LKB1 chez des souris *Lkb1*^{-/-} entraîne une altération de la formation des voies biliaires et de la clairance des ABs et une diminution marquée de l'ARNm de *Bsep* et *Ntcp* dans le pool intracellulaire avec une réduction de l'expression protéique (117).

Bien que FXR soit un régulateur essentiel de l'expression de *Bsep*, d'autres facteurs de transcription peuvent également être impliqués. L'activité du promoteur de *BSEP* est induite par l'homologue spécifique du récepteur hépatique (LRH-1, NR5A2) (118). LRH-1 est un régulateur clés de la *CYP7A1* (synthèse des ABs à partir du cholestérol). Il a été retrouvé chez les souris *Lrh1*^{-/-} que l'expression de *Bsep* est diminuée dans leur foie accompagnée d'une réduction de la synthèse de CA (119). En revanche, il a été montré dans la lignée cellulaire CV-1 que la 1,25-dihydroxyvitamine D3 inhibe la transactivation du complexe CDCA-FXR et donc l'activité du promoteur de *BSEP* (120). D'autre part, le promoteur de *BSEP* est régulé positivement par NRF2), qui joue un rôle important dans la réponse au stress oxydatif. NRF2 est un senseur du stress oxydatif (121) qui peut être utile pour contrecarrer les espèces réactives de l'oxygène (ROS) induites par les ABs toxiques (122). Il se lie aux éléments de réponse qui régulent de nombreuses enzymes de la phase hépatique I et II et les transporteurs d'efflux tels que MRP3 et MRP4 (123).

2- Biosynthèse de la chaîne polypeptidique et maturation

La biosynthèse des protéines dont les transporteurs ABC, destinés à la membrane canaliculaire de l'hépatocyte commence dans le réticulum endoplasmique (RE). Ces protéines néosynthétisées subissent un contrôle qualité dans le RE puis traversent différents compartiments avant d'atteindre la membrane plasmique/canaliculaire. Les transporteurs ABC

sont cotraductionnellement transloqués par le complexe Sec61 en formant un translocon sur lequel le ribosome vient se placer, à l'aide de la SRP (Signal recognition particule) et de son récepteur, assurant ainsi le passage de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse à travers la membrane du RE (124) (Figure 13).

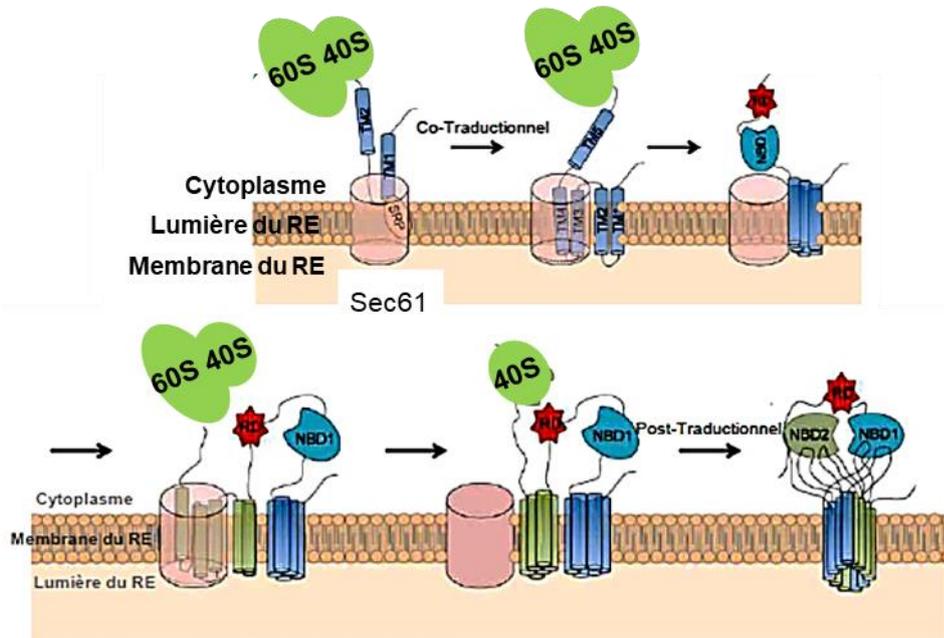


Figure 13 : Modèle de biosynthèse d'ABCC7/CFTR

La biosynthèse de la chaîne polypeptidique de CFTR est initiée par le ribosome qui est ciblé vers la membrane du RE grâce à la SRP et à son récepteur. La traduction a lieu à travers le complexe Sec61. La chaîne polypeptidique émergente est co-traductionnellement insérée dans la membrane du RE à l'aide de séquences signal (125).

Les protéines membranaires sont adressées suivant le même mécanisme, chaque segment transmembranaire étant intégré à la membrane durant la synthèse. La N-glycosylation commence dans le RE et se termine dans l'appareil de Golgi avec la maturation des chaînes glycanes, après un repliement correct de la chaîne peptidique. La N-glycosylation joue un rôle dans le repliement, le trafic et surtout la stabilité des transporteurs à la membrane. *ABCB11/BSEP* possède quatre sites de N-glycosylation (Asn109, Asn116, Asn122, et Asn125)

dans la première boucle extracellulaire. Des délétions progressives des sites de N-glycosylation ont montré qu'il en fallait au moins deux pour garantir sa stabilité (105).

Les protéines chaperones, telles que Hsp70 (*Heat shock protein*) (cytosolique), la calnexine et la calréticuline (résidant dans le RE), permettent son repliement correct et son passage vers l'appareil de Golgi. Si la conformation native est acquise, la protéine quitte le RE par des vésicules à destination du compartiment intermédiaire RE-Golgi puis vers l'appareil de Golgi. Dans le cas contraire, la présence de la protéine est prolongée dans le RE jusqu'à l'adoption d'une conformation correcte. Si le mauvais repliement persiste, la protéine est alors ciblée par des enzymes de déglycosylation, retro-transloquée dans le cytosol (via Sec61), et dégradée par le système ERAD. In vitro, il est possible de restaurer un adressage correct à la membrane cellulaire par diminution de la température de culture des cellules à 27°C. Ceci serait dû à la diminution de la force d'interaction entre les protéines mal conformées et les Hsp, permettant ainsi leur maturation. Une fois insérée dans la membrane, les protéines présentent une activité. Toutefois, cette activité est inférieure à celle de la protéine sauvage.

La phosphorylation ainsi que l'ubiquitinylation sont d'autres types de modifications post-traductionnelles qui affectent BSEP. Elles sont toutes aussi importantes dans la localisation, le trafic et l'activité de BSEP.

3- Trafic intracellulaire d'*ABCB11* dans les hépatocytes

A- Le ciblage polarisé

Les hépatocytes possèdent une polarité complexe avec formation de domaines membranaires fonctionnels bien distincts qui sont le pôle sinusoidal (basolatéral) et un pôle canaliculaire (apical). La plupart des protéines à destination de la membrane canaliculaire passent d'abord par la membrane basolatérale avant de rejoindre le canalicule biliaire par

transcytose (126, 127). Cette voie de trafic indirecte ne s'applique pas pour les transporteurs ABC nouvellement synthétisés. Kipp *et al.* ont montré par des expériences de pulse-chase, d'immunoprécipitations et de purification de compartiments subcellulaires, que BSEP nouvellement synthétisée passait directement du Golgi vers un compartiment vésiculaire subapical où elle peut être séquestrée temporairement (plusieurs heures) avant d'atteindre la membrane plasmique apicale (le canalicule biliaire) (128). Ce compartiment subapical est constitué d'endosomes de recyclage qui expriment rab11 (129). Rab11, est une petite protéine de liaison au GTP qui s'associe au recyclage des endosomes dans des cellules non polarisées et polarisées (130). Il a été montré que BSEP est colocalisée avec des endosomes associés à Rab11 et ceux-ci apparaissent sous forme de tubulo-vésicules ou de structures globulaires proches des centres cellulaires organisateurs des microtubules (129). En revanche, d'autres protéines apicales de la famille des ABC transporteurs tels que MDR1, MDR2 et MDR3, semblent également se rendre directement du Golgi vers la membrane canaliculaire, mais elles ne s'attardent pas comme BSEP dans le compartiment vésiculaire subapical appelé « réservoir » intracellulaire (128).

B- La stabilité membranaire, le recyclage et le réservoir intracellulaire

Il existe un pool de recyclage pour BSEP qui peut être rapidement mobilisable vers la membrane plasmique après sa stimulation. Lors d'un repas où il y a un besoin de sécréter des ABs pour faciliter la digestion, les pools cytoplasmiques qui servent de réservoir de stockage de BSEP, peuvent être rapidement ciblés vers la membrane plasmique pour augmenter la capacité de transport (131). Le réservoir intrahépatique est volumineux contenant au moins six fois plus de transporteurs ABC que dans la membrane canaliculaire. L'augmentation du flux biliaire est directement liée à l'augmentation rapide de la quantité des transporteurs ABC au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes. L'AMPc, le taurocholate (TC), le

tauroursodeoxycholate (TUDCA) induisent l'augmentation du trafic des transporteurs ABC au canalicule biliaire. Cette réponse physiologique est due à une demande temporelle de sécrétion biliaire. Cette augmentation d'expression membranaire qui représente environ trois fois la quantité de transporteurs peut être inhibée par la colchicine, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules. Cela prouve que le réseau de microtubules intervient dans l'adressage apical des transporteurs (132). Il a été montré dans des modèles animaux expérimentaux de cholestase que le TUDCA stimule l'insertion de Mrp2 (*Abcc2*) et de Bsep dans la membrane plasmique apicale (133-135). La sécrétion de sels biliaires stimulée par l'AMPc dans le foie de rats isolé et perfusés est bloquée par les inhibiteurs de microtubules, ce qui indique la nécessité d'un cytosquelette intact dans cette régulation (136).

Le trafic vers la membrane apicale de ces transporteurs dépend aussi d'une enzyme clé de la signalisation cellulaire : la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K). La PI3K est une enzyme ubiquitaire activée par l'AMPc. Son inhibition entraîne une diminution de la sécrétion biliaire liée à une diminution des transporteurs (137). Lors d'une cholestase induite par ligation des voies biliaires, par une administration de Phalloïdine ou de lipopolysaccharides chez le rat, le trafic membranaire est perturbé. Dans ces conditions, BSEP, MDR3, MDR1 et MRP2 colocalisent dans des structures intracellulaires péri-canaliculaires (138, 139).

La demi-vie de BSEP/Bsep dans la membrane apicale est d'environ 4-6 jours et il a été suggéré que la protéine est recyclée de manière constitutive entre la membrane plasmique et les vésicules subapicales (endosomes) et nécessite la myosine 5B (MYO5B) (140, 141). Dans les cellules WIF-B9 exprimant BSEP, ce recyclage constitutif est dépendant des microtubules et sensible aux inhibiteurs de l'actine, mais non affecté par la bréfeldine A, l'AMPc, le TC ou les inhibiteurs de la phosphatidylinositol 3-kinase (129). Cette voie a été proposée pour fournir une réponse rapide aux transporteurs canaliculaires lorsque la sécrétion d'ABs est nécessaire (142).

C- Les protéines partenaires du trafic intracellulaire

D'autres études ont identifié d'autres protéines qui s'associent à BSEP/Bsep et aident à « l'ancrage » du transporteur sur son site d'action. La chaîne légère régulatrice de la protéine motrice myosine II (MLC2) interagit avec la région NBD de BSEP et joue un rôle important dans le trafic de BSEP vers la membrane plasmique (143). L'expression d'une forme dominante négative, non phosphorylable, de MLC2 a réduit les niveaux de BSEP dans la membrane apicale des cellules MDCK. Ainsi, le traitement avec l'inhibiteur de MLC2, la blebbistatine, a réduit l'apport de BSEP à la membrane plasmique apicale (143). De plus, Kruglov *et al.* ont découvert que le récepteur du 1,4,5 triphosphate d'inositol de type II (InsP3R2) colocalisait avec Bsep au niveau de la membrane canaliculaire et que la perte de ce régulateur de Ca^{2+} entraînait une endocytose de Bsep dans un compartiment intracellulaire, peri-canaliculaire, avec une diminution conséquente de la sécrétion en sels biliaries (144). Il a également été montré que la région NBD se liait à la protéine X-1, associée au cytosquelette (Hax-1), qui interagit également avec la cortactine (145). La déplétion de Hax-1 ou la surexpression des formes négatives dominantes de cortactine ou EPS15 entraîne une augmentation du taux de BSEP dans la membrane apicale des cellules MDCK, ce qui suggère que ces protéines jouent un rôle important dans l'internalisation de BSEP à partir de la membrane plasmique. Soroka *et al.* ont montré que l'extrémité C-terminale de la protéine Bsep contient un motif tyrosine ($^{1310}YYKLV^{1314}$) qui est essentiel à l'endocytose constitutive de Bsep. Ce motif est conservé parmi les membres étroitement apparentés de la sous-famille ABCB (146). L'équipe de Hayashi *et al.* a également montré que le motif tyrosine C-terminal de BSEP interagissait directement avec AP-2, une protéine adaptatrice associée à une endocytose dépendante de la dynamine et de la clathrine (147). La figure 14 résume ces interactions.

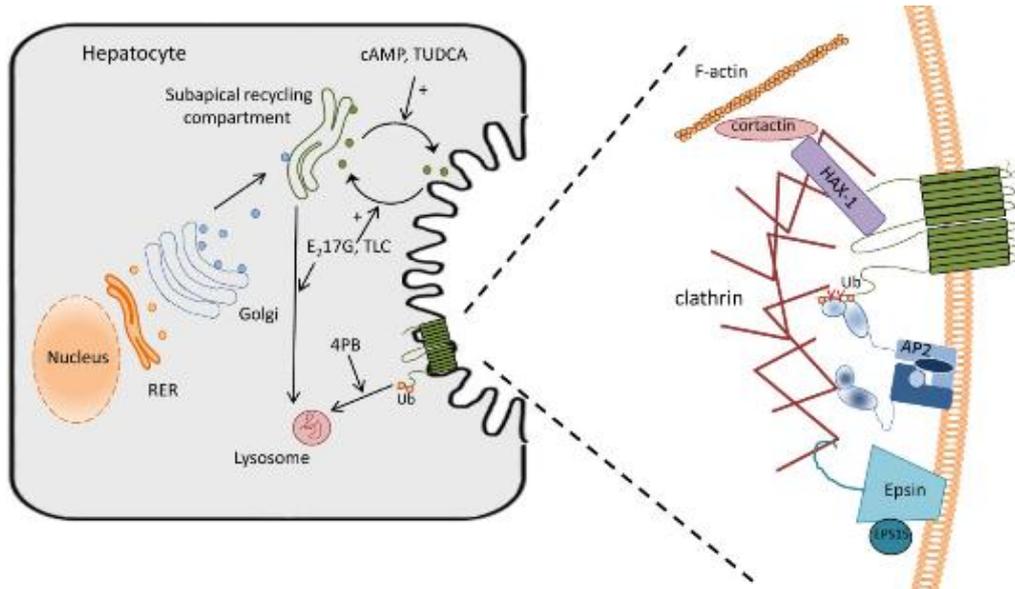


Figure 14 : Les partenaires du trafic régulant le recyclage endosomal de BSEP dans l'hépatocyte

Après modification post-traductionnelle dans le Golgi, BSEP est acheminée vers un compartiment de recyclage subapical. Le trafic à destination et en provenance de ce compartiment endosomal est fortement régulé par diverses voies de kinases. L'AMPc et le traitement au tauroursodésoxycholate (TUDCA) entraînent notamment une augmentation du mouvement vers la membrane plasmique canaliculaire, alors que le traitement par l'œstradiol-17-glucuronide (E, 17G) et le tauroolithocholate (TLC) entraînent une augmentation de l'endocytose vers l'endosome de recyclage et éventuellement le lysosome pour la dégradation. Le phénylbutyrate (PB) peut agir en modifiant le taux d'ubiquitination (Ub) et la dégradation lysosomale de BSEP. L'internalisation de BSEP à la membrane plasmique est un processus dépendant de la clathrine impliquant l'interaction de nombreux partenaires. L'AP-2 se lie à un motif contenant la tyrosine dans l'extrémité C-terminale de Bsep, permettant l'endocytose par un mécanisme dépendant de la clathrine. Le 4-PB diminue l'expression de la sous-unité α -adaptine de l'AP2, altérant ainsi la capacité de l'AP2 à interagir avec BSEP et à réduire l'endocytose du transporteur. L'endocytose apicale dépend de la clathrine et requiert HAX-1, la cortactine et d'autres composants de fixation à l'actine (146).

D- Les voies de dégradation des transporteurs ABC

Les protéines sont continuellement renouvelées, ce qui implique des processus permanents de synthèse et de dégradation. Les transporteurs ABC sont dégradés selon deux voies : soit par le protéasome soit par le système lysosomal. Le mécanisme de dégradation des protéines matures ou en cours de synthèse est différent. Il faut noter que le repliement des transporteurs ABC n'est pas très efficace. Des données montrent que seuls 30% de CFTR subit une maturation correcte alors que le reste est dégradé aussi rapidement comme c'est le cas du mutant immature $\Delta F508$ (148).

a- Le protéasome

Le RE est le site principal où les protéines membranaires nouvellement synthétisées telles que BSEP, subissent une maturation et se replient pour atteindre la structure tridimensionnelle adéquate. Les protéines néosynthétisées sont ensuite soumises à un contrôle qualité puis traversent différents compartiments pour atteindre la membrane plasmique. Seules les protéines correctement repliées et assemblées sont capables de quitter le RE. La plupart des protéines mal repliées sont retenues dans le RE et ensuite dégradées dans le cytosol par un processus connu sous le nom de la dégradation des protéines associée au RE (ERAD). Au cours du processus ERAD, une protéine membranaire aberrante est, d'abord, reconnue et ubiquitinylée par une enzyme spécifique E3, exportée hors du RE par le mécanisme de rétro-translocation et finalement dégradée par le protéasome (149). Le protéasome est constitué de protéases multimériques ATP dépendantes. Il est abondant dans le cytoplasme et le noyau des cellules eucaryotes, où il intervient dans la dégradation des substrats ubiquitinylés dont les transporteurs ABC auxquels l'ubiquitine est greffée sur les résidus lysines afin de marquer les protéines destinées à la dégradation comme le mutant CFTR/ $\Delta F508$. Plusieurs données suggèrent que les protéines CFTR mal repliées sont des substrats de la voie du protéasome et

de l'ubiquitine. Le traitement de cellules avec des inhibiteurs du protéasome (la lactacystine et le MG132) provoquent l'accumulation de formes multi-ubiquitylées de CFTR. Dans des cellules exprimant une forme dominante négative de l'ubiquitine, le transporteur s'accumule, démontrant que la multi-ubiquitylation est un prérequis pour la dégradation (148). L'inhibition du protéasome stabilise certains mutants d'*ABCB11*/BSEP retenus dans le RE, dans des cellules MDCK et HEK293 (140, 150-153). Ces résultats montrent que le protéasome joue un rôle majeur dans la dégradation des mutants des transporteurs ABC au niveau du RE.

b- Le système lysosomal

Le protéasome représente la voie majeure de dégradation des transporteurs ABC aberrants. Cependant, un certain nombre d'études suggèrent qu'il existe une autre voie impliquée dans l'élimination des protéines malformées. Il s'agit du système de dégradation par macro-autophagie/lysosome. En atteignant la membrane plasmique, les transporteurs ABC sont réinternalisés dans les endosomes précoces puis recyclés. Cependant, une partie des protéines échappe au recyclage et sera sujet à la dégradation lysosomale. Bien que les protéines membranaires non-natives qui ont échappé au contrôle qualité du RE soient dégradées préférentiellement par les lysosomes, il semble que le protéasome soit aussi impliqué. Certains mutants de CFTR tronqués de leur extrémité C-terminale atteignent la membrane plasmique mais sont instables. Ils ne sont pas pris en charge par le lysosome, mais par le protéasome (154). D'autres mutants, qui n'entraînent pas de rétention dans le RE, subissent une maturation normale, mais leur stabilité à la membrane plasmique est affectée. Le mutant BSEP^{D482G}, par exemple, a une demi-vie très réduite par rapport à celle de la protéine sauvage, par conséquent, son activité est également réduite. L'inhibition du protéasome augmente sa stabilité, contrairement à l'inhibition des protéases lysosomales (155).

IX- Les cholestases

1- Définition et étiologie

La cholestase est définie comme une perturbation de l'écoulement de la bile provoquée par des maladies soit dans les hépatocytes, soit dans les voies biliaires intrahépatiques ou dans le système biliaire extrahépatique. Les maladies cholestatiques du foie sont les formes les plus courantes des troubles du foie résultant de maladies hépatiques acquises ou héréditaires. Un débit biliaire insuffisant entraîne une accumulation des composants de la bile (la bilirubine, les ABs et les lipides) dans le foie. Par conséquent, cette surcharge peut causer une élévation des taux de bilirubine et des sels biliaires dans le foie et le sang, ainsi que la dérégulation du métabolisme lipidique. Cliniquement, les patients manifestent souvent un ictère (jaunisse) suite à une hyperbilirubinémie. Un des symptômes les plus handicapants est le prurit (démangeaisons). Une maladie cholestatique hépatique chronique peut évoluer vers la cirrhose et l'insuffisance hépatique, cause principale de transplantation hépatique pédiatrique.

Anatomiquement, il faut distinguer la cholestase d'origine extrahépatique ou intrahépatique. La cholestase extrahépatique est causée par des anomalies structurelles des voies biliaires, telles que l'obstruction des voies biliaires extrahépatiques (visible en imagerie). Les traitements chirurgicaux sont généralement appliqués pour restaurer la fonction physiologique. La cholestase intrahépatique est plus compliquée, causée par une diminution ou un arrêt de la sécrétion canaliculaire de la bile conduisant à une accumulation de composants toxiques dans l'hépatocyte. Les causes communes de ces deux types de cholestases sont illustrées dans la figure 15.

Les troubles cholestatiques peuvent provenir soit de mutations génétiques, soit de maladies acquises. Les maladies héréditaires caractérisées par une cholestase hépatocanaliculaire due à des anomalies des transporteurs hépatobiliaires, comprennent les

cholestases génétiques (cholestases intrahépatiques familiales progressives : PFIC), les cholestases intrahépatiques récurrentes bénignes (BRIC), les cholélithiases familiales causée par un manque de sécrétion biliaire de phospholipides (cholélithiases associées à de faibles phospholipides ou maladie de la vésicule biliaire, LPAC), la cholestase intrahépatique de grossesse (ICP) et plusieurs autres maladies rares. Les cholestases acquises comprennent des troubles tels que la cirrhose biliaire primitive, la cholangite sclérosante primitive, la cholestase induite par l'inflammation, la cholestase induite par les médicaments ou encore la cholestase gravidique. La prédisposition héréditaire joue également un rôle important dans la cholestase intrahépatique induite par un médicament.

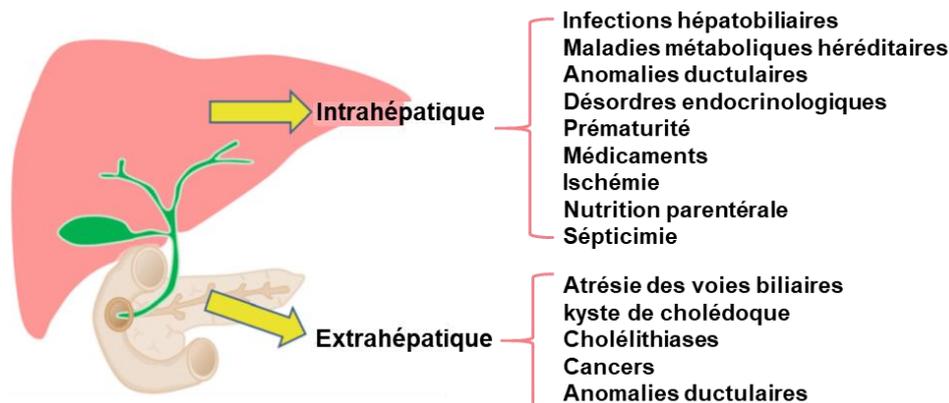


Figure 15 : Étiologie des cholestases intrahépatiques et extrahépatiques

Adaptée d'après Chen, 2018 (156).

2- Cholestases Familiales Intrahépatiques Progressives (PFIC)

Les PFIC constituent un groupe hétérogène de maladies hépatiques récessives autosomiques d'origine héréditaire. Elles ont été décrites pour la première fois par Clayton et ses collaborateurs en 1969 sous le nom de maladie de Byler dans une population apparentée aux Amish (157). Elles se présentent sous forme d'une cholestase intrahépatique chez le nourrisson ou le jeune enfant et entraînent une maladie grave du foie pouvant conduire à la

transplantation hépatique pendant l'enfance ou à l'âge adulte voire même au décès (158-160). Les PFIC représentent 10 à 15% des cas de syndrome de cholestases néonatales et 10 à 15% des enfants nécessitent une greffe du foie (159, 160). Il s'agit d'une maladie rare dont l'incidence est estimée entre 1 pour 50 000 et 1 pour 100 000 naissances bien que la prévalence exacte ne soit pas connue. La maladie affecte les deux sexes de manière égale et a été signalée dans le monde entier (159). Cliniquement, les PFIC se manifestent souvent durant la première année de vie et se caractérisent par un ictère, un prurit sévère, une hépatosplénomégalie, un retard de croissance et un retard mental. La coagulopathie, l'ostéopénie et les troubles neuromusculaires sont d'autres symptômes causés par un déficit en vitamines liposolubles. Sans traitement adéquat, la maladie évolue en fibrose hépatique et en cirrhose et aboutit généralement au décès par insuffisance hépatique au cours de la première année de vie ou, plus rarement, au cours de la deuxième décennie (159).

Le groupe des PFIC consiste en trois types de défauts génétiques (Figure 16) : PFIC1-3, classés en deux catégories selon le taux de γ -glutamyl transférase (γ -GT) dans le sérum. PFIC1 et PFIC2 sont caractérisées par un taux normal de γ -GT contrairement à la PFIC3. Cette activité élevée de γ -GT est associée à un endommagement de la membrane apicale des voies biliaires et l'interruption des connexions intracellulaires due à des concentrations élevées de sels biliaires dans la bile, chez les patients atteints de PFIC3.

La PFIC1 (ou maladie de Byler) est la conséquence d'un défaut sévère du gène codant l'ATPase, *ATP8B1/FIC1* (92). Le déficit en *ATP8B1/FIC1* entraîne une asymétrie phospholipidique de la membrane canaliculaire (le feuillet externe de la membrane, plus riche en aminophospholipides, devient moins résistant aux effets détergents des ABs) et réduit la capacité du foie à sécréter la bile (94). La forme la moins sévère et non progressive de ce déficit est appelée BRIC1.

La PFIC2 (ou syndrome de Byler) est causée par un défaut d'*ABCB11/BSEP*, le transporteur des ABs à la membrane canaliculaire des hépatocytes (161). Diverses mutations du gène de *BSEP* entraînent une diminution de la sécrétion des ABs, donc un ralentissement du flux biliaire et une accumulation des acides biliaires toxiques dans les hépatocytes. C'est cette pathologie qui a fait l'objet de mes travaux de thèse.

La PFIC3 est différente des deux premières dans la présentation clinique (γ -GT élevées), elle est causée par un défaut dans le gène *ABCB4* codant la protéine MRD3 (transporteur canaliculaire des PC) (75, 76). L'absence de phospholipides dans la bile déstabilise également les micelles et favorise la cristallisation du cholestérol, ce qui entraîne une augmentation de la lithogénicité biliaire. Cela augmente encore les dommages dans le foie en obstruant de petits canaux biliaires (159). Les anomalies bialléliques ou monoalléliques d'*ABCB4* peuvent causer ou prédisposer les patients à un large spectre de maladies du foie, telles que le syndrome LPAC, l'ICP, les lésions hépatiques d'origine médicamenteuse, la cholestase néonatale transitoire, la cholangite sclérosante des petits canaux et fibrose biliaire de l'adulte ou cirrhose (162-164). Des carcinomes hépatocellulaires et des cholangiocarcinomes intrahépatiques ont également été observés chez des patients présentant des mutations *ABCB4/MDR3* (164).

De plus, la protéine des jonctions serrées (*tight junction protein 2*, TJP2) et la MYO5B ont été retrouvées comme causant les PFIC. Le déficit en TJP2 (PFIC4) a été décrit pour la première fois en 2014 (165). TJP2 est un composant important des jonctions serrées, et le déficit en TJP2 perturbe les connexions intracellulaires et la fuite de la bile à travers l'espace paracellulaire dans le parenchyme hépatique. Le déficit en MYO5B a été également décrit pour la première fois en 2016 (166), causé par les mutations du gène *NR1H4* qui code pour FXR. La perte de FXR est associée à une cholestase néonatale sévère et une coagulopathie débutante indépendante de la vitamine K, évoluant rapidement vers une maladie hépatique au stade terminal. De plus, les

mutations de la MYO5B entraînent une dérégulation des protéines de Rab11a/b et perturbent davantage le trafic de BSEP (167, 168).

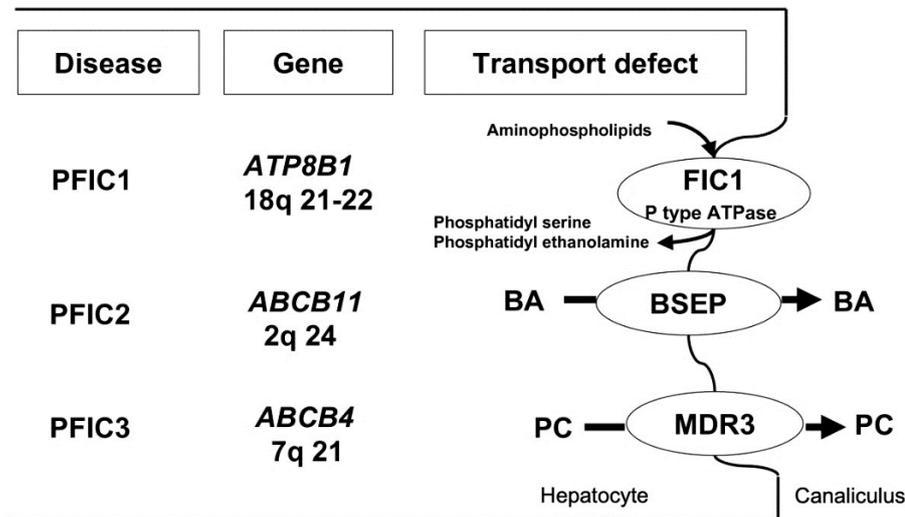


Figure 16 : Cholestases intrahépatiques familiales progressives (PFIC) : Types, gènes impliqués et défauts de transports

BA : acides biliaires, PC : phosphatidylcholine (158).

X- La Cholestase Familiale Intrahépatique Progressive de type 2 : PFIC2

Lors de mes travaux de thèse, je me suis intéressée plus particulièrement à cette maladie. La PFIC2 est une maladie autosomique récessive rare. Sa prévalence est de 1/100 000 naissances. Cette pathologie hépatique est causée par des mutations du gène *ABCB11* codant le transporteur hépatocyttaire BSEP (161, 169, 170). Chez les patients atteints de PFIC2, l'altération de la sécrétion des ABs entraîne une diminution du flux biliaire, une accumulation de sels biliaires dans les hépatocytes, des lésions hépatocellulaires persistantes et un risque accru de carcinome hépatocellulaire (169, 171). Cliniquement, la PFIC2 se manifeste par une cholestase souvent ictérique (avec jaunisse) dans les premiers mois de vie. Le plus souvent, persiste une cholestase sévère responsable d'un prurit handicapant (démangeaisons), d'un

retard de croissance et d'un ictère. La maladie évolue rapidement vers la cirrhose et l'insuffisance hépatique. Les patients développent une fibrose et une insuffisance hépatique avant l'âge adulte et en l'absence de transplantation hépatique, les enfants meurent souvent avant l'âge adulte. Suivant le type de mutation, le marquage canaliculaire de BSEP détectée par immunohistochimie du foie est plus ou moins impacté (169) (Figure 17). La conséquence est une sécrétion canaliculaire réduite des sels biliaires (< 1mM, normale > 10mM) qui s'accumulent alors dans l'hépatocyte et y exercent leur toxicité.

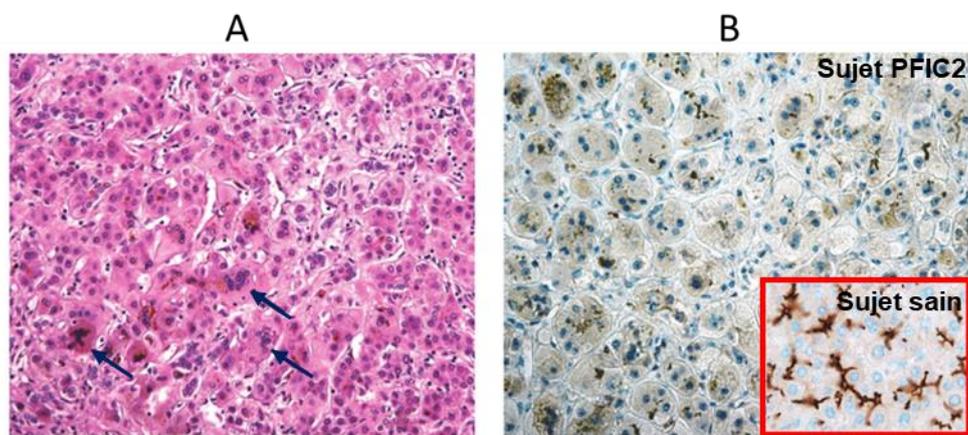


Figure 17 : Histopathologie de la PFIC2

(A) L'hépatite à cellules géantes (flèches) avec cholestase hépatocanaliculaire ou (B) l'absence totale de la protéine BSEP sont des signes typiques observés chez les patients atteints de PFIC2. **Encadré** : immunohistochimie positive de BSEP dans le domaine apical (canaliculaire) des hépatocytes chez un témoin sain. (A) Hématoxyline et éosine. (B, encadré) immunohistochimie avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-*ABCB11*. Adaptée d'après Sticova, 2018 (172).

Actuellement, les patients sont traités par l'acide ursodésoxycholique (UDCA) qui est un acide biliaire peu toxique du fait de son caractère hydrophile, la rifampicine qui est un antibiotique, inducteur enzymatique du cytochrome P450 et parfois par un traitement chirurgical (dérivation biliaire). Cela permet d'améliorer parfois le quotidien des patients et de ralentir l'évolution de la maladie. Néanmoins, une transplantation hépatique est nécessaire,

dans plus de la moitié des cas, avant l'âge adulte (159) en raison d'un prurit ininterrompu, d'une insuffisance hépatique ou d'un carcinome hépatocellulaire. Alors que la transplantation hépatique est curative dans la plupart des cas, des rapports récents ont indiqué que les patients atteints de PFIC2 ayant reçu une greffe du foie peuvent développer des récurrences dues au phénomène d'allo-immunisation. Des anticorps anti-BSEP inhibent l'activité de la protéine BSEP nouvellement synthétisée, reconnue comme étrangère par le receveur (173, 174). Les mutations d'*ABCB11* sont responsables d'au moins trois formes cliniques de maladies du foie : la PFIC2 et deux phénotypes moins sévères, la BRIC2 et l'ICP.

1- Les mutations d'*ABCB11*/BSEP identifiées chez les patients

Plus de 200 mutations ont été identifiées tout au long des 27 exons de la séquence du gène *ABCB11* codant BSEP (116). L'hétérogénéité génétique est la caractéristique de ce type d'atteintes pathologiques (175), avec un grand nombre de mutations décrites telles que les faux sens, l'épissage, les non-sens, les insertions/délétions. La majorité des mutations conduisent à des substitutions d'un acide aminé par un autre (mutations faux sens). L'évaluation de l'impact d'un changement d'acide aminé peut être réalisée par des logiciels de prédiction *in silico* (par ex : Polyphen-2). C'est un outil mathématique basé sur des algorithmes permettant de prédire l'impact d'un changement d'acide aminé sur la structure et la fonction d'une protéine donnée. Ces logiciels peuvent donner une première indication, mais apportent peu d'explications sur les impacts réels de la mutation sur la protéine.

De nombreuses mutations identifiées chez ces patients se regroupent dans les deux domaines de liaison à l'ATP (NBD) de BSEP (169) (Figure 18). Ceci est en accord avec la haute conservation de ce domaine entre les différentes espèces (101) et souligne l'importance d'une structure correcte des deux NBDs pour le bon fonctionnement des transporteurs ABC (176).

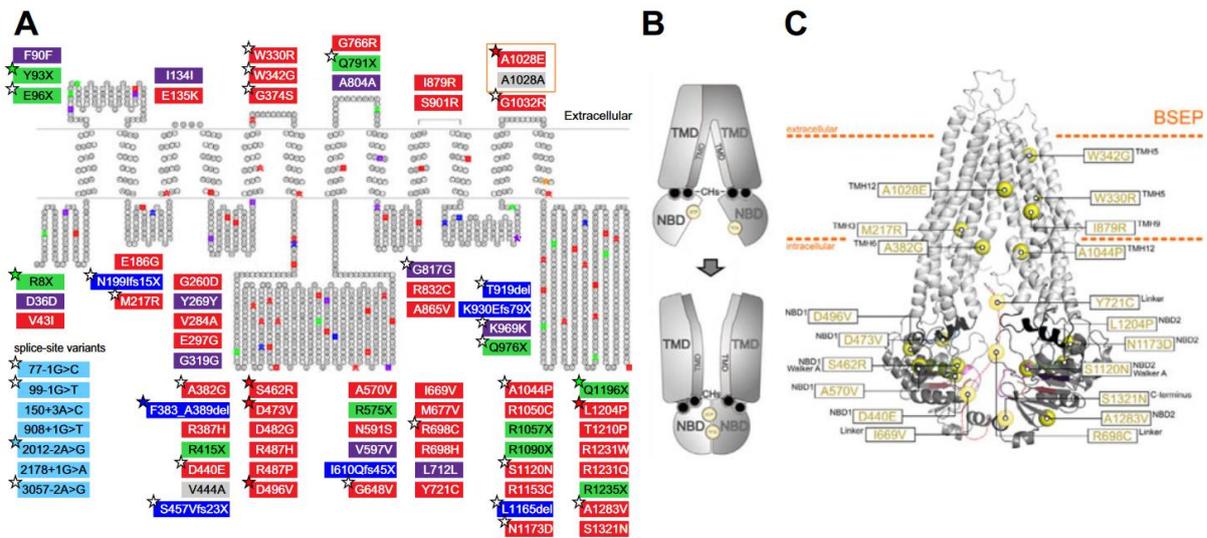


Figure 18 : Illustration 2D et 3D des variants d'ABCB11 identifiés

(A) Modèle de BSEP représenté avec le logiciel TOPO2 dont l'acide aminé muté est représenté par des carrés ou des étoiles colorés. La première position affectée est marquée pour les variants de décalage du cadre de lecture. Rouge : faux sens, vert : non-sens, bleu : suppression/décalage du cadre de lecture, bleu foncé : site d'épissage, gris : polymorphisme, les étoiles mettent en évidence les nouveaux variants. (B) Vue schématique de la fonction de transporteur ABC couplée à l'ATP. TMD, domaine transmembranaire, CH, hélice de couplage, NBD, domaine de liaison aux nucléotides. (C) Mutations faux sens spécifiques dans un modèle 3D de BSEP basé sur la structure de la P-gp. TMH, hélice transmembranaire (174).

A- Mutations et corrélation génotype-phénotype

La corrélation génotype-phénotype est importante et doit être établie pour déterminer quels mutants d'ABCB11 pourraient bénéficier d'une pharmacothérapie ciblée capable de modifier l'épissage, d'induire une translecture de codons stop prématurés, de restaurer un trafic normal et diminuer la dégradation et/ou augmenter l'activité du transporteur. Bien que, la connaissance du génotype d'un individu ne permet pas de prévoir la symptomatologie et l'évolution de la maladie. Cependant, il a été rapporté que certaines mutations de BSEP sont

associées plus fréquemment à une forme particulière de cholestase, suggérant une corrélation possible avec la gravité de la maladie (146, 177). De plus, dans une étude récente portant sur une grande cohorte de patients atteints de PFIC2, suggérait que la gravité de la maladie était corrélée à l'altération du niveau d'expression et de la fonction du mutant BSEP résultant (169, 178).

La forme sévère de la maladie est associée à des mutations bialléliques de type non-sens, les délétions/insertions qui font apparaître un codon-stop prématuré dans la séquence nucléotidique ou un décalage dans le cadre de la lecture. En effet, dans ces cas-là, ces mutations aboutissent à la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle. La protéine n'est généralement pas détectée à l'analyse immunohistochimique. L'absence de BSEP entraîne une accumulation des sels biliaires dans les hépatocytes des patients atteints. Les patients présentant des formes sévères de syndrome de déficit en BSEP sont souvent très jeunes, répondent moins bien aux traitements médicaux et chirurgicaux et courent un risque important de développer un carcinome hépatocellulaire très tôt dans la vie (169, 171). Par conséquent, la survie avec le foie natif après l'âge de 10 ans a été estimée à environ 33% chez les patients atteints de PFIC2 porteurs de deux mutations bialléliques graves (Figure 19) (178). De plus, il a été suggéré que ces patients présentaient un risque plus élevé de développer des anticorps anti-BSEP contre la protéine néosynthétisée (phénomène d'allo-immunisation) après une transplantation hépatique (174).

Les formes moins sévères de la PFIC2 sont souvent associées quant à elle, à des mutations monoalléliques de type faux sens. La gravité de la maladie dépend du résidu touché. En effet, la persistance d'une activité résiduelle de la protéine à la membrane canaliculaire pourrait repousser l'apparition des symptômes et être moins délétère pour le patient. Le statut homozygote (biallélique) ou hétérozygote composite (deux mutations monoalléliques différentes) entre également en considération. Un déficit des gènes des PFIC à l'état

hétérozygote (monoallélique) est responsable de lithiases biliaires, ou de susceptibilité accrue à développer une cholestase pendant la grossesse ou lors de la prise de certains médicaments en particulier les oestroprogestatifs, voire une cholestase néonatale transitoire.

Il existe également plusieurs polymorphismes de BSEP, les plus courants sont V444A et M677V avec une variation considérable entre les différents groupes ethniques. Le polymorphisme V444A est très fréquent, et est associé à une ICP et une cholestase induite par les médicaments, malgré le maintien de l'activité normale de BSEP (179).

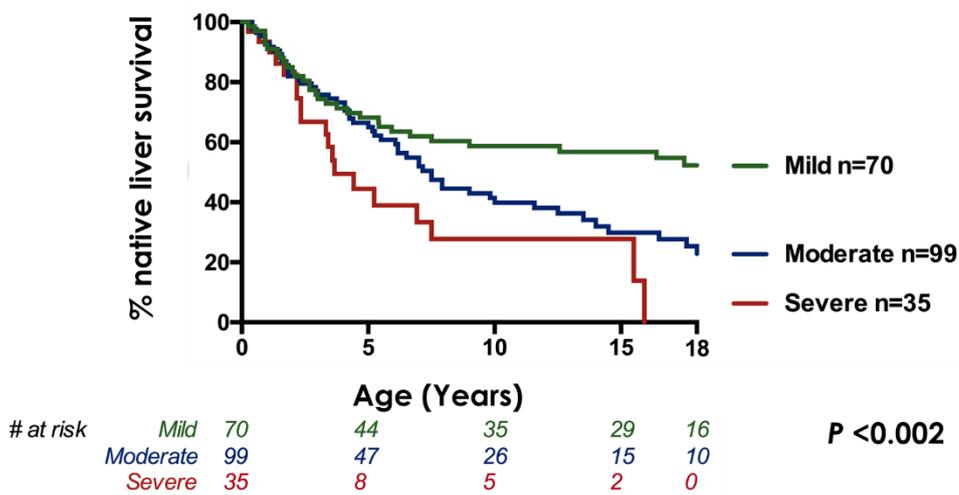


Figure 19 : La survie avec un foie natif est associée avec la sévérité de la mutation (178)

B- Effets des mutations sur le transporteur

Le nombre de mutations affectant *ABCB11*/BSEP ne cesse d'augmenter. Les mutations fréquentes du gène *ABCB11* peuvent être groupées en mutations non-sens, mutations faux sens, délétions, insertions et mutations qui altèrent les sites d'épissage.

Synthèse d'une protéine tronquée : L'apparition d'un codon-stop prématuré (CSP) dans le cas de mutations non-sens ou lors de délétions et d'insertions génère une protéine tronquée le plus souvent non fonctionnelle. Les ARNm porteurs d'un CSP sont sujets à la voie NMD (*Nonsense-mediated RNA decay*), le système de surveillance spécifique des ARNm aberrants,

et sont rapidement dégradés (180). Le phénotype observé dans ce cas, est en général plus sévère du fait de l'absence totale ou partielle de la protéine et donc d'une perte totale de fonction.

Défaut de repliement et de maturation : Dans ce cas, les protéines n'arrivent pas à atteindre une conformation correcte et s'accumulent dans le cytoplasme au niveau du RE puis sont dégradées par le système ERAD. Les mutants BSEP^{R1128C, T1210P et G982R} ont une expression réduite à la membrane plasmique (181). C'est également le cas de la mutation CFTR/ Δ F508 qui n'atteint pas la membrane plasmique (182).

Défaut d'activité : Les mutations produisent un transporteur correctement localisé à la membrane plasmique, mais dont la capacité de transport est réduite. Le mutant BSEP^{T463I} identifiée chez un malade du service d'hépatopédiatrie de l'hôpital Bicetre présente ce défaut. Dans le cas d'*ABCB11*, la mutation p.T463I est par exemple localisée au niveau du NBD1, elle aboutit à une synthèse d'une protéine mature correctement adressée, mais inactive.

Défaut de stabilité : Les mutations affectent la stabilité de la protéine mature, en réduisant sa demi-vie et donc sa présence à la membrane. Le mutant BSEP^{D482G} représente 30% des familles européennes atteintes de PFIC2. Cette mutation entraîne une protéine instable avec une réduction de sa demi-vie d'environ deux tiers par rapport à la protéine sauvage (155).

2- Les approches thérapeutiques ciblant les effets d'un défaut d'*ABCB11*

A- Les thérapies actuelles : l'UDCA et la transplantation hépatique

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif pour les PFIC d'une manière générale. Les méthodes thérapeutiques reposent uniquement sur des traitements asymptomatiques dont le but est d'améliorer la qualité de vie des patients et de freiner l'évolution de la maladie afin que les enfants arrivent à l'âge où ils peuvent supporter une transplantation hépatique. Ces

traitements consistent en l'administration de l'UDCA. L'UDCA est un AB hydroxylé (acide 3a, 7b-dihydroxy-5b-cholanique) isomère du CDCA, qui est normalement présent dans la bile humaine à l'état de trace (1 à 3% des ABs totaux). Il représente l'AB majeur de la bile d'ours noirs et a été utilisé pendant des siècles dans la médecine traditionnelle chinoise comme remède pour les maladies du foie. Il a été le premier traitement chez les patients atteints de cirrhose biliaire primitive (183). Il est également, utilisé dans le traitement de la cholangite sclérosante primitive, les hépatites chroniques ainsi que pour traiter les effets hépatiques liés à la mucoviscidose. Il a été suggéré dans d'autres maladies cholestatiques chroniques (184). C'est un AB peu toxique du fait de son caractère hydrophile. Il permet une meilleure hydroxylation des ABs et facilite leur élimination urinaire. Le traitement par l'UDCA modifie la composition de la bile en AB en la rendant moins hydrophobe. De fait, cela diminue la proportion d'ABs hépatotoxiques : CDCA, CA et DCA et donc réduit la toxicité potentielle de la bile qui peut aggraver les lésions hépatiques. Il présente une activité anti-apoptotique (apoptose induite par les ABs toxiques), immunomodulatrice et anti-inflammatoire. Il stimule la sécrétion biliaire par la régulation des transporteurs hépatiques présents à la membrane apicale y compris Mrp2 et Bsep. Le traitement par l'UDCA doit être envisagé dans la prise en charge thérapeutique initiale des enfants avec tous les types de PFIC. La meilleure réponse au traitement par l'UDCA est obtenue chez certains patients, en particulier ceux atteints de PFIC3 avec des mutations faux sens et qui ont une maladie moins grave que les patients avec une mutation conduisant à une protéine tronquée. La majorité des patients ayant le syndrome LPAC dû à des mutations faux sens répondent de façon très satisfaisante à l'administration d'UDCA à des doses de l'ordre de 8 mg/kg/jour (158).

Lorsque la thérapie par l'UDCA ainsi que la dérivation biliaire s'avèrent inefficaces, la transplantation hépatique reste la seule alternative pour ces patients. Cependant cette option thérapeutique présente des risques immédiats, mais également à plus long terme, avec les

risques de rejet du greffon, les effets indésirables des immunosuppresseurs, ainsi qu'une allo-immunisation contre la protéine BSEP nouvellement synthétisée par des anticorps anti-BSEP (174).

B- La pharmacothérapie ciblée

Les options thérapeutiques pour les maladies cholestatiques sont rares et les options de traitement sont limitées. Considérant que la transplantation hépatique est la seule thérapie efficace à long terme pour les patients atteints de PFIC2, de nombreux efforts ont été déployés pour identifier des composés qui pouvant offrir une nouvelle alternative médicale. Le rétablissement de l'expression partielle d'une protéine fonctionnelle pourrait suffire à retarder ou à éviter la transplantation hépatique. La figure 20 résume les différentes stratégies de pharmacothérapie ciblée qui peuvent être envisagées selon le déficit fonctionnel observé.

Comprendre les effets de certaines mutations d'*ABCB11* au niveau protéique et tester *in vitro* des molécules spécifiques à chaque type de mutation, relèverait de la médecine personnalisée et peut être plus efficace pour les patients atteints de PFIC2.

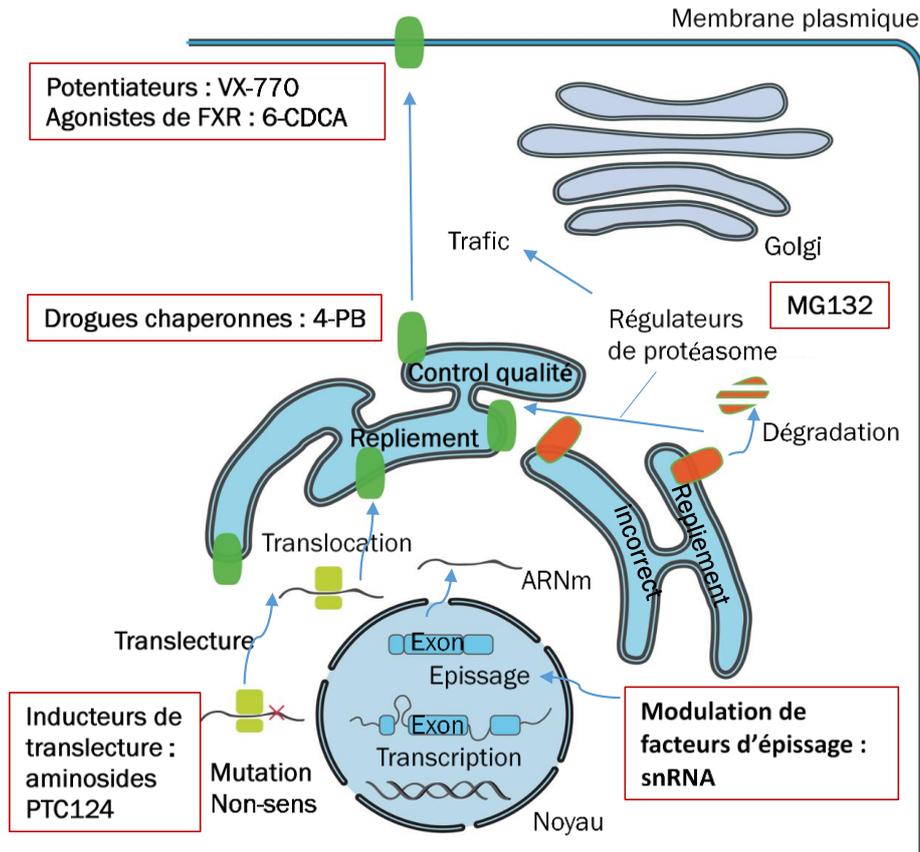


Figure 20 : La pharmacothérapie ciblée de la PFIC2

Différents types de mutations sont responsables de la PFIC2. Différentes approches pourraient être utilisées pour permettre une expression suffisante d'une protéine fonctionnelle au niveau de la membrane canaliculaire. Pour les mutations altérant les sites d'épissage, une modulation des facteurs d'épissage (utilisation de snRNA) pourrait aboutir à la restauration d'un épissage normal. Les mutations non-sens conduisent à la formation d'une protéine tronquée. Des composés tels que les aminosides et le PTC124 pourraient potentiellement induire la translecture du codon-stop prématuré et la synthèse d'une protéine entière et fonctionnelle. Les mutations faux sens sont responsables d'un défaut de trafic. Les protéines mal repliées sont reconnues par le système de dégradation associé au RE (ERAD). Des correcteurs tels que les drogues chaperonnes (par ex. 4-PB, SAHA) ainsi que les composés qui inhibent ou modulent le système du protéasome (régulateurs du protéasome) peuvent partiellement restaurer le trafic à la surface de la cellule. L'augmentation de la transcription génique par les agonistes des récepteurs nucléaires (FXR) (par exemple 6-ECDC, fibrates et statines) suivi de l'utilisation de molécules potentiatrices (par exemple VX-770) augmenterait la fonction de la protéine. Adaptée d'après Van der Woerd, 2017 (185).

a- Cibler les récepteurs nucléaires

FXR est impliqué dans la régulation de nombreux processus, raison pour laquelle il fait l'objet d'une cible thérapeutique intéressante dans diverses maladies métaboliques et dans les cholestases. En effet, de nombreux médicaments ont été développés qui ciblent FXR ou TGR5 (récepteur des ABs). Ces médicaments stimulent les effets régulateurs de la signalisation des sels biliaries dans le métabolisme au-delà de leur rôle physiologique et font actuellement l'objet d'une évaluation d'efficacité clinique. L'utilisation d'agonistes de FXR, les mimétiques du FGF19 et de composés qui interrompent le cycle entérohépatique des sels biliaries constituent une nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter ces maladies. Au niveau transcriptionnel, l'expression d'*ABCB11/BSEP* est fortement régulée par le récepteur nucléaire FXR. L'agoniste physiologique de FXR est le CDCA. L'activation de FXR par des agonistes synthétiques tels que les GW4064 et l'acide obéticholique (OCA, également appelé INT-747 ou 6-ECDCA) réduira la charge de sels biliaries sur les hépatocytes en limitant l'expression des récepteurs d'absorption des sels biliaries (inhibition de NTCP), en réduisant la synthèse des sels biliaries (inhibition de la synthèse de la 7α -hydroxylase) et en stimulant la sécrétion des sels biliaries (activation de la synthèse d'*ABCB11/BSEP*) ainsi qu'une stimulation de la sécrétion des phospholipides (activation de la synthèse d'*ABCB4*) (186, 187). Ces molécules ont permis de réduire efficacement les lésions dues à la cholestase.

Le NGM282 (anciennement appelé M70) est un des mimétiques de FGF19. Il a été conçu afin d'affecter de manière sélective la synthèse des sels biliaries sans stimuler la prolifération des hépatocytes. Il a été démontré que le NGM282 empêchait les lésions hépatiques statiques dans un modèle murin de cholestase (188).

b- Les « supprimeurs » de codons stop

Les mutations non-sens se traduisent par l'apparition d'un codon-stop prématuré (CSP) dans la séquence codante du gène. Dans ce type de mutation, la protéine est absente : son ARNm est rapidement dégradé par la voie NMD. Lorsqu'elle est toutefois produite, la protéine est tronquée et, est le plus souvent instable et non fonctionnelle. Les maladies génétiques humaines liées à l'apparition d'une mutation non-sens dans la phase codante d'un gène représentent 10% à 30% de ces maladies (189).

La nécessité de développer des stratégies thérapeutiques de suppression des CSP représente donc un enjeu important. L'une d'entre elles est d'exploiter le phénomène de translecture avec l'utilisation de molécules favorisant le saut du codon-stop prématuré afin de réexprimer une protéine entière et fonctionnelle. Les premières pathologies génétiques à avoir fait l'objet d'essais de suppression traductionnelle de CSP due à des mutations non-sens dans un but thérapeutique sont la mucoviscidose et la myopathie de Duchenne. Cette stratégie s'est étendue, depuis, à plusieurs autres maladies à CSP.

❖ Mécanisme de translecture

La traduction comprend trois étapes (l'initiation, l'élongation et la terminaison) et correspond à la synthèse des protéines par le ribosome. La terminaison de la traduction a lieu lorsqu'un des codons stop (UAA, UAG ou UGA) entre au niveau du site A du ribosome. À ce niveau, il est reconnu préférentiellement par les facteurs de terminaison (eRF1 et eRF3). Le polypeptide est alors libéré et le ribosome se dissocie. Il existe toutefois la possibilité que le codon-stop soit reconnu par un ARNt dit « proche cognat » (c'est à dire qui présente 2 appariements sur 3 avec le codon), qui entre en « compétition » avec les facteurs de terminaison. Des études récentes indiquent que l'interaction entre CSP et un anticodon d'ARNt proche

cognat se produit en cas de mauvais appariement en position 3 ou 1 du codon-stop (190). L'interaction de l'ARNt proche cognat avec le CSP au niveau du site A du ribosome permet le transfert de l'acide aminé et son incorporation dans la chaîne polypeptidique. Ceci induit une poursuite de la synthèse protéique dans le même cadre de lecture jusqu'au prochain codon-stop naturel : c'est le phénomène de translecture spontanée (Figure 21).

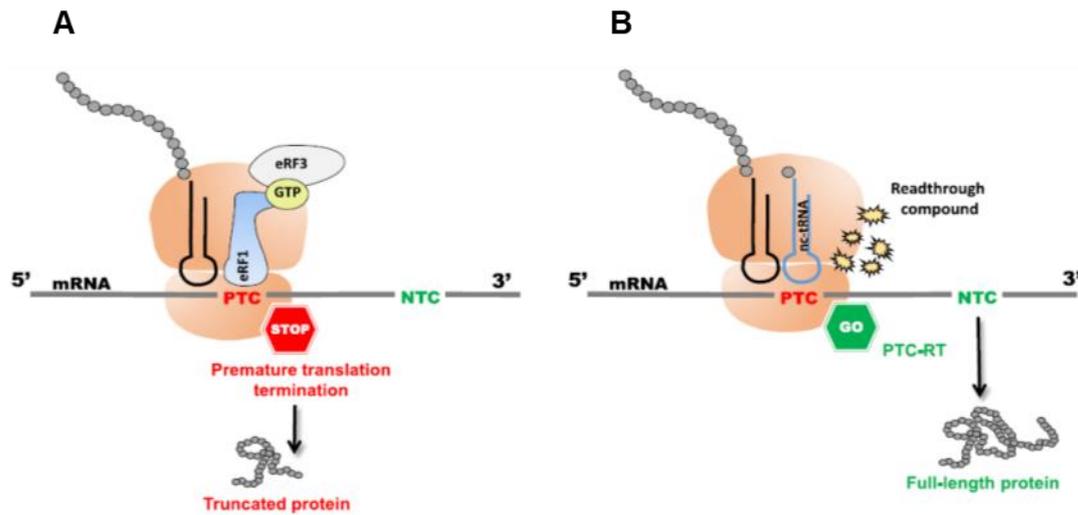


Figure 21 : Terminaison de la traduction et processus de la translecture du CSP

(A) Lorsque le ribosome rencontre un CSP, le site est reconnu par la machinerie de fin de traduction et l'élongation du polypeptide est terminée prématurément. (B) Après l'ajout des inducteurs de translecture, la machinerie traductionnelle décode le CSP (reconnu par les ARNt proche cognat) et la traduction se poursuit jusqu'au codon de terminaison normal. Cela permet de traduire une protéine complète. PTC : codon-stop prématuré (CSP), NTC : codon-stop naturel (191).

Il existe plusieurs facteurs influençant la translecture : la nature du codon stop, le contexte nucléotidique entourant le codon stop, notamment, le nucléotide en position N+4 (nucléotide situé juste après le codon stop) et les molécules ciblant le ribosome (Figure 22). Ainsi, une translecture spontanée est plus fréquente dans le cas d'un codon-stop UGA que d'un codon UAG ou UAA (192-195) et dans le cas où le nucléotide en position N-1 est un uracile et en N+4 une cytosine (C>U>A>G) (195-198).

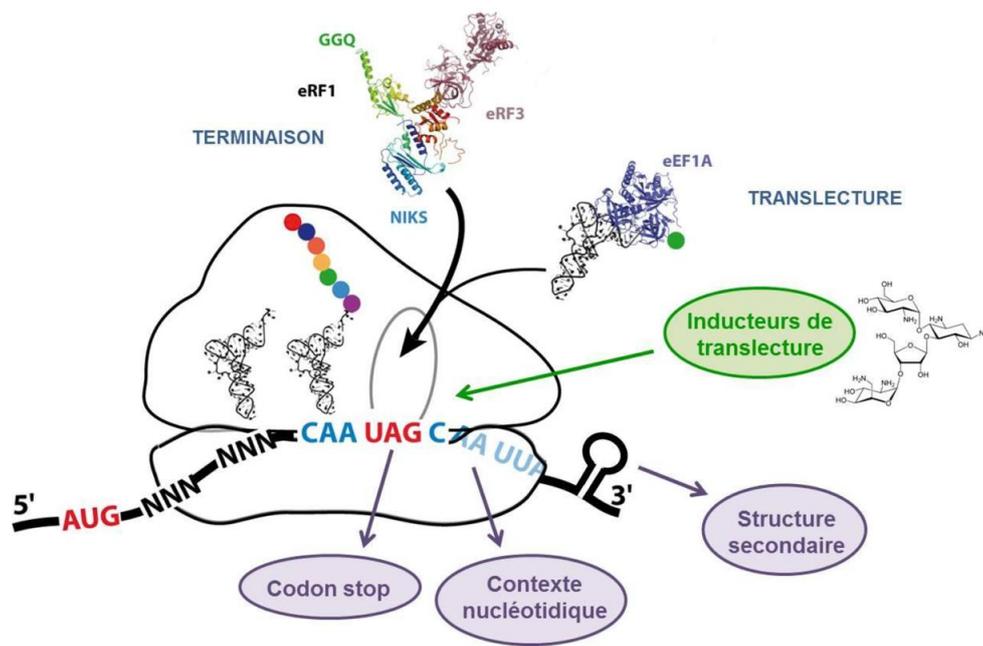


Figure 22 : Les facteurs modulant la fidélité de la terminaison de la traduction

La compétition entre terminaison et translecture peut être modulée par des facteurs agissant en cis ou en trans. Les facteurs cis (en violet) présents sur l'ARNm sont la nature du codon stop, son contexte nucléotidique ou encore la présence d'une structure secondaire de type tige-boucle. Parmi les facteurs trans (en vert), les molécules inductrices de translecture telles que les aminoglycosides peuvent impacter l'efficacité de la terminaison. Le codon-stop (en rouge) et le contexte nucléotidique (en bleu) sont sur l'ARNm (199).

Il a été estimé que la translecture spontanée est très faible pour les codons stop normaux (elle est de l'ordre de 0.01 à 0.1%), mais peut aller de 0.1 à 1% dans le cas de CSP (192, 197, 200). Actuellement, les chercheurs sont incapables d'expliquer cette différence. Une des hypothèses qui a été émise est que la terminaison de la traduction pour qu'elle soit efficace, nécessite un contact étroit entre les facteurs de libération interagissant avec le codon-stop naturel et la *poly(A)-binding protein* (PABP) (201, 202). La présence d'un CSP dans un transcrit, généralement plus éloigné du 3'UTR, pourrait limiter l'interaction entre les eRFs et les PABP, conduisant à une action de moindre efficacité des eRF3.(203). La présence prolongée

de la machinerie traductionnelle au CSP augmenterait la sensibilité de la translecture basale du CSP (204).

De plus, la voie NMD intervient dans l'efficacité de la translecture. Il s'agit de la voie de dégradation spécifique des ARNm aberrants (contenant un CSP) permettant ainsi d'éviter l'accumulation de protéines tronquées non fonctionnelles. D'un individu à un autre, l'efficacité de cette voie peut varier (205). Ces différences modulent la sévérité clinique de nombreuses maladies à codon-stop (206), en modifiant probablement l'abondance des transcrits aberrants et donc le niveau de protéines tronquées et de protéines complètes issues de la translecture basale de ces transcrits (Figure 23).

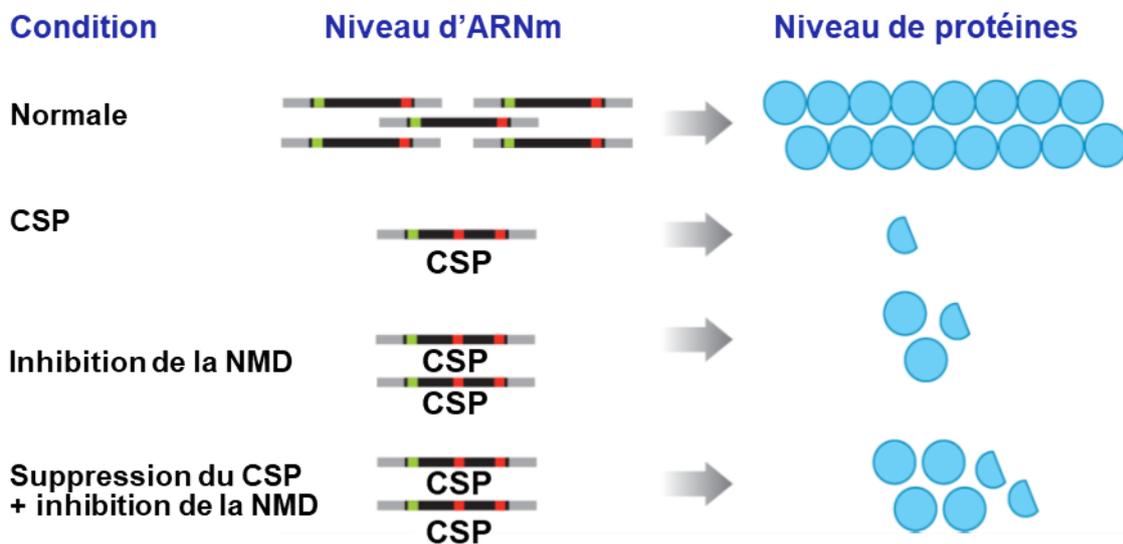


Figure 23 : Inhibition de la voie NMD

La voie NMD est une voie de surveillance qui reconnaît et dégrade les ARNm aberrants, dont ceux qui contiennent un CSP. La présence d'un CSP dans la phase codante conduit à la dégradation de l'ARNm par la voie NMD, le niveau de protéines synthétisées est donc faible. Les inhibiteurs de la NMD comme le NMDI1 permettent d'augmenter le niveau d'ARNm et donc de protéines. Cette stratégie thérapeutique est souvent associée à la suppression du CSP pour augmenter le niveau de protéines entières réexprimées. CSP: codon-stop prématuré (207).

En outre, cette variabilité influence également l'efficacité de la thérapie de suppression de CSPs. Les patients qui expriment des niveaux plus élevés d'ARNm contenant un CSP, du fait d'une moins bonne efficacité de la voie NMD, répondent mieux à ce type de thérapies (208). D'un point de vue thérapeutique, si l'ARNm porteur d'un CSP est la cible du NMD, l'utilisation de ces molécules permet à la fois d'induire la translecture des CSPs et de stabiliser les transcrits et donc de produire davantage de protéines, ce qui est particulièrement bénéfique pour le patient. Il serait également possible d'utiliser des inhibiteurs de la NMD comme le NMDI1 et le NMDI14 qui potentialiseraient l'effet des inducteurs de translecture et augmenteraient la synthèse de protéines complètes.

❖ **Molécules inductrices de translecture**

Certaines molécules de petite masse moléculaire peuvent affecter la fidélité de la traduction. C'est le cas des antibiotiques de la famille des aminoglycosides dont l'activité antibactérienne est liée à une grave perturbation de la synthèse protéique. La fixation des aminoglycosides au niveau du ribosome bactérien inhibe la synthèse protéique en diminuant fortement la fidélité du processus de traduction et en favorisant le phénomène de translecture. Ceci entraîne secondairement une accumulation de protéines aberrantes issues d'erreurs de traduction (209, 210). Il semble que les aminoglycosides exercent une action globalement similaire sur le ribosome eucaryote, mais avec une affinité moindre permettant de les envisager comme un moyen thérapeutique dans le cadre des CSPs. Il existe toutefois un risque théorique de perturbation de la synthèse protéique chez l'homme et de translecture de codons stop normaux, mais il n'a pas été rapporté que ce phénomène soit à l'origine de la toxicité des aminoglycosides, qui passerait plutôt par la formation de radicaux libres délétères pour la cellule (211). De nombreuses études concernant la capacité des aminoglycosides à stimuler la translecture ont été publiées. Il s'agit d'études *in vitro* et *in vivo* ciblant des déficits génétiques

variés : la myopathie de Duchenne (DMD), la mucoviscidose, les maladies héréditaires métaboliques, ainsi que certains cancers (mutations du gène p53). La première étude *in vivo* démonstrative de l'effet thérapeutique des aminoglycosides a été établie chez la souris Mdx^{-/-}, le modèle animal de la DMD. Le traitement par la gentamicine restaurait 10 à 20% du taux normal de la dystrophine dans les muscles squelettiques (212). Depuis, les aminoglycosides ont fait l'objet de plusieurs essais cliniques (mucoviscidose et DMD) (208, 213-215).

Compte tenu de l'influence du contexte nucléotidique sur la translecture, pour un même gène les différentes mutations existantes ne répondent pas de façon équivalente à ces molécules. Leur spectre d'action est donc étroit. De plus, le développement de cette stratégie *in vivo* se heurte au problème de la toxicité des aminoglycosides, incompatible avec un usage à long terme. Ceci a motivé la recherche de nouveaux composés translecteurs, par cribles de chimiothèque à grande échelle. Cette étude a permis d'isoler, parmi plus de 800 000 cribles, l'acide 3-[5-(2-fluorophényl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl]-benzoïque, connu sous le nom du PTC124 (Ataluren®), qui n'a aucune similarité structurale avec les aminoglycosides (Figure 24), mais possède un fort potentiel inducteur de translecture (216). Certaines publications ont rapporté sa capacité à induire *in vitro* et *in vivo* une translecture de CSPs (216-219). Le PTC124 est bien toléré et les doses efficaces sont bien inférieures à celles utilisées pour la gentamicine (216). Malgré les études intensives, le mécanisme d'action exact du PTC124 reste inconnu. La modélisation informatique suggère que les ARNm contenant un CSP forment des complexes stables avec le PTC124, qui peuvent interférer avec le facteur de terminaison de traduction eRF1 et induisent la suppression de la terminaison de la traduction. Cependant, cette interaction s'est avérée être stable uniquement pour le codon UGA (220). Une étude récente indiquait que le PTC124 se fixait de manière sélective sur le site A du ribosome et qu'il favorisait l'insertion d'ARNt-proche cognat sur le CSP (221).

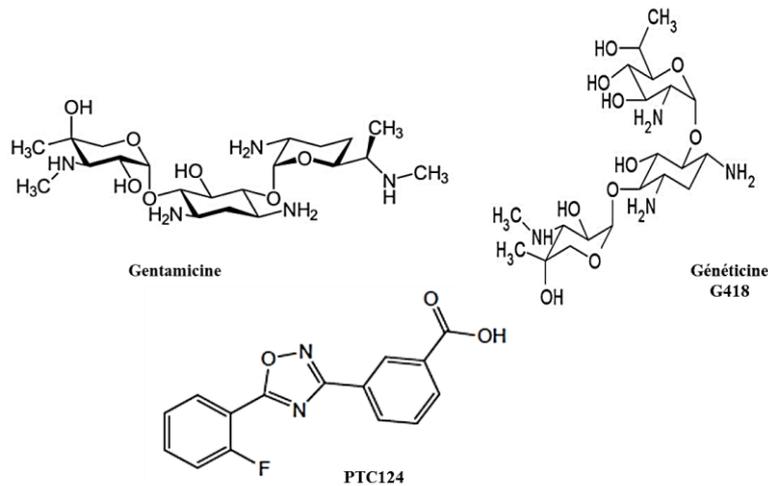


Figure 24 : Structure de la Généticine, gentamicine et du PTC124

❖ Nature de l'acide aminé incorporé

La thérapie de suppression de CSP par des inducteurs de translecture dans les maladies génétiques à codon-stop ne conduit pas systématiquement à un bénéfice thérapeutique. D'autres paramètres, autres que l'efficacité de translecture et la toxicité des molécules utilisées doivent être considérés. Tout d'abord, il est nécessaire d'avoir un ARNm en quantité suffisante afin d'atteindre un niveau suffisant de protéine complète. Ces protéines doivent être fonctionnelles, ce qui implique que l'acide aminé incorporé doit être compatible avec l'activité de la protéine et que la protéine complète réexprimée, soit correctement repliée et adressée au bon endroit dans la cellule. En effet, lors de la translecture, l'acide aminé qui est incorporé peut-être différent de celui de la protéine sauvage, aboutissant à la synthèse d'une protéine potentiellement non fonctionnelle. Cette dernière pourrait avoir en plus, des propriétés biochimiques différentes et une stabilité variable. L'acide aminé incorporé pendant le décodage de CSP peut être prédit à partir des anticodons d'ARNt proche cognat (222). Il existe plusieurs ARNt proche cognat qui peuvent reconnaître les trois codons de terminaison de la traduction, et leur intervention dans le processus traductionnel lié à la translecture ne semble pas être aléatoire. Selon plusieurs études, principalement dans les ARNm de virus et de levure, l'UGA

est le plus souvent décodé en tryptophane (W), mais il peut également être décodé par l'ARNt de la cystéine (C) ou de l'arginine (R) (223, 224). L'UAA est décodé en tant que glutamine (Gln) (223) et l'UAG peut être décodé soit en glutamine, tryptophane (223, 225), tyrosine (Tyr) ou lysine (Lys) (226). Des études récentes utilisant une nouvelle approche basée sur la spectrométrie de masse ont confirmé que le codon UGA est décodé en tryptophane, cystéine ou arginine, mais les deux autres types de codon-stop : UAA et UAG peuvent être décodés en tant que glutamine, tyrosine ou lysine (190, 227-229). En outre, il a été suggéré que la séquence entourant le codon-stop n'avait aucun impact sur l'identité ou la proportion des acides aminés incorporés au cours du processus de la translecture (227, 229).

c- Les correcteurs

Les mutations faux sens se traduisent par un changement d'un acide aminé, générant le plus souvent une rétention de la protéine sous forme immature dans le RE, entraînant sa dégradation prématurée par le protéasome. Il existe deux types de mutations faux sens : les mutations responsables d'un défaut d'adressage (la protéine est synthétisée, mais reste coincée dans le RE) et les mutations faux sens correctement adressées, mais non fonctionnelles. L'exemple le plus étudié est le mutant CFTR/ Δ F508, mutation la plus fréquente du gène CFTR responsable de la mucoviscidose. Cette mutation est responsable d'une production d'une protéine mal adressée à la membrane possédant une faible activité et étant retenue dans le cytoplasme. Diverses études ont été menées dans le but de découvrir des molécules capables de restaurer l'adressage du mutant CFTR/ Δ F508. Ces molécules en question sont appelées correcteurs. Il existe trois types de correcteurs : les chaperones chimiques, les chaperones pharmacologiques et les molécules modulant les chaperones cellulaires en modifiant leurs niveaux d'expression ou leurs capacités d'interaction avec la protéine déficiente.

❖ **Les chaperones chimiques**

Comme pour le CFTR, des études visant à restaurer l'expression à la surface cellulaire des protéines mal repliées et retenues dans le RE des autres transporteurs ABC ont débuté par l'utilisation de chaperones chimiques. Ce sont des molécules non spécifiques qui miment les effets des chaperones moléculaires cellulaires. Parmi ces chaperones chimiques on peut citer le glycérol, le polyéthylène glycol, le diméthylsulfoxyde (DMSO), la taurine et la bétaine. Ces composés pourraient agir par différents mécanismes pendant la biosynthèse de la protéine mutée dans le RE : ils peuvent interagir directement avec le mutant, ce qui diminue sa dégradation et augmente son taux de repliement ; ou interagir alternativement avec les chaperones endogènes résidant dans le RE ayant un effet stimulant indirect sur la synthèse des protéines (230). Dans ce contexte, les traitements avec le glycérol, le DMSO ou le polyéthylène glycol aboutissent à une augmentation partielle, mais significative de l'expression de la forme mature des mutants mal repliés d'*ABCB1/MDR1/P-gp* (231), *ABCB11/BSEP* (150, 177), *ABCC4/MRP4* (232) et *ABCC8/SUR1* (233).

Du fait de leur aspécificité, de la modification du niveau d'expression d'autres protéines (230) et de la nécessité d'utilisation de fortes doses pour exercer leur action, ces composés ne peuvent pas être utilisés comme médicament.

❖ **Les chaperones pharmacologiques**

Appelées également pharmacochaperones, elles sont décrites comme étant des petites molécules qui se lient spécifiquement aux protéines cibles, et induisent un repliement et trafic correct (234). Pour aboutir à une protéine correctement repliée, l'utilisation de ligands qui agiraient de façon ciblée en tant que chaperones pharmacologiques serait un traitement potentiel pour ce genre de mutations. Cette approche a déjà démontré des résultats prometteurs avec les

mutants d'*ABCB1* retenus dans le RE. Ainsi, la vinblastine, la capsaïcine, le nonylphénoléthoxylate, le tariquidar, le nilotinib, la valinomycine et le paclitaxel ont tous été efficaces pour corriger la localisation de ces mutants d'*ABCB1* de manière dose dépendante et par conséquent l'expression d'une protéine fonctionnelle à la surface de la cellule (235-237). En revanche, lorsque des expériences ont été effectuées avec des molécules qui ne sont pas des substrats ou des modulateurs d'*ABCB1* telles que la cisplatine ou la camptothécine, le vérapamil ou encore la cyclosporine A, l'adressage de ces mutants retenus dans le RE à la membrane plasmique n'a pas été corrigé (236). Il existe également une autre stratégie qui consiste à repositionner les médicaments et à trouver de nouvelles applications aux médicaments déjà disponibles et approuvés par la FDA. C'est notamment le cas du 4-phénylbutyrate ou le phénylbutyrate de sodium (4-PB). Le 4-PB est un acide gras aromatique utilisé comme agent thérapeutique depuis 1975 lorsque Brossmer et ses collègues ont rapporté son rôle dans l'inhibition d'agrégation plaquettaire (238, 239). Ensuite, la FDA a approuvé cette molécule, bien tolérée, pour des applications en clinique dans les troubles du cycle de l'urée et la β -thalassémie (240-242). Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans les actions thérapeutiques du 4-PB ne soient toujours pas complètement compris, plusieurs évidences suggèrent que ce composé agit via des modes d'action non exclusifs. Il possède une activité chaperone et régule la transcription de chaperones endogènes. Il possède des propriétés d'élimination de l'ammoniac, inhibe les histones désacétylases et le stress du RE (239, 243, 244). Son action bénéfique a été observée dans diverses pathologies neurodégénératives hémoglobinopathies, ischémie et certains cancers (245, 246). Il a été montré que le traitement par le 4-PB restaurait, au moins partiellement, l'expression du mutant CFTR/ Δ F508 à la surface des cellules et le transport du chlorure (247, 248). Chez les patients porteurs de cette mutation, l'administration du 4-PB augmentait le transport de chlorure dans l'épithélium nasal (249). Il a également été rapporté que le 4-PB augmentait l'expression des mutants faux sens d'*ABCB11*

(E297G and D482G) à la membrane canaliculaire et la capacité de sécrétion d'ABs *in vitro* (140, 250) et chez les patients atteints de PFIC2. En effet, la thérapie chaperone avec le 4-PB était bénéfique lors du traitement de 4 enfants atteints de PFIC2 porteurs d'au moins une mutation faux sens (p.A257V, p.G982R, p.R1128C et p.T1210P) (181). Dans cette étude réalisée par notre équipe, il a été montré *in vitro*, que le 4-PB augmente l'expression canaliculaire de ces mutants faux sens lorsqu'ils sont introduits dans la lignée hépatocellulaire Can 10. Chez les patients traités par le 4-PB, une amélioration des paramètres biologiques de la cholestase et de la fonction hépatique est obtenue, en raison de la correction partielle du ciblage canaliculaire des mutants de BSEP, ce qui entraîne une augmentation de la sécrétion d'ABs accompagnée d'une amélioration clinique des patients (181, 251, 252). Les effets bénéfiques du traitement par le 4-PB ont également été rapportés chez des patients atteints de BRIC2 et PFIC1, porteurs de mutations responsables de la rétention des protéines FIC1 et BSEP dans le RE (253, 254).

Le criblage à grande échelle a permis d'identifier diverses petites molécules plus efficaces qui corrigent le défaut de repliement sans bloquer la fonction des protéines. Des résultats ont ainsi été obtenus pour le mutant CFTR/ Δ F508 où plusieurs correcteurs potentiels ont été identifiés. Le VX-809/Lumacaftor, criblé par *Vertex Pharmaceuticals*, a été testé au cours d'essais cliniques. Malheureusement, administré seul, le VX-809 n'entraîne aucune amélioration clinique significative chez les patients (255), bien que la combinaison avec le potentiateur VX-770 (Ivacaftor) n'entraîne qu'une faible amélioration clinique, mais qui est significative chez les patients (256). Cette combinaison est actuellement, approuvée par la FDA et l'EMA et est commercialisée sous le nom d'Orkambi®. Elle est uniquement indiquée pour les patients de plus de 12 ans, homozygotes pour la mutation CFTR/ Δ F508 (<http://www.vrtx.com/our-medicines/our-approved-medicines>).

Le VX-325, le VX-422 (dérivés de quinolizinium) et le Corr 4a, sont d'autres correcteurs criblés par Vertex, prédits pour agir à la fois sur les mutants CFTR et les protéines structurellement similaires (257).

❖ **La modulation des chaperones moléculaires**

Les chaperones moléculaires sont définies comme étant des protéines qui aident au repliement ou à l'assemblage d'autres protéines, mais ne sont pas présentes dans la protéine fonctionnelle finale. Elles interviennent pour empêcher l'agrégation de protéines intermédiaires ou de protéines non repliées et faciliter le repliement de protéines mal repliées. Pour cela, moduler l'expression de ces chaperones a été une stratégie très intéressante dans le cas de mutants présentant des défauts conformationnels. L'une des chaperones cellulaires jouant un rôle crucial dans la dégradation de ce type de mutants est la chaperone HSC70. Le 4-PB est un inhibiteur des histones désacétylases, qui active la transcription d'une variété de gènes importants dans la régulation de la prolifération et le développement des cellules *via* diverses voies de signalisation (258). Des études *in vitro* ont montré que la 4-PB, en régulant négativement la HSC70 (en diminuant son expression *via* la diminution de la stabilité de son ARNm), induisait le trafic du mutant CFTR/ Δ F508 vers la membrane plasmique avec la restauration de l'activité du canal CFTR (247, 248). Le 4-PB augmente également l'expression membranaire de certains mutants d'*ABCB11/BSEP*, en stabilisant la forme mature, en stimulant le trafic à la membrane et en inhibant le processus d'internalisation (en promouvant le recyclage) à la surface cellulaire et leur dégradation ultérieure, afin de conserver une activité normale de transport (140, 250). Les essais cliniques chez les patients atteints de PFIC2, montrent une efficacité de cette molécule à améliorer les paramètres biologiques et cliniques avec une diminution de la cholestase chez ces patients (181, 251, 252).

Les inhibiteurs des pompes à calcium du réticulum (SERCA/*Sarco-Endoplasmic Reticulum* Ca^{2+} -ATPase) telles que la curcumine et la thapsigargine permettent de réduire les quantités de calcium dans le RE, ce qui permet d'inhiber l'action des chaperones calcium dépendantes comme la calnexine ou la calréticuline. Certaines études effectuées sur le mutant CFTR/ Δ F508 en présence de ces composés ont montré une relative efficacité pour provoquer sa maturation malgré des résultats contradictoires (259, 260). Le miglustat (ou N-ButylDeoxyNoJirimycin, NB-DNJ), inhibiteur de la α -1,2-glucosidase 5 qui est une enzyme de déglycosylation impliquée dans les interactions avec la calnexine, a également montré sa capacité à sauver partiellement la maturation, le trafic et la fonction du mutant CFTR/ Δ F508 (261).

d- Les potentiateurs

La stratégie d'utilisation de molécules potentiatrices dans le cas de mutations faux sens correctement adressées mais non fonctionnelles, est très prometteuse pour corriger ce type de défaut. Le criblage à grande échelle réalisé par Vertex a permis d'identifier l'Ivacaftor (VX-770) commercialisé sous le nom de Kalydeco[®]. C'est un composé qui a été cliniquement approuvé pour le traitement de mutations de classe III de CFTR localisées dans les domaines NBD tel que la G551D. Les potentiateurs ne peuvent fonctionner que si le CFTR est déjà présent à la membrane cellulaire, ainsi ils augmentent la probabilité d'ouverture du canal CFTR (262). Le VX-770 est donc, un potentiateur qui améliore l'ouverture du canal des mutants CFTR présentant des défauts de conductance (263, 264). Il a été récemment montré *in vitro*, que le VX-770 était capable d'augmenter la sécrétion des PC chez les mutants *ABCB4*/MDR3 également localisés dans les domaines NBDs (265). Cependant, les mutations CFTR susceptibles de bénéficier du VX-770 représentent environ 8 à 10% de la population totale de patients. La caractérisation d'autres molécules potentiatrices présentant une efficacité et une sécurité améliorées pourrait apporter un avantage supplémentaire à celles fournies par le VX-770. C'est notamment le cas de deux molécules : GLPG1837 et GLPG2451 qui ont été

identifiées récemment (266). Ces deux molécules sont capables de potentialiser le mutant CFTR/ Δ F508. Les effets pharmacologiques mesurés se sont avérés bien corrélés avec les résultats des tests plus pertinents sur le plan physiologique utilisant des cellules primaires dérivées des patients (267).

Des combinaisons thérapeutiques contenant VX-770 et VX-809 ou VX-661 (Orkambi® et Symdeko®, respectivement), ont été utilisées pour le traitement de patients homozygotes pour la mutation CFTR/ Δ F508. Ces combinaisons ne montrent qu'un bénéfice mineur pour les patients (256).

Ainsi, il existe une demande forte d'identification et de développement de nouveaux correcteurs et potentiateurs ou de combinaisons plus puissantes de modulateurs CFTR pour un traitement plus efficace des patients atteints de mucoviscidose. Ceci pourrait se transposer d'autres maladies présentant ce genre de défaut.

Le tableau 3 résume les différentes molécules qui peuvent être utilisées comme thérapeutiques pour restaurer l'expression d'une protéine entière fonctionnelle correctement adressée au canalicule biliaire.

Tableau 3: Synthèse des molécules qui peuvent être utilisées en pharmacothérapie ciblée de la PFIC2

<i>Type de mutation</i>	<i>Défaut</i>	<i>Stratégie</i>	<i>Molécules</i>	<i>Mode d'action</i>	<i>Références</i>
Non-sens	Protéine troquée	Translecture	Aminoglycosides et dérivés (NB124) PTC124 Clitocine Escine	Saut du codon-stop prématuré et synthèse d'une protéine entière fonctionnelle	(208, 212-215) (291, 292) (216-219) (294) (297)
Faux sens	Trafic/adressage	Chaperone	4-PB, UDCA, SAHA Glycérol Correcteurs de CFTR Inhibiteurs du protéasome (MG132)	Rétablissement d'un trafic normal et correction d'adressage	(140, 181, 247-253) (308-310) (150, 177, 231-233)
Faux sens	Activité	Potentiatrice	VX-770 GLPG1837, GLPG2451 Agonistes des récepteurs nucléaires (CDCA, OCA, fibrates, statines)	Augmentation de l'activité d'une protéine correctement adressée	(263, 265) (266) (186, 187)

C- Autres thérapies alternatives

a- La transplantation d'hépatocytes

La transplantation hépatique est souvent l'option ultime pour les patients développant une cholestase sévère. Les enfants atteints de PFIC2 ont généralement un mauvais pronostic en raison du nombre limité de donneurs de foie et du risque élevé associé à la transplantation à un jeune âge. La transplantation d'hépatocytes pourrait être une thérapie alternative permettant d'utiliser efficacement le tissu du donneur de manière moins invasive. La thérapie cellulaire a été étudiée dans des modèles animaux de PFIC2 (souris *Abcb11*^{-/-}), de PFIC3 (Souris *Mdr2*^{-/-})

et de tyrosinémie (souris *fah*^{-/-}) (268-270). Il a été montré par Chen *et al.* que chez les souris *Abcb11*^{-/-}, l'UDCA permet la croissance des hépatocytes du donneur, améliore la repopulation des hépatocytes du donneur et corrige partiellement le profil d'ABs (271). À ce jour, plus de 20 patients atteints de troubles métaboliques héréditaires d'origine hépatique ont reçu une transplantation d'hépatocytes. La plupart de ces patients n'ont présenté que des améliorations partielles et transitoires dans la fonction métabolique pendant plusieurs mois et enfin subi une transplantation hépatique (272, 273). Parmi eux, deux patients atteints de PFIC2, n'ont montré aucune amélioration après la transplantation d'hépatocytes, en raison de la fibrose qui a altéré la prise des hépatocytes greffés (273). Il a été récemment montré que l'utilisation de trinitrate de glycéryle améliore l'efficacité du repeuplement des hépatocytes transplantés chez les souris *Mdr2*^{-/-} (274).

b- La thérapie génique

Remplacer un gène défectueux directement dans l'organisme représente une option thérapeutique attractive pour le traitement des maladies génétiques. Le principe est simple, il revient à remplacer ou à réparer le gène en question porteur de mutation. Le remplacement du gène défectueux implique l'ajout de la séquence codante sauvage à la cellule, ainsi qu'un promoteur pour permettre une expression à long terme. Pour réparer une mutation, il faut une stratégie d'édition de gènes qui supprime et/ou remplace la séquence mutée, soit pour rétablir une fonction normale, soit pour supprimer le gène produisant le dysfonctionnement. Le gène alors introduit dans la cellule est appelé transgène. Ce transgène est acheminé par un vecteur viral qui permet la délivrance du matériel génétique dans l'organisme. L'utilisation des vecteurs viraux n'est pas sans risque. En effet, au tout début de la thérapie génique, divers incidents ont été observés : des réactions inflammatoires incontrôlables, l'apparition de cancers liée à l'intégration du transgène dans des régions porteuses d'oncogènes. Les vecteurs viraux utilisés

sont les adénovirus, les *Adeno-Associated-Virus* (AAV), le virus herpès simplex (HSV), les baculovirus, les virus d'Epstein-Baar et les lentivirus. Les AAVs étaient considérés comme sûrs, cependant, les niveaux d'expression de CFTR étaient généralement inférieurs à la limite de détection. Malgré de faibles niveaux d'expression de CFTR (275), les résultats étaient encourageants car ils démontraient la sécurité du vecteur. Dans le foie, les gènes comme *ATP8B1/FIC1* et *ABCB11/BSEP* sont volumineux et il existe des difficultés pour les insérer dans les vecteurs viraux conventionnels.

Malgré de réelles avancées, cette technique a ses limites. Des essais sur l'homme souffrant d'autres pathologies ont abouti à des décès, certains inexplicables (276). L'édition de gènes *in vivo* à l'aide du système bactérien CRISPR/cas9 pourrait devenir une option très intéressante dans le futur (277).

La caractérisation (expression et fonction) des mutations en amont semble être un point primordial pour avoir un réel effet bénéfique d'une pharmacothérapie ciblée.

Objectifs des travaux de thèse

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude du transporteur hépatobiliaire des acides biliaires *ABCB11*/BSEP impliqué dans la PFIC2.

Une caractérisation phénotypique complète des mutations : expression de BSEP au niveau de l'hépatocyte (localisation) et sur le plan fonctionnel pour confirmer le caractère pathogène en particulier des nouvelles mutations identifiées chez les patients, constitue un prérequis pour l'efficacité d'une pharmacothérapie ciblée afin de corriger les conséquences des mutations au niveau protéique. L'importance de cette caractérisation réside également dans l'initiation à classer ces mutations sur la base des défauts moléculaires ainsi identifiés et les défauts phénotypiques observés.

La stratégie de translecture qui a donné des résultats prometteurs notamment chez les patients atteints de mucoviscidose n'a pas encore été étudiée dans le cadre de la PFIC2. La stratégie de la suppression traductionnelle de CSPs déjà développée pour d'autres maladies génétiques et pourrait donc être transposée à la PFIC2. Cette approche a été réalisée en collaboration avec le Dr Olivier NAMY (I2BC, UMR-9198, Orsay, France).

L'objectif de cette première partie du travail était de tester *in vitro*, la capacité de molécules de type aminoglycoside (gentamicine, G418) et non-aminoglycoside (PTC124) à induire une translecture de codon-stop dû à des mutations non-sens d'*ABCB11* identifiées chez les malades et d'étudier la localisation cellulaire et l'activité de la protéine générée après translecture. Dans ce but, nous avons utilisé deux modèles d'étude successifs. La première étape consistait à évaluer la sensibilité aux drogues inductrices de translecture de séquences cibles (codon-stop et son environnement nucléotidique) correspondant à six mutations non-sens d'*ABCB11*, à l'aide d'un système double rapporteur quantitatif. Par la suite, nous avons étudié l'expression cellulaire de ces mutants dans un système différent (synthèse de la protéine entière) afin

d'évaluer si l'induction de translecture permettrait la production d'une protéine de pleine taille détectable puis d'étudier son adressage et sa capacité à transporter des ABs. Enfin, nous avons testé une stratégie de bithérapie associant inducteurs de translecture et drogues chaperones, en recherchant leurs effets additifs sur les mutants stop translus retenus dans le cytoplasme.

La deuxième partie était consacrée à l'étude des mutations faux sens, identifiées chez les malades atteints de PFIC2. En particulier, les mutations responsables d'un défaut de repliement entraînant la rétention du mutant dans le RE. Le but était d'identifier de nouvelles molécules actives sur la correction de l'adressage de ces mutants aux canalicules biliaires. Pour cela, deux approches ont été réalisées. La première était une approche de chimie médicale basée sur la modification de la structure chimique de molécules déjà connues pour avoir cette activité (4-PB) afin d'optimiser leur capacité à relocaliser les protéines retenues dans le RE dans la perspective de rendre leur utilisation compatible avec des traitements cliniques. Cette approche était réalisée en collaboration avec le Pr Delphine Joseph (BioCIS, UMR-CNRS-8076, Chatenay, France). La deuxième approche était basée sur le test :

- De diverses petites molécules identifiées lors d'un criblage à grande échelle et qui s'avéraient être prometteuses pour corriger la fonction, le défaut de repliement et de trafic du mutant CFTR/ Δ F508 (molécules disponibles à la *Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics* (CFFT) (<http://www.cftrfolding.org/CFFTReagents.htm>)).
- D'autres médicaments avec un effet chaperon (drogues de repositionnement) capables de corriger le repliement et le trafic des protéines.

Matériels et méthodes

I- Quantification de la translecture par mesure d'activité enzymatique : identification de mutations sensibles à la translecture

1- Clonage des séquences cibles dans un plasmide rapporteur

Parmi la cohorte de patients PFIC2 référés au centre de référence des maladies rares dédié à l'atrésie des voies biliaires et aux cholestases génétiques (Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France), nous avons sélectionné des patients porteurs de six mutations non-sens *ABCB11* (p.Y354X, p.R145X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X et p.E1302X) au moins sur un allèle ont été reproduites (Tableau 2).

Tableau 2 : Séquences cibles rat et homme des différentes mutations étudiées

Pour chaque mutation, une séquence de 21 nucléotides centrés sur le codon-stop (en rouge) est insérée dans le plasmide.

Codon WT	Mutation	Séquence (Rat) 5'→3'
TAT	p.Y354X	GAAGAAGAG TAA ACACCAGGG
CGA	p.R415X	AAGCTAGACT TGA ATCAAGGGT
CGA	p.R470X	CTCATTCAG TGA TTCTATGAC
CGA	p.R1057X	CTGCTAGAT TGA AAACCTCCA
CGA	p.R1090X	TATCCTTCT TGA CCCGATATT
GAA	p.K1302X	ACCCATGAAT TAA CTGATGGCC
Codon WT	Mutation	Séquence (Homme) 5'→3'
TAT	p.Y354X	GAAGGAGAA TAA ACACCAGGA
CGA	p.R415X	AGTTGGAT TGA ATCAAGΓ-GT
CGA	p.R470X	CTCATTCAG TGA TTCTATGAC
CGA	p.R1057X	CTGCTGGACT TGA CAACCCCA
CGA	p.R1090X	TATCCTTCT TGA CCTGACTCG
GAA	p.E1302X	ACCCATGAAT TAA CTGATGGCC

Les séquences « cibles » correspondantes aux mutations étudiées dans leur environnement nucléotidique direct (soit 21 nucléotides) sont insérées par clonage dans un plasmide vecteur pAC99 (Figure 25, fourni par l'UMR8621, Orsay, France) au niveau d'un site de restriction unique MscI encadré par 2 gènes : β -gal (β -galactosidase) en amont et Luc (luciférase) en aval du site de restriction.

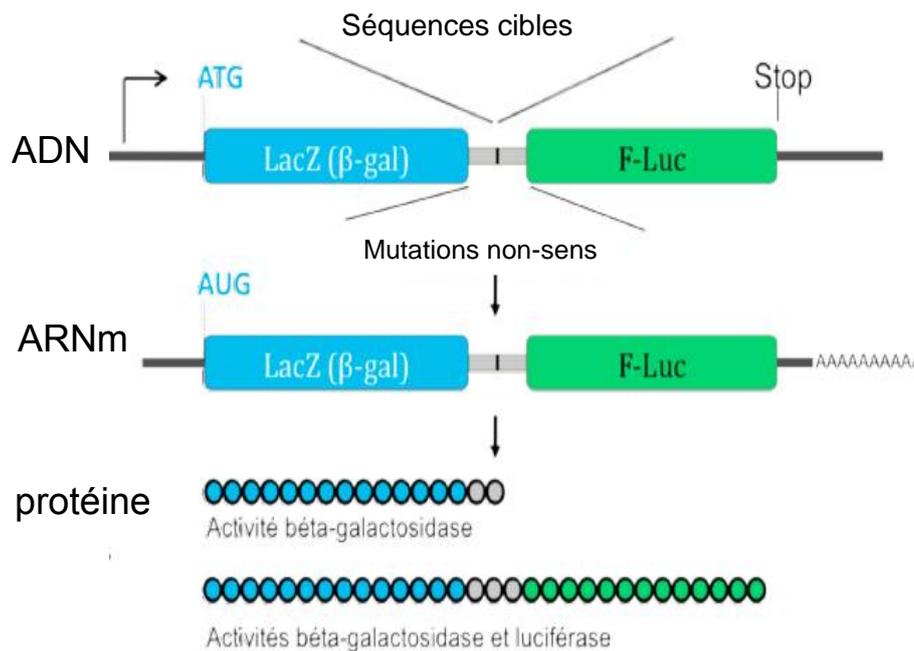


Figure 25 : Système rapporteur pAC99

Les mutations non-sens entourées de leur contexte nucléotidique naturel sont insérées en phase entre les séquences codantes des gènes LacZ et Luc. Le ratio des activités enzymatiques luciférase sur β -galactosidase permet de calculer le taux de translecture de la mutation analysée. Ce ratio est normalisé par rapport à celui d'un vecteur témoin qui n'a pas de codon-stop entre les ORFs LacZ et Luc. Ce rapport représente le 100% d'activité luciférase.

Différentes étapes ont été entreprises afin d'insérer les séquences cibles dans le vecteur. Dans un premier temps, la dénaturation des éventuelles structures secondaires internes aux oligonucléotides est réalisée à 90°C pendant 3 minutes. Puis, un retour progressif à la température ambiante permet l'appariement des brins sens et antisens des séquences cibles

(1 codon-stop entouré de 3 codons en 5' et 3 codons en 3' = 21 nucléotides) afin de former un ADN double brin. La deuxième étape consiste à linéariser le vecteur de clonage en utilisant l'enzyme de restriction MscI, site de restriction unique du vecteur double rapporteur utilisé qui exprime les gènes codant la β -galactosidase et la luciférase autour de ce site de restriction. La digestion est réalisée durant 2h à 37°C et à la fin la vérification de la réaction d'hydrolyse se fait sur gel d'agarose. La troisième étape consiste à faire une réaction de ligation des inserts appariés au vecteur de clonage linéarisé. Ceci se fait grâce à l'action de la ligase (une nuit à 4°C) sur le vecteur digéré par MscI, puis l'action de la ligase est inactivée 10 minutes à 70°C. Enfin, la dernière étape consiste à transformer, par choc thermique, des bactéries compétentes DH5 α par les constructions plasmidiques. Les bactéries sont étalées sur gélose contenant l'antibiotique de sélection (l'ampicilline, gène de résistance bactérien contenu dans le vecteur). La présence de l'insert ainsi que son orientation est ensuite vérifiée par PCR sur colonies (vérification du sens de l'insertion). Pour chaque clone, la présence de la mutation cible est ensuite vérifiée par séquençage (*Genoscreen, Lille, France*).

2- Cultures cellulaires, transfections et traitements

A- Lignées cellulaires et conditions de culture

Les cellules NIH3T3 sont des fibroblastes de souris immortalisés. Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM + Glutamax (*Gibco-Life technologie, Saint Aubin, France*) enrichi à 10% de sérum de veau fœtal (*Invitrogen, Cergy pontoise, France*), en présence d'une solution antibactérienne et antifongique. Elles sontensemencées en plaques 6 puits (135 000 cellules/puits) et incubées à 37°C, en atmosphère humide à 5% de CO₂.

B- Transfection

Les cellules sont transfectées transitoirement 24h après ensemencement, grâce à un agent de transfection Jet Pei® (*Invitrogen*) avec l'une des constructions plasmidiques dans les proportions suivantes : 1.33 µg d'ADN/3.33 µL de Jet Pei®. Pour chaque expérience de transfection indépendante, une transfection parallèle est réalisée avec un plasmide pAC TQ contrôle, contenant une séquence consensus sans codon-stop entre les deux gènes rapporteurs.

C- Traitements

Le lendemain de la transfection, les cellules sont incubées pendant 24h avec du milieu frais supplémenté ou non en G418 à 200 µg/mL (Généticine), gentamicine à 800 µg/mL (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO*) ou PTC124 à 15 µM (Ataluren®, *PTC Therapeutics–Selleckchem, South Plainfield, USA*). Pour le mutant et Bsep^{R1090X}, une courbe dose-réponse de la gentamicine a été réalisée (400 à 1200 µg/mL).

D- Mesure de l'activité enzymatique

À 24h du traitement, les cellules sont décollées par une solution de trypsine, et les culots cellulaires sont repris dans un tampon de lyse (tampon Tris-phosphate 25 mM, MgCl₂ 8 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, Triton X100 1%, BSA 0,1% et Glycérol 15%) puis extraits par agitation. Le dosage enzymatique est réalisé sur les extraits cellulaires : l'activité de la luciférase est mesurée par bioluminescence en lecteur microplaque (*Tecan, Infinite 200Pro*) après injection d'un tampon ATP/luciférine (*Promega, Madison, USA*) comme décrit par Nguyen et al. (278). Le dosage de l'activité β-galactosidase (β-gal) se fait en présence d'ONPG (Ortho-nitrophényl-β-galactoside, substrat de la β-gal). La densité optique de la réaction est mesurée à 420 nm. Le niveau d'activité de la luciférase reflète donc l'efficacité de transfection, tandis que celui de la β-gal reflète l'efficacité de transfection et d'extraction protéique. Le pourcentage de

transfecture est calculé en faisant le rapport de l'activité luciférase/ β -gal, normalisée par le rapport obtenu avec le vecteur contrôle pAC TQ dans les mêmes conditions. Ceci permet une calibration interne de chaque expérience indépendante.

II- Effet de la gentamicine et du PTC124, sur l'expression et la localisation de mutants stop de Bsep dans la lignée HEK293 et Can 10

1- Présentation du plasmide vecteur

La carte du plasmide pEGFP-N1 (4,7 kb) contenant le cDNA Bsep de rat couplé, en C terminal à la GFP produisant, après traduction, la protéine de fusion Bsep-GFP, est présentée dans la figure 26 ci-dessous. Ce plasmide a été gracieusement fourni par James BOYER (Yale Liver Center, New Haven, USA). Nous travaillons avec le cDNA bsep de rat, car il présente une forte homologie de séquence (> 80%) avec la protéine humaine et qu'il est plus fortement exprimé que l'ADNc humain dans les modèles cellulaires.

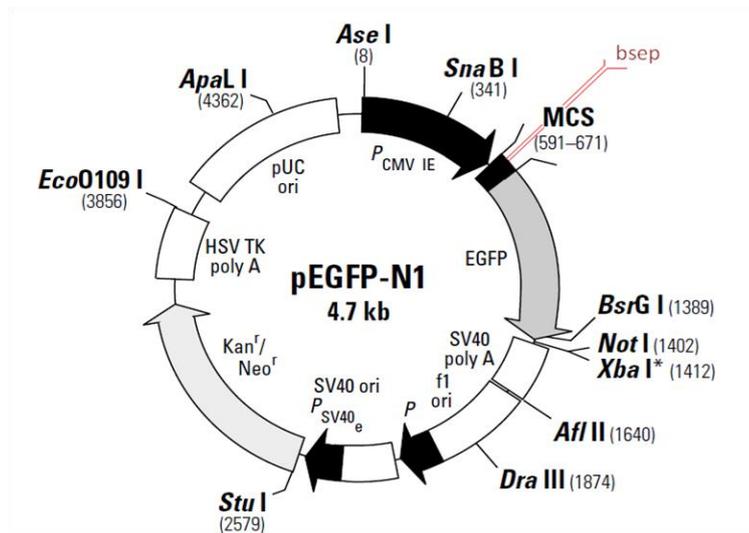


Figure 26 : Carte du plasmide pEGFP-N1

Ce plasmide de 4.7 kb contient un promoteur précoce pCMV, et une séquence E-GFP en C-ter de la séquence de Bsep. Il possède un gène de résistance à la kanamycine pour la culture bactérienne et à la néomycine (résistance au G418) pour les cellules eucaryotes.

2- Clonage des mutants

Les mutations ont été introduites par mutagenèse dirigée au sein d'un plasmide pEGFP-N1. La mutagenèse dirigée a pour objet de muter une séquence d'ADN à un endroit précis. Elle permet de reproduire dans le plasmide les mutations identifiées chez les malades. Dans un premier temps, nous avons procédé au design des primers reproduisant les mutations désirées via le logiciel Agilent (*Agilent Technologies/Genomics*) (Tableau3).

Tableau 3 : séquences des primers utilisés pour la mutagenèse dirigée de Bsep (rat)

Nom du primer	Séquence des primers (5' → 3')
Y354X sens	cctagatgaagaagag taa acaccagggacactggc
Y354X antisens	gaccagtgtccctggtg tt actcttctcatctagg
R 415X sens	gagacggctacaagctagact g aatcaagggtgaaattgag
R 415X antisens	ctcaattcacccttgatt ca gtctagcttagccgtctc
R470X sens	gcattacagctcattcag tg attctatgaccctgtg
R470X antisens	cacaggggtcatagaat ca ctgaatgagctgtaatgc
R1057X sens	cacgctttttcaactgctagatt g aaaacctccaattaatgtgtacag
R1057X antisens	ctgtacacattaattggagg ttt caatctagcagttgaaaaagcgtg
R1090X sens	cgtatccttct tg accgatattcaagttctg
R1090X antisens	cagaactgaatatc ca agaaggatac
K1302X sens	aaaaagggacctagatg ta actgatggcccagaag
K1302X antisens	cttctgggcatcag tt actcatggctccctttt
R1090C sens	gattttattgactgtaaattacgtatccttct tg tcccgatattcaagttct
R1090C antisens	agaacttgaatatcgggacaagaaggatacgtaaatttacagtcaataaaatc
R1090W sens	gattttattgactgtaaattacgtatccttct tg ggccgatattcaagttct
R1090W antisens	agaacttgaatatcggg cca agaaggatacgtaaatttacagtcaataaaatc
A257V sens	ttggcattgggg ca gtcgtcataggtctgag
A257V antisens	ctcagacctatgac ga ctgcccaatgcaa
R1128C sens	cagcattcagctgttgaa tg ttctatgatcccgatcag
R1128C antisens	ctgatcgggatcatagaa ac attccaacagctgaatgctg
T1210P sens	gctcccagagaaatgaac cta atgttgggatccagggc
T1210P antisens	gccctggateccaacattag gtt catatttctctgggagc

Le kit de mutagenèse dirigée (QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit, *Agilent Technologies*) a été utilisé conformément aux recommandations du fournisseur.

A- Amplification et purification des plasmides mutés

Les plasmides mutés ont été amplifiés en transformant des bactéries XL10-Gold ultra-compétentes (fournies avec le kit de mutagenèse) par choc thermique. Puis du milieu SOC (milieu riche utilisé pour la culture des bactéries) a été ajouté et le mélange ADN/bactéries a été incubé à 37°C pendant 50 minutes sous agitation, ceci dans le but de régénérer la membrane bactérienne. Les bactéries ainsi transformées ont été cultivées sur gélose contenant un antibiotique (kanamycine 50 µg/ml). Des colonies ont été prélevées puis amplifiées en milieu liquide en présence de l'antibiotique. Enfin, l'ADN a été extrait et purifié via le kit « *NucleoBond® Xtra plasmid purification* » (*Macherey-Nagel*).

B- Vérification des plasmides par séquençage

Les plasmides ont été séquencés afin de vérifier la présence de la mutation et l'absence d'autres mutations indésirables (Genoscreen). L'ADNc codant la protéine Bsep étant de 4228 nucléotides, plusieurs primers permettant de couvrir toute la séquence nucléotidique (un primer permet une lecture d'environ 800 bases) ont été utilisés. Les séquences ont été vérifiées avec la fonction Align de « BLAST » du site internet du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3- Cultures cellulaires, transfections et traitements

A- Lignées cellulaires et conditions de culture

La lignée cellulaire Can 10 a été isolée et caractérisée au sein de notre laboratoire. Ces cellules proviennent des cellules Fao (hépatome de rat), cultivées temporairement sous forme de sphéroïdes. Ce mode de culture a induit la polarisation irréversible d'une faible fraction de

cellules. Ce clone est le plus polarisé avec de longs canalicules biliaires dilatés et ramifiés. Ces cellules ne forment pas de tapis à confluence, car elles poussent sous forme de grappes, peu adhérentes sur support (279). Le milieu de culture est un milieu de type F12 modifié par Coon (Sigma), auquel est ajouté 5% de Sérum de vœu fœtal (Invitrogen), 2 mM de Glutamine (Gibco) et une solution antibiotique-antifongique (SPF).

La lignée cellulaire HEK293 dérive de cellules embryonnaires rénales humaines, modifiée par un adénovirus. Ces cellules prolifèrent rapidement et sont facilement transfectables. Le milieu de culture des cellules HEK293 est le milieu DMEM + Glutamax (Gibco), auquel sont ajoutés 10% de sérum de veau foetal, 1% d'acides aminés non essentiels (MEM NEAA 100X, Gibco) et une solution antibiotique (SPF).

Les cellules sont incubées à 37°C, en atmosphère humide à 7% de CO₂, puis cultivées en plaque 12 puits, sur lamelles de verre (5.10⁴ ou 2.10⁵ cellules/puits, pour Can10 et HEK293, respectivement). Pour l'étude en Western blot, les HEK293 sontensemencées en plaques 6 puits (4.10⁵ cellules/puits).

B- Transfection transitoire des HEK293 et Can 10

Les cellules sont transfectées de manière transitoire avec le plasmide sauvage (Bsep^{WT}) ou chacun des six mutants. Pour HEK293 : la transfection est réalisée à 24 heures de l'ensemencement des cellules, à l'aide de l'agent de transfection liposomique *Fugene HD*® *Transfection reagent* (Promega), avec le rapport suivant : 4 µl d'agent de transfection/1 µg de cDNA. Pour les Can 10 : la transfection est réalisée à 48 heures de l'ensemencement des cellules, à l'aide de l'agent de transfection non liposomique *X-trèmeGene HPDNA*® *Transfection reagent* (Roche Diagnostics, Meylan, France) avec le rapport 1 µL d'agent de transfection/ 0,5 µg de cDNA.

C- Traitements

Six heures après transfection, les cellules ont été traitées avec la gentamicine (800 ou 1200 µg/mL), PA, MHMPB, OTNC and HMPB (150 µM, 500 µM ou 1 mM), GPB (1 mM), SAHA, curcumine (1 µM) ou C18 (3 µM). Dans certaines expériences, 12 heures après traitement par la gentamicine (soit 18 h après transfection) les cellules ont été traitées par le 4-PB (1 mM), l'UDCA (50 µM) ou l'association de ces traitements pendant 24 heures. Pour le traitement à 27°C, les cellules Can 10 ont été mises dans un incubateur à 27°C en atmosphère humide 7% de CO₂, 24 heures après la transfection (J3) pendant 24 heures.

D- Immunofluorescence indirecte :

Les cellules ont été d'abord fixées avec le formaldéhyde 2% et méthanol. L'immunofluorescence est utilisée pour localiser, via différents marqueurs, les protéines Bsep (sauvages ou mutées) dans les cellules. C'est une technique indirecte, permettant l'amplification du signal par rapport à une technique directe, qui consiste en une incubation séquentielle d'anticorps primaires obtenus chez une espèce donnée dirigés contre les protéines d'intérêts (dans notre cas c'est l'anticorps anti-GFP souris ou lapin (*Roche diagnostics*) dilué au 1/80^e ou 1/500^e, respectivement dans l'anticorps anti-ZO1 pur (*donné par B.R Stevenson*), anti-c-Myc (1/250, *BD Pharmigene, San Diego, CA*) et d'anticorps secondaires fluorescents de type Alexa (*Molecular Probes*), dirigés contre l'espèce des anticorps primaires dilués au 1/500^e dans le PBS.

E- Analyses microscopiques

Les échantillons sont analysés au microscope inversé à épifluorescence (*Zeiss, Axioskop*) équipé d'objectifs à contraste de phase, avec capture d'image par caméra (*C10600, Hamamatsu*) et par microscopie confocale (*TE2000, Nikon*) avec le logiciel d'acquisition EZ-

C1 sur des coupes z de 0,3µm. Les images prises au microscope confocale présentées sont une projection de 2 à 3 coupes.

F- Quantification des cellules exprimant Bsep

Les cellules HEK293 et les cellules Can 10 exprimant Bsep-GFP (WT et les mutants) ont été quantifiées comme suit : 10 champs par lamelle ont été capturés de manière aléatoire avec le même temps d'exposition. Pour chaque champ, le nombre de cellules présentant un degré détectable de fluorescence verte a été exprimé en pourcentage du nombre total de cellules (nombre de noyaux, visible dans la coloration de Hoechst). Dans les cellules Can 10, le pourcentage de cellules enrichies en Bsep-GFP au pôle canaliculaire a été déterminé (GFP canaliculaire) *versus* l'enrichissement cytoplasmique (GFP cytoplasmique).

G- Western blot

Les cellules ont été lysées après 4 jours de culture. L'immunodétection a été réalisée avec des anticorps primaires spécifiques : anti-GFP souris (1/500) et anti-actine lapin (1/1000). Des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase (*GE Healthcare, Little Chalfont, UK*) ont été utilisés pour détecter l'activité de la peroxydase par chimioluminescence.

III- Étude fonctionnelle par mesure du transport vectoriel du taurocholate tritié

1- Lignée cellulaire MDCK et conditions de culture

La lignée cellulaire Madin-Darby canine kidney (MDCK) provient du sous-clonage des cellules MDCK qui ont été isolées à partir de cellules rénales de chien. Elles sont capables de former *in vitro* un épithélium monostratifié (tapis cellulaire) avec une polarité simple (pôle apical et pôle basal accessibles). Cette lignée a été énormément utilisée comme modèle

cellulaire pour les études de transport vectoriel d'ABs. Le milieu de culture est le même que pour les cellules Can 10.

2- Génération de clone MDCK stables exprimant Bsep et Ntcp de rat

Le clonage des cellules permet d'obtenir des lignées homogènes qui expriment de manière stable les transgènes d'intérêt. Le plasmide pEGFP-N1, codant Bsep^{WT}, Bsep^{R1128C}, Bsep^{T1210P} et Bsep^{R1090X} de rat, ont d'abord été transfectés dans des cellules MDCK en utilisant l'agent de transfection *Fugene HD* (4 µL d'agent de transfection/1 µg d'ADNc). La sélection clonale de cellules transfectées de manière stable a été obtenue avec 600 µg/mL de G418 (Généticine), ajoutée 2 jours après la transfection et maintenue durant toute la période de production du clone. Arrivées à confluence, les cellules sont trypsinées et diluées de manière à générer des clones à partir d'une seule cellule et réduire le risque de chevauchement entre deux clones proches dans la boîte de pétri. Lorsque les colonies sont visibles à l'œil nu, elles sont par la suite, récupérées à l'aide d'une pointe de 200 µL dans des puits de plaque 12 puits (avec une lamelle en verre de 14 mm de diamètre) après avoir déposé une goutte de trypsine pour décrocher les cellules. Une caractérisation de clones est ensuite réalisée en western blot et en immunofluorescence (Bsep^{WT} et les mutants faux sens). Pour le mutant non-sens Bsep^{R1090X}, la protéine ne peut être détectée par ces techniques. Sa caractérisation est réalisée en qRT-PCR.

Brièvement, L'ARN total a été extrait du clone MDCK Bsep^{R1090X} en utilisant le réactif *TRI-Reagent* puis a été converti en ADNc en utilisant la transcriptase inverse *SuperScript II* (*Invitrogen*). La PCR en temps réel a été réalisée à l'aide du *iQ SYBR Green Super Mix* (*Bio-Rad, Hercules, CA*), conformément aux instructions du fabricant. L'expression relative de Bsep^{R1090X} a été quantifiée en utilisant la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase et la β -actine en tant que gènes de référence. Les amorces sens et anti-sens utilisées sont les suivantes:

Bsep^{R1090X}, 5'-GCCATGACATTCGCTCTCTT-3' et

5'-CGGTACTGTAAGCGAGAGAA-3'; GAPDH, 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' et 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'; β -actine, 5'-ATCGTGGGCCGCCCTAGGCAC-3' et 5'-TGGCCTTAGGGTTCAGAGGGGC-3'.

Le transport vectoriel du taurocholate tritié médié par Bsep (localisé dans le pôle apical des clones MDCK) n'est possible que si le taurocholate peut entrer dans les cellules. Or, notre modèle d'étude n'exprime pas de façon endogène le transporteur basolatéral des ABs (Ntcp). Pour cela, le transgène Ntcp (ADNc de rat) a été cloné dans un plasmide *pLenti-Ntcp-cMyc-DDK-IRES-Puro* (Origene Technologies, Inc., Rock-ville, MD) (Figure 27). Ce plasmide a été intégré dans un vecteur lentiviral permettant une expression stable du transgène. Les particules lentivirales contenant le plasmide qui exprime Ntcp, ont été produites par la plateforme de Vecteurs Viraux et Transfert de Gènes SFR-Necker (Université Paris Descartes - Sorbonne Paris, France) et titrées par qPCR.



Figure 27 : Carte du plasmide pLenti-Ntcp-cMyc-DDK-IRES-Puro

Ce plasmide de 7,6 kb contient un promoteur précoce pCMV et une séquence cMyc-DDK en C-ter de la séquence codant Ntcp, produisant après traduction la protéine de fusion Ntcp-Cmyc-DDK. Il possède un gène de résistance à la puromycine pour les cellules eucaryotes.

Les clones MDCK, préalablement, transfectées de manière stable avec Bsep^{WT} et ses mutants ont été transduites 24 heures après leur ensemencement, avec les particules lentivirales à une multiplicité d'infection de 30 pour $1,8 \times 10^5$ cellules pendant 4 à 5 h. Quarante-huit heures

après l'infection, les cellules ont été sélectionnées avec de la puromycine (3 µg/mL). L'expression de Ntcp a été contrôlée par western blot et immunofluorescence avec mise en évidence de la présence de c-Myc.

3- Transport vectoriel du taurocholate tritié

A- Mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER) et la perméabilité paracellulaire (au jaune de Lucifer) des clones MDCK

Les expériences de transport ont été effectuées sur une monocouche de cellules confluentes (tapis cellulaire) obtenues par culture sur une membrane d'insert en polyester (taille de pores de 3 µm, *BD Falcon ; BD Biosciences*) pendant 5-6 jours. L'intégrité du tapis cellulaire a été évalué en mesurant la résistance électrique transépithéliale (TEER) une fois par jour à l'aide d'un voltmètre *Millicell-ERS (Merck Millipore, Billerica, MA)* et la perméabilité paracellulaire en utilisant un composé fluorescent : le jaune de Lucifer (LY). LY (100 µM dans le DMEM) a été ajouté au compartiment basal et le DMEM au niveau apical. L'ensemble du volume (300 µL) a été collecté à partir du compartiment apical au bout de 1 h à 37°C. L'intensité de la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un fluoromètre *Wallac (VICTOR 3 ; Perkin Elmer, Waltham, MA)* à λ_{ex} 430 nm et λ_{em} 535 nm. La perméabilité de la monocouche MDCK a été calculée en pourcentage de LY dans le compartiment apical par rapport au témoin (insert vide sans cellule). Seuls les inserts avec une mesure de TEER correcte et une perméabilité inférieure à 5% ont été sélectionnés pour les expériences de transport. Le milieu a ensuite été remplacé par du milieu de culture standard.

B- Transport du taurocholate tritié

Le taurocholate est un AB efficacement transporté par Bsep et Ntcp d'où le choix de son utilisation dans ces expériences. Les cellules exprimant à la fois, Bsep et Ntcp de rat sont

cultivées sur une membrane d'insert jusqu'à ce qu'elles forment une monocouche confluente de cellules polarisées. Le système de transport est illustré dans la figure 28.

Dans un premier temps, plusieurs mises au point ont été réalisées afin de trouver les conditions optimales de travail. Trois quantités de ^3H -TC ont été testées. Des résultats cohérents de transport ont été obtenus pour les cellules MDCK Bsep^{WT}Ntcp avec une quantité de ^3H -TC de 0,1 μM qui correspond à 1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ et de 0,9 μM de TC. Cette concentration a été retenue pour tout le reste des expériences.

Les monocouches de cellules ont été traitées pendant 24 heures avec 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicine à 37 °C ou 27 °C. Pour la combinaison de traitement, les cellules ont été traitées pendant 24 heures supplémentaires avec 1 mM du 4-PB en plus de la gentamicine. Tous ces traitements ont été ajoutés au compartiment apical. Après 24 ou 48 heures de traitement, un mélange de taurocholate (TC) (^3H -TC 0,1 μM , 1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ et TC non marqué, 0,9 μM) a été préparé dans du tampon de transport (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 23,8 mM, KCl 4,83 mM, KH₂PO₄ 0,96 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 12,5 mM, glucose 5 mM et CaCl₂ 1,53 mM, ajusté à pH 7,4), préchauffé à 37°C. Ensuite, 600 μL ont été placés dans le compartiment basal et 150 μL du tampon de transport sans TC dans le compartiment apical. Les plaques d'insert ont été mises sous agitation pendant 2 h à 37°C. Puis, des aliquots de 50 μL ont été collectés dans le compartiment apical et la radioactivité a été mesurée par un compteur à scintillation (*Hidex 300 SL, Hidex Turku, FI*). Ensuite, les membranes ont été découpées et lysées avec 120 μL de TritonX-100 à 1%. La concentration en protéine a été déterminée en utilisant le kit *BCA Protein Assay (BioRad, Marnes-La-Coquette, FR)*. Les résultats de mesure de radioactivité de chaque insert ont été normalisés à la quantité totale de protéines sur les membranes.

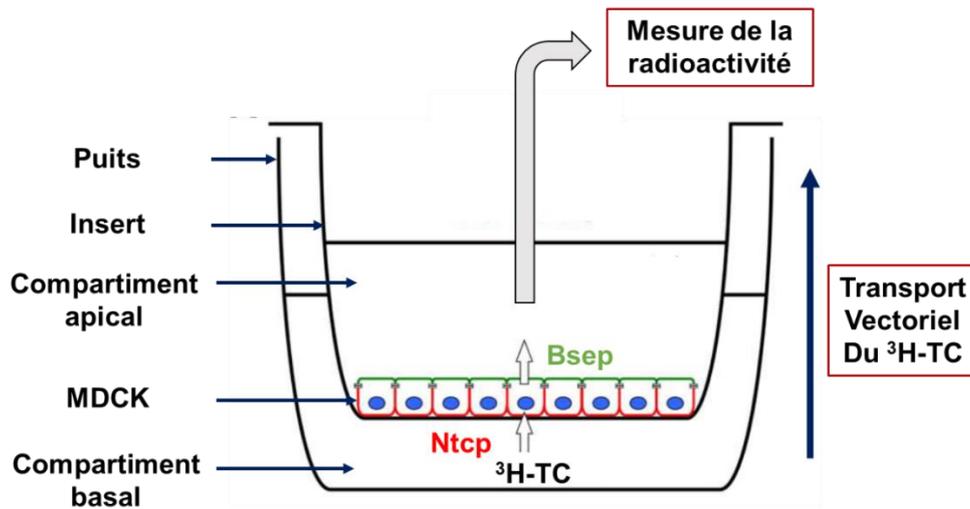


Figure 28 : Transport vectoriel de ^3H -taurocholate

Les clones MDCK-Ntcp ont été cultivés dans un insert sur une membrane poreuse permettant le passage du ^3H -TC du compartiment basal vers le compartiment apical. Le transport vectoriel se fait par mesure de la radioactivité dans le compartiment apical du ^3H -TC pris en charge par Ntcp en basolatéral puis par Bsep en apical.

IV- Analyses statistiques

Le logiciel GraphPad Prism® a été utilisé pour les tests statistiques. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. Le test utilisé est le test non paramétrique *Mann-Whitney*. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme significative.

Résultats

I- Résumé de l'article : Aminoglycosides rescue some nonsense

***ABCB11* mutations identified in PFIC2 patients**

Les travaux du premier article ont porté sur la suppression traductionnelle de codons stop prématurés dans le cas de mutations non-sens identifiées chez les patients atteints de PFIC2. Les mutations non-sens sont responsables de formes graves de la maladie. Elles conduisent à la formation de protéines tronquées le plus souvent non fonctionnelles. Les lignées cellulaires utilisées pour notre étude sont les cellules NIH3T3 pour le système double rapporteur. Ce sont des fibroblastes de souris immortalisés. Ils permettent une meilleure induction de l'activité luciférase. Les lignées HEK293 et Can 10 ont été utilisées pour l'étude la protéine entière. HEK293 dérive de cellules embryonnaires rénales humaines, modifiées par un adénovirus. Elles sont faciles à transfecter et permettent d'avoir l'information sur l'expression de la protéine de fusion Bsep-GFP reflet du saut du codon-stop. La lignée Can 10 quant à elle, permet l'étude de l'adressage des différents mutants de Bsep au canalicule biliaire. Cette lignée isolée et caractérisée au sein de notre laboratoire présente une polarité de type hépatocytaire avec formation de canalicules biliaires. Enfin, la lignée MDCK qui dérive des cellules de rein de chien présente une polarité simple avec un pôle basal et apical bien différenciés. Elle constitue un très bon modèle pour l'étude fonctionnelle du transport vectoriel.

Le but de cette étude est d'évaluer la capacité de molécules décrites comme étant des inducteurs de translecture à induire le saut du codon-stop prématuré pour aboutir à une réexpression d'une protéine entière et fonctionnelle. C'est le cas des aminoglycosides (G418, gentamicine) et du PTC124. Dans un premier temps, les environnements nucléotidiques correspondant aux six mutations (séquences cibles rat et homme de 21 nucléotides) est inséré

par clonage dans un plasmide double rapporteur. Ce système permet de quantifier le taux de translecture par mesure d'activité enzymatique afin d'évaluer la sensibilité de ces mutations aux différents traitements. Dans ce système, les aminoglycosides ont considérablement augmenté le taux de translecture de toutes les mutations chez l'homme et le rat, tandis que le PTC124 n'a augmenté que légèrement le niveau de la translecture de la mutation p.E1302X.

Dans un deuxième temps, l'expression cellulaire de ces mutants a été réalisée dans un système différent afin d'évaluer si l'induction de la translecture permet la production d'une protéine entière détectable puis d'étudier la localisation et l'adressage de la protéine générée par translecture. Pour cela, les six mutations non-sens de BSEP, identifiées chez des malades atteints de PFIC2, ont été reproduites par mutagenèse dirigée dans un plasmide (pEGFP-N1) contenant l'ADNc de Bsep de rat couplé à la GFP ce qui facilite les études de localisation intracellulaire. Dans HEK293 et Can 10, la gentamicine a augmenté le nombre de cellules exprimant Bsep-GFP de quatre mutants (p.R415X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X) versus un mutant (p.R1090X), respectivement. Les protéines résultantes de pleine taille sont localisées dans le cytoplasme, à l'exception de Bsep^{R1090X}, qui a également été détectée au niveau de la membrane plasmique ou canaliculaire dans la lignée HEK293 et Can 10 respectivement. De plus, des combinaisons de traitements (thérapie de translecture associée à la thérapie chaperone) ont également été étudiées. Il a été montré que l'abaissement de la température ou le traitement par des molécules chaperones (telles que le 4-PB et l'UDCA) pouvait permettre à des protéines mal repliées de sortir du réticulum et de poursuivre normalement leur maturation. En effet, la culture à 27°C ou l'ajout du 4-PB et/ou l'UDCA pendant 24 heures après avoir induit la translecture par la gentamicine du mutant Bsep^{R1090X}, ont permis d'augmenter significativement la proportion de protéine complète au niveau du canalicule, dans les cellules Can 10.

Enfin, dans le cas de Bsep^{R1090X}, le transport de l'acide biliaire radioactif (³H-TC) a pu être mesuré dans les cellules MDCK cultivées sur insert. Le traitement à la gentamicine a

montré une augmentation significative du transport vectoriel (du pôle basal → pôle apical) du ³H-TC, générant une protéine partiellement fonctionnelle. Cette augmentation est d'autant plus importante avec la bithérapie (translecture + chaperone).

II- Résumé de l'article : Chaperone therapy for missense BSEP^{R1128C} mutation responsible for progressive familial intrahepatic cholestasis type 2

Les travaux du second article ont porté sur l'étude de la mutation faux sens p.R1128C identifiée chez les patients atteints de PFIC2. Cette mutation est responsable d'un défaut de repliement entraînant la rétention de Bsep dans le RE. Dans un précédent article, notre équipe a montré que le 4-phénylbutyrate (4-PB), une drogue chaperone, s'est avéré, *in vitro* et *in vivo*, corriger partiellement l'adressage de ce mutant aux canalicules biliaires ainsi que l'amélioration clinique de patients avec la disparition du prurit et l'amélioration des tests hépatiques. Mais une dose relativement élevée (1 mM) est nécessaire pour montrer un effet bénéfique. Le but de cette étude est d'identifier de nouvelles molécules efficaces afin de corriger le défaut d'adressage des mutants faux sens BSEP aux canalicules biliaires. Une des stratégies consiste à développer une approche de chimie médicale basée sur la modification de la structure chimique de molécules déjà existantes (comme le 4-PB) afin d'optimiser leur capacité à relocaliser les protéines retenues dans le RE. L'autre approche est basée sur le test de diverses petites molécules identifiées lors d'un criblage à grande échelle, et qui s'avèrent être efficaces pour corriger le défaut de repliement et de trafic du mutant CFTR/ Δ F508.

Dans la lignée hépatocytaire Can 10, les composés présentant une analogie de structure avec le 4-PB identifiés lors du screening de la chimiothèque BioCis tels que le Méthyl 3-Hydroxy-2-Méthyl-4-Phénylbutyrate (MHMPB), 4-Oxo-1,2,3,4-Tétrahydronaphtalène-2-Carboxylate (OTNC) ainsi que le 3-Hydroxy-2-Méthyl-4-Phénylbutyrate (HMPB) libéré de la

prodrogue MHMPB possèdent une activité pharmaco-chaperone favorisant le trafic adéquat de Bsep^{R1128C} aux canalicules. Dans la lignée MDCK, ces molécules augmentent la capacité de transport du ³H-taurocholate du mutant Bsep^{R1128C}. Ces molécules sont aussi efficaces que le 4-PB à corriger partiellement l'adressage et à augmenter l'activité de ce mutant à des doses beaucoup plus faibles que le 4-PB. D'autres drogues chaperones, tels que le glycérolphénylbutyrate (GPB), l'acide subéroylanilide hydroxamique (SAHA) et le principe actif du 4-PB, le phénylacétate (PA) peuvent partiellement corriger l'adressage de Bsep^{R1128C} au canalicule et augmenter le transport de ³H-TC dans MDCK.

III- Article: Aminoglycosides rescue some nonsense *ABCB11* mutations identified in PFIC2 patients

AMINOGLYCOSIDES RESCUE SOME NONSENSE *ABCB11* MUTATIONS IDENTIFIED IN PFIC2 PATIENTS

(En cours de soumission dans la revue *Hepatology*)

Rachida Amzal¹, Alice Thébaut^{1,2}, Martine Lapalus¹, Marion Almes^{1,2}, Brigitte Grosse¹, Anne Davit-Spraul^{1,3}, Laure Bidou⁴, Olivier Namy⁴, Emmanuel Jacquemin^{1,2*}, Emmanuel Gonzales^{1,2*}

¹University of Paris-Sud, Paris-Saclay, INSERM, UMR_S 1174, Hepatinov, Orsay, France.

²Pediatric Hepatology & Pediatric Liver Transplant Department, Coordinator of the national reference network for rare liver diseases dedicated to biliary atresia and genetic cholestasis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Faculty of Medicine Paris-Sud, Paris-Saclay, CHU Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

³Biochemistry Unit, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, CHU Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

⁴University of Paris-Sud, Paris-Saclay, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA. * These authors contributed equally to this work.

KEY WORDS: BSEP, gentamicin, geneticin, readthrough, PTC124

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE : Pr Emmanuel Gonzales, M.D., PhD., Service d'Hépatologie et de transplantation hépatique pédiatriques, Département de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France. Tel: 33-1-45-21-37-88. Fax: 33-1-45-21-28-16. E-mail : emmanuel.gonzales@aphp.fr

ABBREVIATIONS: 4-PB, 4-phenylbutyrate; BA, bile acids; BSEP/Bsep, bile salt export pump; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; ER, endoplasmic reticulum; GFP, green fluorescent protein; ³H-TC, ³H-taurocholate; HEK293, Human embryonic kidney 293; LT, liver transplantation; MDCK, Madin-Darby canine kidney; NMD, nonsense mediated mRNA decay; Ntcp, Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide; PFIC2, progressive familial intrahepatic cholestasis type 2; PTC, premature termination codon; RT, readthrough; UDCA, ursodeoxycholic acid; WT, wild-type; ZO-1, zonula occludens 1.

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank AMFE ("Association Maladies Foie Enfants", Malakoff, France), MLD (Monaco Liver Disorder, Monaco), Association "Pour Louis 1000 Foie Merci" (Fournet Luisans, France), Association "Il était un Foie" (Plouescat, France) and Fondation Rumsey-Cartier (Geneva, Switzerland) for their support.

GRANT SUPPORT : RA was supported by « Association pour la Recherche en Hépatologie Pédiatrique » (CHU Bicêtre, France), « Association Robert Debré pour la recherche médicale » (Paris, France) and by « Association Maladie Foie Enfants » (Malakoff, France). AT and MA were supported by « Société Française de Pédiatrie » (Paris, France).

ABSTRACT

Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) is a severe hepatocellular cholestasis due to biallelic mutations in *ABCB11* encoding the canalicular bile salt export pump (BSEP). Nonsense mutations are responsible for severe phenotypes. The study aim was to assess the ability of drugs to induce readthrough of six nonsense mutations (p.Y354X, p.R415X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X and p.E1302X) identified in PFIC2 patients. The ability of G418, gentamicin and PTC124 to induce readthrough was studied using a reporter system in NIH3T3 cells. The ability of gentamicin to induce readthrough and to lead to the expression of a full-length protein was studied in HEK293 and Can 10 cells using immunodetection assays. The function of the gentamicin-induced full-length protein was studied by measuring the vectorial transport of ³H-taurocholate in stable MDCK clones co-expressing Ntcp. Combinations of gentamicin and chaperone drugs (UDCA, 4-PB) were investigated. In NIH3T3, aminoglycosides significantly increased readthrough levels of all mutations studied, while PTC124 only slightly increased readthrough of p.E1302X. Gentamicin, but not PTC124, induced a readthrough of p.R415X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X and of p.R1090X in HEK293 and Can 10 cells, respectively. The resulting full-length proteins localized within the cytoplasm, except for Bsep^{R1090X} that was also detected at the plasma membrane of HEK293 and at the canalicular membrane of Can 10 cells. Additional treatment with 4-PB and UDCA significantly increased the proportion of Bsep^{R1090X} full-length protein at the canalculus of Can 10 cells. In MDCK clones, gentamicin induced a 40% increase of the transport of ³H-taurocholate of Bsep^{R1090X}, which was further increased with additional 4-PB treatment.

Conclusion: this study constitutes a proof of concept for readthrough therapy in selected PFIC2 patients with nonsense mutations.

INTRODUCTION

Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type 2 (PFIC2) is an autosomal recessive disease due to mutations in *ABCB11* encoding Bile Salt Export Pump (BSEP) (1, 2). BSEP is expressed at the canalicular membrane of hepatocytes and is the major transporter responsible for biliary bile acid secretion (3, 4). In patients with PFIC2, impaired biliary bile acid secretion leads to decreased bile flow resulting in chronic cholestasis with severe pruritus and to bile salt accumulation responsible for severe ongoing hepatocellular damages leading to fibrosis, end-stage liver disease and high risk of hepatocellular carcinoma. Medical therapy with ursodeoxycholic acid (UDCA), rifampicin, and surgical therapy such as biliary diversion may provide some symptomatic relief. Nevertheless, in the majority of cases, liver transplantation (LT) is required because of unremitting pruritus, hepatic failure or hepatocellular carcinoma (1).

More than two hundred variants of *ABCB11* have been identified in PFIC2 patients including missense, nonsense and splice mutations (5). A genotype-phenotype correlation has been confirmed in a recent study of the largest cohort of PFIC2 patients suggesting that the severity of the disease being correlated with the impairment of the expression level and of the function of the resulting BSEP mutant (1, 6). Accordingly, severe mutations such as nonsense mutations result in severe phenotype with reduced response to medical and surgical therapy, very high risk of hepatocellular carcinoma leading to a survival with native liver after age 10 years estimated around 33% in PFIC2 patients carrying two biallelic severe mutations (6). In addition, those patients have been suggested to be at the highest risk to develop anti-BSEP alloimmunization after LT, a complication of LT specific to PFIC2 patients (7). Thus, there is a clear unmet therapeutic need for PFIC2 patients carrying such nonsense mutations. Nonsense mutations lead to the formation of an in-frame premature termination codon (PTC) and result in the formation of a truncated protein which is most often poorly expressed - the mRNA being

degraded by the nonsense mediated mRNA decay (NMD) pathway -, not correctly localized and or not functional (8). Targeted pharmacotherapy is a promising personalized therapeutic approach which aims to partially correct the consequence of the mutations identified in a specific patient. It is a field of active research especially in diseases involving protein of the ATP binding cassette (ABC) family such as BSEP (9-11). We and others have shown that some drugs called correctors –able to correct miss-trafficking and to reduce ERAD- such as 4-phenylbutyrate (4-PB) could be of benefit in BSEP deficiency including PFIC2 both *in vitro* and in selected patients carrying specific missense mutations (4, 9, 10, 12, 13). Concerning nonsense mutations, it has been known for decades that certain drugs such as aminoglycosides (e.g. gentamicin, geneticin) can bind to mammalian ribosomes and affect the fidelity of the translation process and induce a translational readthrough (RT) of the PTC allowing the partial restoration of full-length protein synthesis (14, 15). More recently, new drugs with some ability to induce a PTC RT were identified, including PTC124 which has been tested in various preclinical studies as well as in phase II and III clinical trials, in patients with various genetic diseases such as cystic fibrosis (CF) and Duchenne muscular dystrophy (DMD) (16-19). However, the effect of these RT inducing drugs has never been studied in PFIC2.

Herein, we studied *in vitro* the ability of such drugs to induce RT of six nonsense mutations identified in patients with PFIC2. Our data show that treatment with aminoglycosides could induce RT of one of these mutations leading to the expression of a partially functional mutant. In addition, our data suggest that combination of aminoglycosides with correctors further improve the rescue of this mutant. This work provides new proof of concept in the field of targeted pharmacotherapy of PFIC2 resulting from nonsense mutations in *ABCB11*.

MATERIALS AND METHODS

PATIENTS

Among the cohort of PFIC2 patients referred to the national reference network for rare liver diseases dedicated to biliary atresia and genetic cholestasis we studied six patients carrying six different *ABCB11* nonsense mutations (p.Y354X, p.R415X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X and p.E1302X) at least on one allele. Results of *ABCB11* gene analysis and assessment of patient phenotypes were performed as previously reported (1) and are detailed in Table 1.

READTHROUGH QUANTIFICATION IN NIH3T3 CELLS

Nonsense mutations were reproduced in a dual gene reporter system that allows quantification of PTC RT, by the measurement of luciferase and β -galactosidase (internal calibration) activities. Complementary oligonucleotides corresponding to human (and rat when relevant i.e. different from the human sequence) nonsense mutations embedded in their natural nucleotide context were annealed and cloned in the pAC99 vector as previously described (20). Twenty-four hours after seeding in 6 wells plate, NIH3T3 cells were transiently transfected with corresponding plasmids using Jet Pei (Invitrogen, California, USA; DNA/transfection reagent ratio: 1 μ g/2.5 μ L). Eighteen hours after transfection, cells were treated for 24 hours with 200 μ g/mL of G418 (geneticin, Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France), 800 μ g/mL of gentamicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 15 μ M (i.e. 4.26 μ g/mL) of PTC124 (Therapeutics–Selleckchem, South Plainfield, USA) or vehicle (PBS). These doses were selected according to published data (16, 21, 22). In some additional experiments concerning the rat p.R1090X mutant, cells were also treated with 400 and 1200 μ g/mL of gentamicin. Then, cells were harvested and lysed, and β -galactosidase and luciferase enzymatic activities were assayed as previously described (23). An in-frame construct (TQ), with no stop codon between the two

reporter genes, was used as a control (Table 2). The RT was calculated as the ratio of luciferase to β -galactosidase activities normalized to the ratio obtained with the control (TQ) and was expressed as a percentage, as previously described (23).

STUDIES OF THE NONSENSE MUTANTS

DNA CONSTRUCTS AND MUTAGENESIS

Mutations p.Y354X, p.R415X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X and p.K1302X, were introduced in a pEGFP-N1 vector (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA) (24) encoding a rat Bsep-green fluorescent protein (GFP) fusion protein (a gift of J.L. Boyer, Yale University School of Medicine, New Haven, CT) using the QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, Santa Clara, CA) as previously described (9, 10). Primers sequences used for mutagenesis are detailed in Supporting Table 1. Rat Bsep was used because of its high degree of homology with the human ortholog and a higher level of expression in cultured cells (25). The whole constructs were verified by automated Sanger sequencing.

TRANSFECTION, TREATMENTS OF HEK293 AND CAN 10 CELLS, QUANTITATIVE AND QUALITATIVE STUDIES OF BSEP EXPRESSION

HEK293 and Can 10 cells were plated at 0.5 and 0.15×10^4 cells.cm⁻², respectively, onto glass coverslips in 12-well plates. HEK293 cells were transiently transfected at day 1 using Fugene HD Transfection reagent (Promega, Madison, Wisconsin, USA; DNA/transfection reagent ratio: 1 μ g/4 μ L) and Can 10 cells at day 2 using X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Meylan, France; DNA/transfection reagent ratio: 1 μ g/2 μ L), with the plasmids, according to the manufacturer's instructions. Six hours after transfection, HEK293 cells were treated for 24h at 37°C with gentamicin (400-1200 μ g/mL), PTC124 (15 μ M) or

vehicle (PBS). Can 10 cells were treated with gentamicin (800 µg/mL) or vehicle (PBS) for 24h at 37°C or 27°C. In some experiments, after 18h of treatment with gentamicin, Can 10 cells were co-treated with 4-PB (1 mM, Biovision Clinisciences, Montrouge, France) and/or UDCA (50 µM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or corresponding vehicle (PBS and DMSO, respectively) for 24 additional hours. Then, cells were fixed and immunostained using the following primary antibodies mouse anti-GFP (1:80, Roche Diagnostics, Meylan, France), rat anti-zonula occludens (ZO-1) (undiluted, obtained from B. Stevenson (26) and rabbit anti-occludin (1:500, Thermofisher, Waltham, USA). Appropriate goat anti-immunoglobulin G Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594 secondary antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR) were used at a dilution of 1:500. Cells were observed using a Zeiss Axioskop epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) and a confocal microscope (Eclipse TE-2000-Nikon-C1; Nikon, Tokyo, Japan) as previously described (10). HEK293 cells and Can 10 cells expressing Bsep mutants were quantified as follows: 10 fields by coverslip were captured randomly with the same exposure time. For each field, the number of cells with a detectable degree of GFP was expressed as a percentage of the number of total cells (identified using a Hoechst staining). Can 10 cells expressing GFP were further classified according to the presence (canalicular GFP+) or the absence (cytoplasmic GFP+) of a canalicular enrichment of Bsep-GFP as previously described (10).

GENERATION OF MDCK CLONES STABLY EXPRESSING RAT BSEP AND NTCP

MDCK cells, a well-characterized polarized kidney cell line allowing vectorial transport, were first transfected with plasmids encoding Bsep^{WT}-GFP or Bsep^{R1090X}-GFP using Fugene HD transfection reagent according to manufacturer's instructions. Clonal selection of stably transfected cells was obtained with 600 µg/mL of G418, added 2 days after transfection. Expression of Bsep^{R1090X} was checked by RT-qPCR as described in Supporting Information.

To allow BA entry in MDCK cells, the rat cDNA of Ntcp (Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide, *Slc10A1*), a basolateral BA transporter, was cloned into the lentiviral vector pLenti-cMyc-DDK-IRES-Puro plasmid (PS100069, OriGene, Rockville, MD). Bsep^{WT} and Bsep^{R1090X} expressing MDCK clones were plated into 60 mm diameter Petri dishes at 1.8×10^5 cells. Twenty-four hours after seeding, cells were infected with lentiviral particles containing the recombined plasmid at a multiplicity of infection of 30 and recombinants were selected with 3 µg/mL puromycin (Ozyme, Paris, France). Expressions of Bsep-GFP and of Ntcp-cMyc were examined by immunolocalization using rabbit anti-GFP (1:500, Abcam, Cambridge, UK) and mouse anti-cMyc (1:250, BD Pharmigene, San Diego, CA) as described in the previous section and by immunoblotting. Briefly, cells were lysed as previously described (27) and immunoblotting was performed with specific primary antibodies against mouse GFP (1:500), rabbit α -actin (1:1000, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO) and mouse c-Myc (1:500). Appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) were used to detect peroxidase activity by chemiluminescence (ECL detection kit, BioRad, Marnes-La-Coquette, France).

VECTORIAL TAUROCHOLATE TRANSPORT ASSAY

MDCK clones stably expressing Bsep-GFP and/or Ntcp-cMyc were seeded on polyethylene terephthalate membrane inserts (pore size 3 µm; BD Falcon) in 24-well plates at a density of 1.4×10^5 cells per insert. During the five following days, the integrity of cell monolayer was assessed by measuring transepithelial electrical resistance and Lucifer yellow permeability test (28). The cell monolayers were treated for 24 hours with gentamicin (800 µg/mL) or vehicle at 37°C. In some experiments, cells were treated for 24 additional hours with 4-PB (1 mM) or vehicle, or grown at 30°C. Thereafter, culture medium was replaced by prewarmed transport buffer (118 mM NaCl, 23.8 mM NaHCO₃, 4.83 mM KCl, 0.96 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄,

12.5 mM HEPES, 5 mM glucose, and 1.53 mM CaCl₂, adjusted to pH 7.4) (29) in apical and basal compartments, in the presence of ³H-taurocholate (³H-TC) (0.1 μM, 1 μCi/mL, Perkin Elmer, Waltham, MA) and taurocholate (TC) (0.9 μM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) in the basal compartment. After 2 hours, the radioactivity in the apical compartment was measured by scintillation counter (Hidex 300 SL, Hidex Turku, Finland). Aliquots (50 μL) of cell lysate (120 μL 1% Triton X-100) were used to determine protein concentration (DC Protein Assay, BioRad, Marnes-La-Coquette, France), according to the manufacturer's instructions. All transport data were expressed as a count per minute normalized to total protein concentration in each insert.

STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed using GraphPad Prism 6 (San Diego, CA) and are presented as mean ±SD (standard deviation) or SEM (standard error of the mean). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test, with a *P* value < 0.05 being considered statistically significant.

RESULTS

AMINOGLYCOSIDES INDUCE A READTHROUGH OF SIX BSEP NONSENSE MUTATIONS IDENTIFIED IN PFIC2 PATIENTS

For each of the six BSEP nonsense mutations (p.Y354X, p.R415X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X and p.E1302X) identified in the six PFIC2 patients selected (Table1), the PTC and the surrounding nucleotide context are shown in Table 2. Because the following studies were performed using the rat Bsep cDNA, nonsense mutations were also studied in the rat nucleotide context as detailed in Table 2. As expected, basal RT levels, quantified in NIH3T3 as described in the methods section, were dramatically low for all mutations compared to the in-frame control. The mean basal RT levels ranged from 0.031% for the rat mutation p.Y354X to 0.322% for the human mutation p.R1057X (Table2). Basal RT levels were in the same ranges for human and rat mutations except for the mutation p.R1057X (0.047% in the rat context versus 0.322% in the human context) (Table 2). Thereafter we studied the ability of gentamicin, G418 and of PTC124 to induce the RT of these PTCs. The maximal responses were obtained with G418, which increased significantly the RT of all human (Fig. 1A) and rat PTCs (Fig. 1B). Interestingly, G418 increased the RT of the p.R1090X mutation over a level of 10%, representing a 50-fold increase over the basal rate for the human mutation. Treatment with gentamicin also increased significantly the RT of all mutations but to a lesser extent than G418. The maximum effect was also observed for the mutation p.R1090X with a gentamicin-induced RT around 3%, representing a 14-fold increase over the basal rate for the human mutation. (Fig.1A and Fig.1B). In contrast, PTC124 did not significantly increase the RT levels, except for the mutation p.K/E1302X which RT level was only slightly increased from 0.128% to 0.320% (Fig. 1A and Fig. 1B). Likewise, we studied the dose-response relationship after treatment with gentamicin of p.R1090X mutation. We observed a dose-dependent increase of

the RT levels until 800 µg/mL, while there was no significant difference between the 800 and the 1200 µg/mL doses (Fig. S1).

GENTAMICIN INDUCES A READTHROUGH OF NONSENSE BSEP MUTATIONS AND LEADS TO THE PRODUCTION OF A FULL-LENGTH BSEP PROTEIN.

Since the pEGFP-N1 plasmid contains a resistance cassette to G418, gentamicin was the only aminoglycoside that could be used for further studies. BSEP nonsense mutations have been reproduced in a pEGFPN1 plasmid expressing a rat Bsep-GFP fusion protein and a resistance cassette to G418. Basal as well as gentamicin-induced RT were studied by immunostaining after transient transfection of HEK293 cells with the corresponding plasmids. Before gentamicin therapy, we observed variable levels of expression of Bsep full-length protein (Fig. 2A), ranging from 0.12% (p.R1090X) to 10.76% (p.R470X) of HEK293 cells (Fig. 2B). Treatment with gentamicin increased significantly the level of expression of Bsep full-length protein of 4 mutations (p.R415X, p.R470X, p.R1057X and p.R1090X) among the 6 nonsense mutations studied (Fig. 2B) while virtually neither basal nor gentamicin-induced RT was detected for the p.K1302X mutation. Interestingly, in line with the results of the dual gene reporter system, the maximum effect was observed for the mutation p.R1090X, with a gentamicin-induced RT leading to a detection of a Bsep full-length protein in 35% of HEK293 cells (Fig. 2B). Moreover, no significant effect was observed with p.Y354X and p.K1302X mutants, these two mutants being the less responsive in the dual reporter system. Furthermore, PTC124 failed to induce the production of a full-length Bsep^{K1302X} protein (data not shown). The expression of the various nonsense mutants was also studied in the rat hepatocellular polarized Can 10 line (Fig. 3A). The basal RT levels were variable and higher than the one observed in HEK293 line, ranging from to 2.8% to 9.7% (Fig. 3B). The p.R1090X Bsep mutation was the only mutation for which we observed a significant gentamicin-induced RT

(Fig. 3B). Interestingly, confocal studies showed that all the 6 nonsense mutants localized within the cytoplasm of Can 10 cells except the p.R1090X mutant which was also observed at the canalicular level after gentamicin-induced RT (Fig. 3A). Because the p.R1090X mutant was the only one for which we observed a significant gentamicin-induced RT in all the systems, we selected to further study this mutant.

GENTAMICIN-INDUCED FULL-LENGTH BSEP^{R1090X}: IMMUNODETECTION STUDIES AND EFFECT OF COMBINATION THERAPY WITH UDCA AND 4-PB.

In HEK293 cells, treatment of the p.R1090X mutant with gentamicin led to the expression of a full-length Bsep protein detected both within the cytoplasm but also at the plasma membrane level, as indicated by the colocalization of GFP with occludin (Fig. 4A). Accordingly, western blot analysis showed that gentamicin induced the production of both a mature detected at 190 kDa and an immature form of Bsep (Fig. 4B). Subcellular localization of the p.R1090X mutant was further studied in Can 10 cells by quantification of the cytoplasmic and of the canalicular expression as indicated in the Methods section. At 37°C, the basal RT of p.R1090X led to expression of a full-length protein that was only detected within the cytoplasm (Fig. 5) of 3% of Can cells. After treatment with gentamicin, the expression increased to 8% including 1.5% of Can 10 cells in which the protein was detected at the canalicular level. Growing cells at 27°C is a well-known condition to stabilize and to improve trafficking of ER-retained proteins such as Bsep missense mutant (9, 10, 24, 25, 30, 31). In this condition, we observed a trend toward an increase of the basal RT of p.R1090X including a slight canalicular localization that was not observed at 37°C (Fig. 5). In Can 10 cells treated with gentamicin and grown at 27°C, we observed a dramatic and significant increase of the canalicular expression of the gentamicin induced full-length Bsep, from 9% to nearly 80% (Fig. 5). Because chaperone drugs such as 4-PB and UDCA have been shown to increase the canalicular expression of several Bsep missense

mutants (10), we studied the effect of these drugs at 37°C in combination with gentamicin. Treatment with UDCA, 4-PB and UDCA + 4-PB, significantly increased the canalicular expression of the gentamicin-induced full-length Bsep.

GENTAMICIN-INDUCED FULL-LENGTH BSEP^{R1090X} IS PARTIALLY FUNCTIONAL AND ITS FUNCTION CAN BE INCREASED WITH 4-PB THERAPY

To further study the effect of gentamicin on Bsep^{R1090X} mutant, we developed a functional model to study the activity of Bsep in MDCK cells. MDCK clones expressing wild type Bsep and Ntcp were selected as indicated in the Methods section. These clones were characterized using immunodetection techniques (Fig. 6). The expression level of Ntcp and of Bsep^{WT} was controlled using western blot as illustrated in (Fig. 6A, B). The subcellular localization of Bsep^{WT}, Bsep^{R1090X} (with or without gentamicin treatment) and of Ntcp was studied using confocal microscopy. While Ntcp was located at the basolateral membrane of MDCK, wild type Bsep localized at the apical membrane as illustrated in Fig. 6C. After gentamicin-induced RT, Bsep^{R1090X} localized at the basal membrane and also at the apical membrane of the cells as illustrated in Fig. 6D.

Then, we studied the functionality of Bsep and Ntcp by measuring the vectorial transport of ³H-TC across MDCK monolayer cultured in inserts. The basal to apical flux of ³H-TC was not detected across MDCK Bsep^{WT} cells but was detected across MDCK Ntcp cells, the later corresponding to background activity, as previously reported (Fig. 6E) (30). Across MDCK co-expressing Bsep^{WT} and Ntcp, this transport was increased 3.6-fold (Fig. 6E). These results indicated that the expression of Ntcp in the basolateral membrane was required to detect the vectorial transport of ³H-TC in the apical direction in MDCK monolayers. Next, we assessed the activity of the p.R1090X mutant in the same cellular system. The vectorial transport of ³H-

TC measured in MDCK Bsep^{R1090X} Ntcp was significantly lower than the one measured in MDCK Bsep^{WT} Ntcp and was comparable to the one measured in MDCK Ntcp cells suggesting that this mutant was not functional (Fig. 6E). Treatment with gentamicin significantly increased the transport of ³H-TC across MDCK Bsep^{R1090X} Ntcp by 40% (Fig. 6F). These data suggested that a fraction of this gentamicin-induced expression of p.R1090X mutant is expressed at the apical membrane level and is functional. As for Can 10 cells, we studied the effect of combination therapy in MDCK. Additional treatment with 4-PB or by growing the cells at 30°C significantly increased the transport of ³H-TC by Bsep^{R1090X} compared to gentamicin treatment alone (Fig. 6F).

DISCUSSION

Herein, we studied the capability of aminoglycosides and PTC124 to induce RT of six *ABCB11* nonsense mutations identified in patients with PFIC2. We first quantified RT levels of these mutations embedded in their nucleotide context using a dual reporter assay in NIH3T3 cells. Aminoglycosides induced a RT of all the mutations tested. This capability of aminoglycosides has been known for decades and relies on their properties to alter the fidelity of translation (14). Interestingly, among the two types of stop codon studied, we observed a higher induction of RT of sequences containing a UGA (p.R415X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X) than those containing a UAA (p.Y354X, p.E/K1302X). These results are in line with previous studies showing the following order of gentamicin-induced PTC RT efficiency: UGA>UAG>UAA (32, 33). In this study we did not study any mutation introducing a UAG stop codon. In addition, we observed a higher aminoglycoside-induced RT of the human p.R1057X sequence than of the rat p.R1057X sequence. This difference could be due to the nature of the first nucleotide after the stop codon, in position n+4, as it has been shown that a C nucleotide, as in the human sequence, is more favorable to aminoglycoside-induced PTC RT than an A, as in the rat sequence (34-36). Importantly, PTC124 (3- [5- (2- fluorophenyl) - [1,2,4] oxadiazol-3-yl] benzoic acid), an FDA and EMA approved drug in Duchenne muscular dystrophy and in cystic fibrosis, did not significantly increase the RT levels of the 10 sequences studied, except for the sequence corresponding to the mutation p.E1302X. However, in further experiments in HEK293 cells, PTC124 failed to induce the production of a full-length Bsep^{K1302X} protein. Such negative in vitro results have been previously reported in other diseases and in other models and the efficiency of PTC124 is still a matter of debate (37).

Then we studied the capability of gentamicin to induce RT of these nonsense mutations and to lead to the production of a full-length Bsep protein in a non-polarized (HEK293) and in a

hepatocellular (Can 10) line. In HEK293, gentamicin-induced a RT of the 4 UGA PTC out of the six PTC studied leading to a significant increase of the expression of a Bsep full-length protein. Up to 35% of the cells expressed a Bsep full-length protein after treatment with gentamicin of the Bsep^{R1090X} mutant. Conversely, the 2 mutants caused by a UAA PTC did not respond to gentamicin therapy. In Can 10 cells, Bsep^{R1090X} was the only mutant among the six mutants studied for which expression was significantly increased, up to 10% of cells, after gentamicin therapy. In line with its unique favorable UGA-C sequence, Bsep^{R1090X} was the most responsive mutant to gentamicin therapy and the only one to respond in all the three systems tested. Accordingly, we selected this mutant for further qualitative studies. In HEK293, western blot studies showed that gentamicin induced the expression of both an immature form and a mature form of a full-length Bsep^{R1090X} protein. In addition, confocal studies showed that gentamicin-induced full-length Bsep^{R1090X} localized both in the cytoplasm and at the plasma membrane level of HEK293 cells. This pattern of expression was also observed in Can 10 cells, Bsep^{R1090X} gentamicin-induced full-length protein being detected in the cytoplasm but also at the canalicular level.

Because gentamicin-induced RT of UGA PTC can result in the incorporation of 3 amino acids, namely arginine (CGA) – the wild type residue of Bsep-, cysteine (UGC or UGU) or tryptophan (UGG) (38-40), the Bsep^{R1090X} gentamicin-induced full-length protein could in fact be a mixture of Bsep^{WT} and of the two missense mutants Bsep^{R1090C} and Bsep^{R1090W}. Considering this possibility, we tested the effect of combination therapies of gentamicin with corrector drugs such as 4-PB or/and UDCA. These latest drugs have been shown to partially correct the canalicular trafficking of some Bsep missense mutants (9, 10, 24, 25, 30, 31). Interestingly, additional treatments with 4-PB or UDCA increased the expression of Bsep^{R1090X} gentamicin-induced full-length protein, especially at the canalicular level of Can 10 cells. Since it is currently impossible to predict in which proportion each amino acid will be incorporated into

the peptides synthesized during RT and since corrector drugs might also increase the canalicular expression of Bsep^{WT} (41) we do not know the respective contribution of Bsep^{WT} and of Bsep^{R1090C} and Bsep^{R1090W} mutants in the increase of the expression of gentamicin-induced full-length Bsep protein observed with UDCA and 4-PB treatments. In this system we did not observe any additive effect between UDCA and 4-PB treatments. Lastly, we showed in MDCK cells that treatment with gentamicin led to a significant increase of ³H-TC transport activity of the Bsep^{R1090X} mutant, this transport activity being further increased after treatment with 4-PB. It is likely that 4-PB increased the apical expression of gentamicin-induced full-length Bsep protein in MDCK as we observed in Can 10 cells accounting for the increased ³H-TC transport activity observed. It should be mentioned that the experimental models used in this work overcame the NMD phenomenon which could represent another limitation for the efficiency of this targeted therapy in patients (8). In addition, because of this experimental limitation, we could not study the effect of compound that could inhibit NMD and potentially further increase the expression of the gentamicin-induced full-length Bsep (42). All in all, our results show that gentamicin can induce a RT of the nonsense p.R1090X mutation of Bsep leading to the expression of a partially functional full-length protein and that an additional treatment with 4-PB increased both the canalicular expression and the TC transport activity of this gentamicin-induced full-length Bsep protein.

Children carrying nonsense mutations of *ABCB11* present with a severe phenotype of PCFIC2 including poor response to medical and surgical therapies, high risk of hepatocellular carcinoma and high risk to develop anti-BSEP alloimmunization post LT. New therapeutic strategies are needed for these patients and targeted pharmacotherapy to induce RT of PTC could be a promising one since it is anticipated that induction of the expression of a small amount of functional BSEP could significantly modify patient phenotypes (6). However, when considering the transposition of this targeted pharmacotherapy to PFIC2 patients, limitations

appear. The well-known ototoxicity and nephrotoxicity of aminoglycosides are the major limitation and preclude their long-term use in humans at the dose that would be required. Therefore, identification and development of new PTC-RT compounds with better efficacy/toxicity profiles has emerged as an active field of research (42). These researches have led to the development and to the identification of promising PTC-RT agents including synthetic aminoglycoside derivatives such as NB84 and NB124 (22), non-aminoglycoside compounds such as PTC414 (43) and cliticine (17, 44) as well as compounds already approved for clinical use such as Escin (42, 45). Interestingly, some of these drugs have different RT properties with different patterns of PTC RT efficiency than those of aminoglycosides allowing the RT of aminoglycosides-unfavorable PTC sequences such as UAA. Lastly, compounds such as CDX5 could increase the RT effect of aminoglycosides allowing a reduction of doses and of toxicity (46). However, the toxicity of these compounds, except those already clinically approved and evaluated in a repurposing strategy, has not yet been studied in animal models. The identification of nontoxic, orally bioavailable, efficacious readthrough agents that could be evaluated in children suffering from a severe chronic liver disease such as PFIC2 still deserves further work. When such drugs become available for clinical trials and validated in preclinical studies, such as the present work, international registries of PFIC2 patients, such as NAPPED, will help to identify the appropriate patients to be included (6). Application of targeted pharmacotherapy including PTC suppression in other genetic liver diseases, including other autosomal recessive genetic cholestasis and Wilson disease should also be considered (1, 9-11).

Our data provide evidence that *in vitro*, gentamicin can partially rescue a PFIC2-causing BSEP nonsense mutation by inducing a pharmacological RT and that additional treatment with 4-PB could further increase the TC transport activity of the resulting full-length protein by increasing its apical expression.

REFERENCES

1. Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, Baussan C, Gonzales E, Stieger B, Bernard O, et al. ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 2010;51:1645-1655.
2. Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebecauerova D, Rayner A, Dutton L, Meier Y, et al. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* 2008;134:1203-1214.
3. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, et al. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 1998;273:10046-10050.
4. Soroka CJ, Boyer JL. Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: therapeutic implications of BSEP mutations. *Mol Aspects Med* 2014;37:3-14.
5. Kubitz R, Droge C, Stindt J, Weissenberger K, Haussinger D. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:536-553.
6. Wessel DV TR, Grammatikopoulos T, Kadaristiana A, Jankowska I, Lipiński P et al (NAtural course and Prognosis of PFIC and Effect of biliary Diversion). The Natural Course of Bsep Deficiency: Results from the Global Napped-Consortium [Abstract]. *Hepatology* 2018;68:1-183 :185A.
7. Droge C, Bonus M, Baumann U, Klindt C, Lainka E, Kathemann S, Brinkert F, et al. Sequencing of FIC1, BSEP and MDR3 in a large cohort of patients with cholestasis revealed a high number of different genetic variants. *J Hepatol* 2017;67:1253-1264.
8. Linde L, Kerem B. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet* 2008;24:552-563.

9. 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;57:695-698.
10. Gonzales E, Grosse B, Schuller B, Davit-Spraul A, Conti F, Guettier C, Cassio D, et al. Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology* 2015;62:558-566.
11. Vauthier V, Housset C, Falguières T. Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters. *Biochem Pharmacol* 2017;136:1-11.
12. Naoi S, Hayashi H, Inoue T, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, Kage M, 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;164:1219-1227 e1213.
13. Hayashi H, Naoi S, Hirose Y, Matsuzaka Y, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, et al. Successful treatment with 4-phenylbutyrate in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 refractory to biliary drainage and bilirubin absorption. *Hepatol Res* 2016;46:192-200.
14. Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 1996;2:467-469.
15. Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebok Z, Bubien JK, Hong J, Tousson A, et al. Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med* 1997;3:1280-1284.
16. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007;447:87-91.
17. Friesen WJ, Trotta CR, Tomizawa Y, Zhuo J, Johnson B, Sierra J, Roy B, et al. The nucleoside analog cliticine is a potent and efficacious readthrough agent. *RNA* 2017;23:567-577.

18. Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, Bidou L, Parbaille B, Pierrot S, Davy N, et al. In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med* 2007;5:5.
19. Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Wall C, King W, Al-Dahhak R, Lewis S, et al. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2010;67:771-780.
20. Bidou L, Hatin I, Perez N, Allamand V, Panthier JJ, Rousset JP. Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. *Gene Ther* 2004;11:619-627.
21. Floquet C, Rousset JP, Bidou L. Readthrough of premature termination codons in the adenomatous polyposis coli gene restores its biological activity in human cancer cells. *PLoS One* 2011;6:e24125.
22. Bidou L, Bugaud O, Belakhov V, Baasov T, Namy O. Characterization of new-generation aminoglycoside promoting premature termination codon readthrough in cancer cells. *RNA Biol* 2017;14:378-388.
23. Stahl G, Bidou L, Rousset JP, Cassan M. Versatile vectors to study recoding: conservation of rules between yeast and mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1995;23:1557-1560.
24. Lam P, Pearson CL, Soroka CJ, Xu S, Mennone A, Boyer JL. Levels of plasma membrane expression in progressive and benign mutations of the bile salt export pump (Bsep/Abcb11) correlate with severity of cholestatic diseases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C1709-1716.
25. Wang L, Soroka CJ, Boyer JL. The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest* 2002;110:965-972.

26. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986;103:755-766.
27. Bender V, Buschlen S, Cassio D. Expression and localization of hepatocyte domain-specific plasma membrane proteins in hepatoma x fibroblast hybrids and in hepatoma dedifferentiated variants. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 22):3437-3450.
28. Mahdi ZM, Synal-Hermanns U, Yoker A, Locher KP, Stieger B. Role of Multidrug Resistance Protein 3 in Antifungal-Induced Cholestasis. *Mol Pharmacol* 2016;90:23-34.
29. Mita S, Suzuki H, Akita H, Stieger B, Meier PJ, Hofmann AF, Sugiyama Y. Vectorial transport of bile salts across MDCK cells expressing both rat Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide and rat bile salt export pump. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G159-167.
30. Wang L, Dong H, Soroka CJ, Wei N, Boyer JL, Hochstrasser M. Degradation of the bile salt export pump at endoplasmic reticulum in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *Hepatology* 2008;48:1558-1569.
31. Hayashi H, Takada T, Suzuki H, Akita H, Sugiyama Y. Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology* 2005;41:916-924.
32. Manuvakhova M, Keeling K, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA* 2000;6:1044-1055.
33. 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:e1002608.

34. McCaughan KK, Brown CM, Dalphin ME, Berry MJ, Tate WP. Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5431-5435.
35. Cassan M, Rousset JP. UAG readthrough in mammalian cells: effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals. *BMC Mol Biol* 2001;2:3.
36. Loughran G, Chou MY, Ivanov IP, Jungreis I, Kellis M, Kiran AM, Baranov PV, et al. Evidence of efficient stop codon readthrough in four mammalian genes. *Nucleic Acids Res* 2014;42:8928-8938.
37. Sheridan C. Doubts raised over 'read-through' Duchenne drug mechanism. *Nat Biotechnol* 2013;31:771-773.
38. Blanchet S, Cornu D, Argentini M, Namy O. New insights into the incorporation of natural suppressor tRNAs at stop codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2014;42:10061-10072.
39. Blanchet S, Rowe M, Von der Haar T, Fabret C, Demais S, Howard MJ, Namy O. New insights into stop codon recognition by eRF1. *Nucleic Acids Res* 2015;43:3298-3308.
40. Feng YX, Copeland TD, Oroszlan S, Rein A, Levin JG. Identification of amino acids inserted during suppression of UAA and UGA termination codons at the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:8860-8863.
41. Nagasaka H, Yorifuji T, Kobayashi K, Takikawa H, Komatsu H, Inui A, Fujisawa T, et al. Favorable effect of 4-phenylacetate on liver functions attributable to enhanced bile salt export pump expression in ornithine transcarbamylase-deficient children. *Mol Genet Metab* 2010;100:123-128.
42. Dabrowski M, Bukowy-Bieryllo Z, Zietkiewicz E. Advances in therapeutic use of a drug-stimulated translational readthrough of premature termination codons. *Mol Med* 2018;24:25.

43. Moosajee M, Tracey-White D, Smart M, Weetall M, Torriano S, Kalatzis V, da Cruz L, et al. Functional rescue of REP1 following treatment with PTC124 and novel derivative PTC-414 in human choroideremia fibroblasts and the nonsense-mediated zebrafish model. *Hum Mol Genet* 2016;25:3416-3431.
44. Du L, Jung ME, Damoiseaux R, Completo G, Fike F, Ku JM, Nahas S, et al. A new series of small molecular weight compounds induce read through of all three types of nonsense mutations in the ATM gene. *Mol Ther* 2013;21:1653-1660.
45. Mutyam V, Du M, Xue X, Keeling KM, White EL, Bostwick JR, Rasmussen L, et al. Discovery of Clinically Approved Agents That Promote Suppression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Nonsense Mutations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194:1092-1103.
46. Baradaran-Heravi A, Balgi AD, Zimmerman C, Choi K, Shidmoosavee FS, Tan JS, Bergeaud C, et al. Novel small molecules potentiate premature termination codon readthrough by aminoglycosides. *Nucleic Acids Res* 2016;44:6583-6598.

TABLE AND FIGURE LEGENDS

TABLE 1. Main characteristics of the six PFIC2 patients carrying the six nonsense mutations of *ABCB11* studied *in vitro*.

TABLE 2. Oligonucleotide sequences containing the nonsense mutations of *ABCB11* in their human and rat environments and study of their basal readthrough in NIH3T3 cells.

FIG. 1. Induction of readthrough of human and rat *ABCB11* nonsense mutations.

Oligonucleotide sequences containing the nonsense mutations of BSEP/Bsep: p.Y354X, p.R415X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X and p.E/K1302X were cloned in a dual gene reporter system between lacZ and luciferase sequences and transfected in NIH3T3 cells. Readthrough efficiencies were estimated 24 h after treatment with G418 (200 µg/mL), gentamicin (800 µg/mL), PTC124 (15 µM) or PBS (control). The readthrough efficiency was expressed as the luciferase/β-galactosidase ratio of the tested construct normalized to an in-frame control sequence that did not contain stop codon. Basal and induced readthrough of human (A) and rat (B) oligonucleotide sequences are expressed in percentage (mean +/- SEM, n=3 to 7 independent experiments) of the in-frame control sequence (see methods and Table 1). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ versus control.

FIG. 2. Bsep full-length protein expression after gentamicin-induced readthrough in HEK293 cells.

HEK293 cells were transfected with plasmids containing Bsep-GFP nonsense mutant. 24 h after treatment with gentamicin or PBS (control), cells were immunostained using anti-GFP antibody. Hoechst was used to stain nuclei. (A) Immunodetection of Bsep-GFP mutants by epifluorescence microscopy. Bar: 10 µm. (B) Percentage of cells expressing GFP was assessed as described in the material and methods section. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus control (PBS).

FIG 3. Gentamicin effect on Bsep full-length protein expression in Can 10 cells. Can 10 cells were transfected with plasmids containing Bsep-GFP nonsense mutant. Twenty-four hours after treatment with gentamicin (800-1200 µg/mL) or PBS (control), cells were immunostained using anti-GFP and anti-ZO1 antibodies. (A) Immunodetection of Bsep-GFP by confocal microscopy. Images show the projection of 2 to 3 slides of 0.3 µm; Bar: 10 µm. (B) Percentage of cells expressing GFP was assessed as described in the material and methods section. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, versus control.

FIG. 4. Immunodetection studies of Bsep^{R1090X} in HEK293 cells. HEK293 cells were transfected with plasmids containing Bsep-GFP (WT and R1090X). Cells transfected with Bsep^{R1090X}-GFP were treated for 24 h with gentamicin or PBS (control). (A) Cells were immunostained using anti-GFP and anti-occludine antibodies and examined by confocal microscopy. Images show the projection of 2 to 3 slides of 0.3 µm; Bar: 10 µm. (B) Cells were lysed and cell lysates were analyzed by immunoblotting using anti-GFP and anti-actin antibodies. Each lane was loaded with 30 µg of proteins.

FIG. 5. Effects of 4-PB, UDCA and incubation at 27°C combined to gentamicin treatment on Bsep^{R1090X} expression in Can 10 cells. Can 10 cells were transfected with Bsep^{R1090X}-GFP and treated for 18 h with gentamicin. Then, cells were co-treated with 4-PB (1 mM) and/or UDCA (50 µM) or corresponding vehicles or incubated at 27°C for 24 additional hours. Cells were immunostained using anti-GFP and anti-ZO-1 antibodies and analyzed using epifluorescence microscopy. Percentage of cells expressing Bsep^{R1090X}-GFP in the cytoplasm (in black) and at the canalicular membrane (in gray) was assessed as described in the material and methods section and expressed as means +/- SEM of 3 to 5 independent experiments. GFP positive cells: * $p < 0.02$ and ** $p < 0.005$ versus control 37°C. Canalicular GFP positive cells: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.005$ versus control 37°C. Canalicular GFP positive cells:

§ $p < 0.05$ and §§ $p < 0.02$ versus gentamicin 37°C. 4-PB, 4-phenylbutyrate; UDCA, ursodeoxycholic acid.

FIG. 6. Functional study of Bsep^{R1090X} and effect of gentamicin alone or in combination with 4-PB. Characterization of cellular models: (A, B) MDCK and MDCK clones stably expressing Bsep^{WT}-GFP and/or Ntcp-cMyc were lysed and analyzed by immunoblotting using anti-GFP (A), anti-cMyc (B) and anti-actin antibodies as a loading control. Each lane was loaded with 30 µg of proteins. * Non-specific band. (C) MDCK, MDCK clones stably expressing Bsep^{WT} and/or Ntcp were cultured onto glass coverslips, immunostained using anti-GFP and anti-cMyc antibodies and examined by confocal microscopy. Bsep^{WT}-GFP was expressed at the apical membrane, whereas Ntcp-cMyc was detected at the basolateral membrane of cells. Bar: 10 µm. (D) MDCK clones stably expressing Bsep^{R1090X}-GFP and Ntcp-cMyc were treated with gentamicin or PBS (control) and examined by confocal microscopy. Bsep^{R1090X}-GFP was detected in the cytoplasm and at the apical membrane of the cells only after gentamicin-induced readthrough. Ntcp was detected at the basolateral membrane. Bar: 10 µm.

Studies of vectorial transport of ³H- taurocholate and effect of gentamicin and 4-PB on Bsep^{R1090X} activity. (E) Vectorial transport of ³H-TC in MDCK clones stably expressing Ntcp, Bsep^{WT} or both Bsep^{WT} and Ntcp was assessed as described in the material and methods section. Results (mean +/- SEM of 3 to 6 independent experiments) were expressed as the counts per minute (cpm) normalized to total protein concentration in each insert membrane. *** $p < 0.0001$ versus Ntcp; ### $p < 0.0001$. (F) As described in the material and methods section, MDCK clones stably expressing Bsep^{R1090X}-GFP and Ntcp-cMyc were treated with gentamicin alone or in combination with 4-PB or grown at 30°C and transcellular transport of ³H-TC was measured. Results (means +/- SEM of 3 to 6 independent experiments) were expressed as the

counts per minute (cpm) and normalized to protein amount. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus non-treated cells; and # $p < 0.05$. 4-PB, 4-phenylbutyrate; ^3H -TC, ^3H -taurocholate.

SUPPORTING MATERIAL

Supporting Table 1: Primers (forward and reverse) used for site-directed mutagenesis of Bsep cDNA.

Supporting FIG. 1: Dose effect of gentamicin on readthrough of rat oligonucleotide R1090X sequence. The readthrough efficiency was estimated 24h after treatment with gentamicin (400, 800 and 1200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or PBS (control). Readthrough level was expressed in percentage (mean \pm SEM, $n=3$ to 5 independent experiments) of the in-frame control sequence (see methods). * $p < 0.05$.

Supporting information

Real-Time RT-qPCR. Total RNA was isolated from MDCK Bsep^{R1090X} clone using TRI-Reagent and was converted to complementary DNA (cDNA) using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed using iQ SYBR Green SuperMix (Bio-Rad, Hercules, CA), according to the manufacturer's instructions. Relative expression of Bsep^{R1090X} was quantified using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and β -actin as housekeeping genes. Forward and reverse primers were as follows:

BsepR1090X, 5'-GCCATGACATTCGCTCTCTT-3'

and 5'-CGGTACTGTAAGCGAGAGAA-3'; GAPDH, 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' and 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3';

β -actin, 5'-ATCGTGGGCCCGCCCTAGGCAC-3' and

5'-TGGCCTTAGGGTTCAGAGGGGC-3'.

Table 1. Main characteristics of the six PFIC2 patients carrying the six nonsense mutations of *ABCB11* studied in vitro.

Patient	Mutations in <i>ABCB11</i>	Onset	BSEP IHC	Biliary [BA]	Evolution
1*	c.1062 T>A/c.1062 T>Ap.Y354X/p.Y354X	neonatal	neg	0.02mM	LT
2*	c.1243C>T/ c.1243C>T p.R415X/ p.R415X	neonatal	neg	NA	LT
3	c.1408 C>T/ c.1308+2 T>A p.R470X/p.(?)	neonatal	neg	0.19 mM	LT
4	c.3169C>T/ c.1388C>T p.R1057X/p.T463I	9 months	faint	1 mM	no listed for LT
5*	c.3268 C>T/ c.3268 C>T p.R1090X/ p.R1090X	neonatal	neg	0.02 mM	LT
6	c.3904 G>T/ c.3904 >T p.K1302X/ p.K1302X	neonatal	NA	NA	LT

*, clinical data previously reported (see reference 1). Abbreviations: [BA], bile acid concentration; alloI, post liver transplantation anti-BSEP alloimmunisation; HCC, hepatocellular carcinoma; IHC, immunohistochemistry LT, liver transplanted; NA, not available; neg, negative.

TABLE 2. Basal readthroughs of oligonucleotide sequences containing the stop mutations of BSEP/Bsep.

Species	WT codon	Mutation	Oligonucleotides	Basal Readthrough (%)	SEM
Human	TAT	Y354X	GAAGGAGA A TAA A CACCAGGA	0.031	0.008
Rat	TAT	Y354X	GAAGAAGAG T AA A CACCAGGG	0.012	0.006
Human	CGA	R415X	AAGTTGGAT T GA A TCAAGGGT	0.149	0.016
Rat	CGA	R415X	AAGCTAGACT G AATCAAGGGT	0.111	0.014
Human	AGA	R470X α	CTCATT CAGT GATTCTATGAC	0.041	0.004
Rat	AGA	R470X α	CTCATT CAGT GATTCTATGAC	0.041	0.004
Human	CGA§	R1057X	CTGCTGGACT G ACAACCCCA	0.322	0.067
Rat	CGG§	R1057X	CTGCTAGAT T GA A AACCTCCA	0.047	0.005
Human	CGA	R1090X	TATCCTT C TT G ACCTGACTCG	0.214	0.019
Rat	CGA	R1090X	TATCCTT C TT G ACCCGATATT	0.312	0.039
Human	GAA§	E1302X* α	ACCCATGA A TA A CTGATGGCC	0.128	0.016
Rat	AAA§	K1302X* α	ACCCATGA A TA A CTGATGGCC	0.128	0.016
	TQ : in frame control		CTGTAATTGCTGTTGTGTTCCCTGC	100	

Human and rat oligonucleotide sequences corresponding to the nonsense mutations (in bold) and the nucleotidic environment. Nucleotides in position n-1 and n+1 of the stop codon are highlighted in grey. Basal level readthrough of each sequence is expressed in percentage (mean +/- SEM, n=5 to 6 independent experiments) of the control sequence (see methods). §, indicates that human and rat WT codons are different. *, indicates different amino acids between human and rat wild-type protein and α , indicates that human and rat sequences are the same.

FIGURE 1

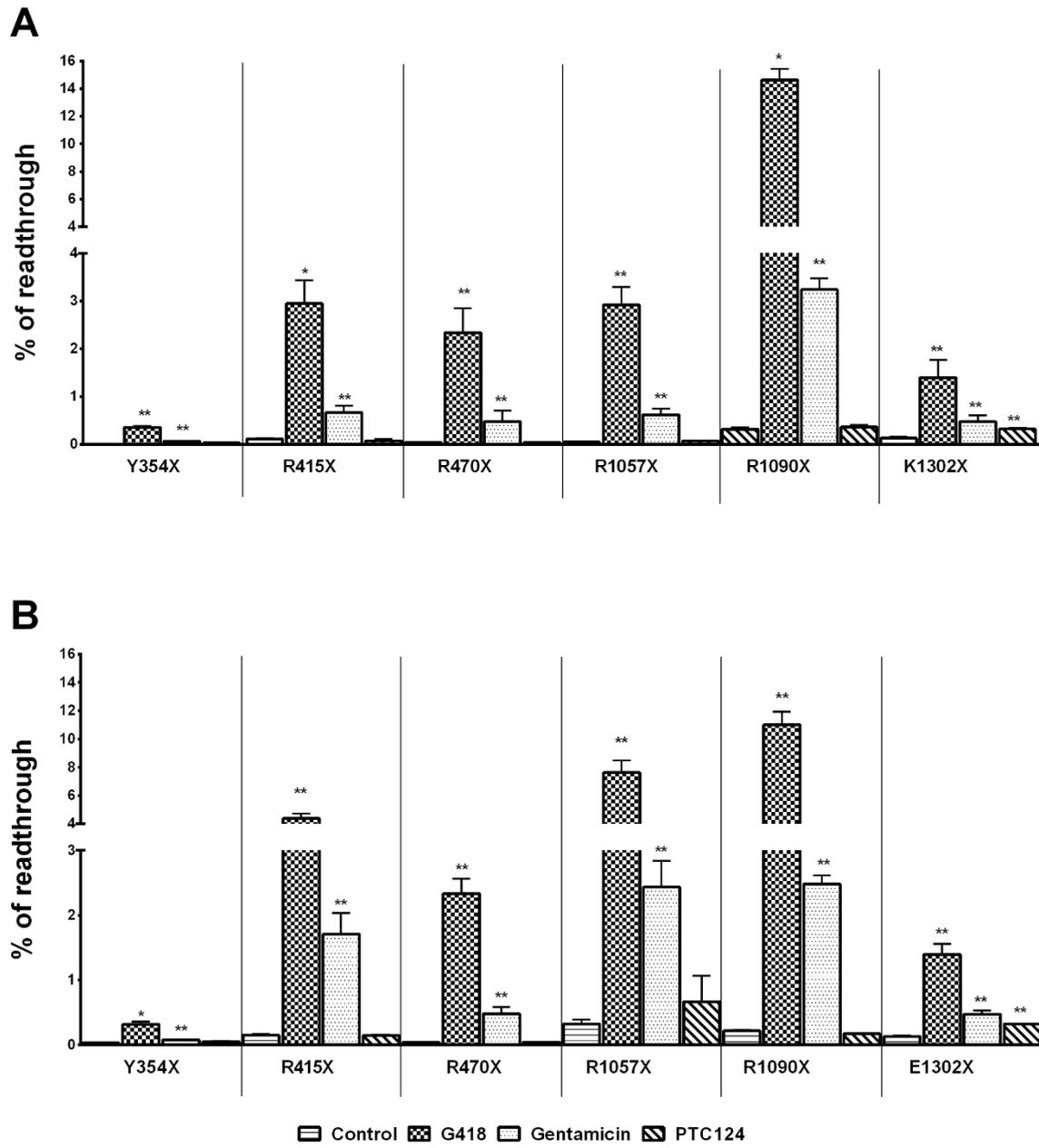


FIGURE 2

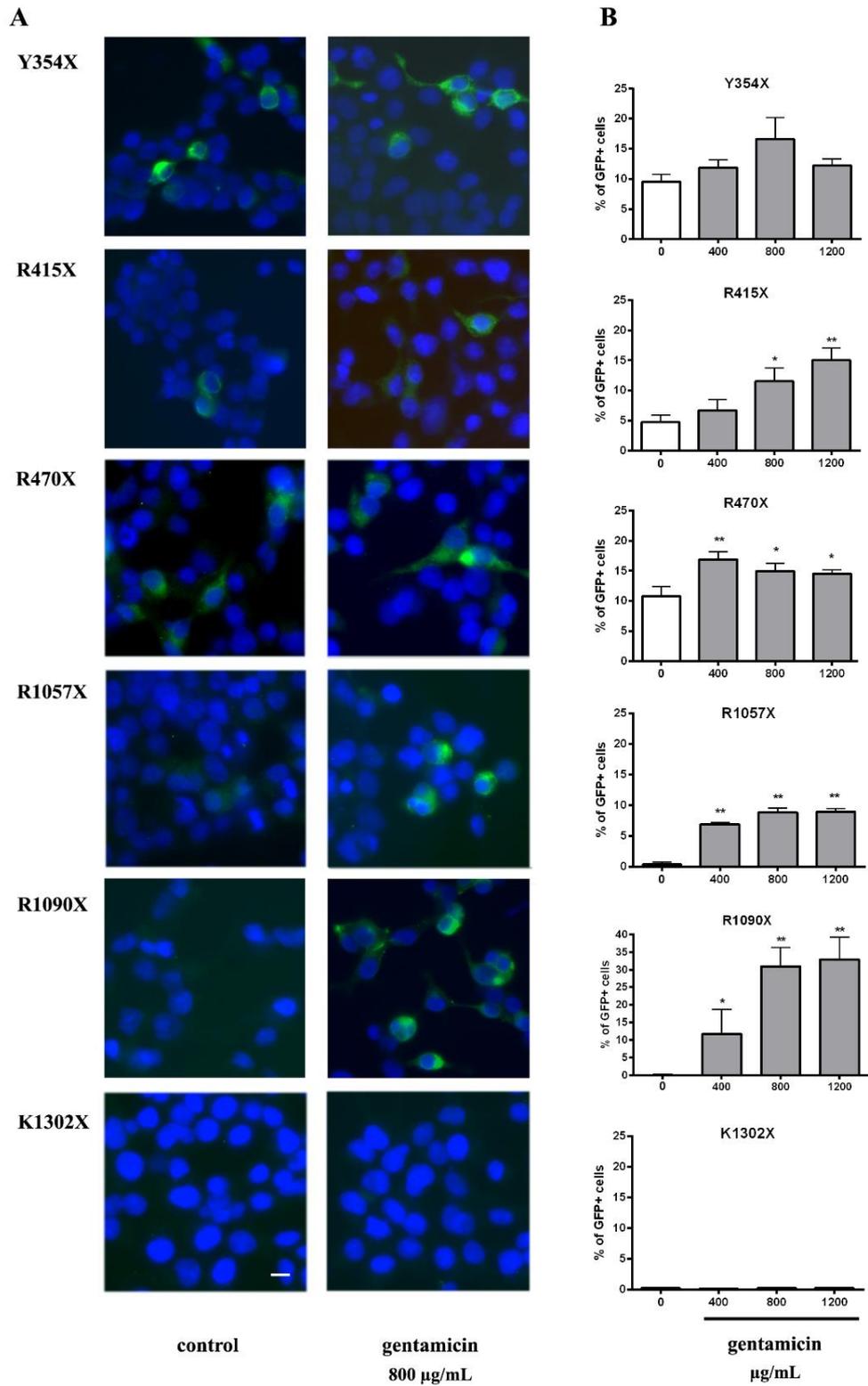
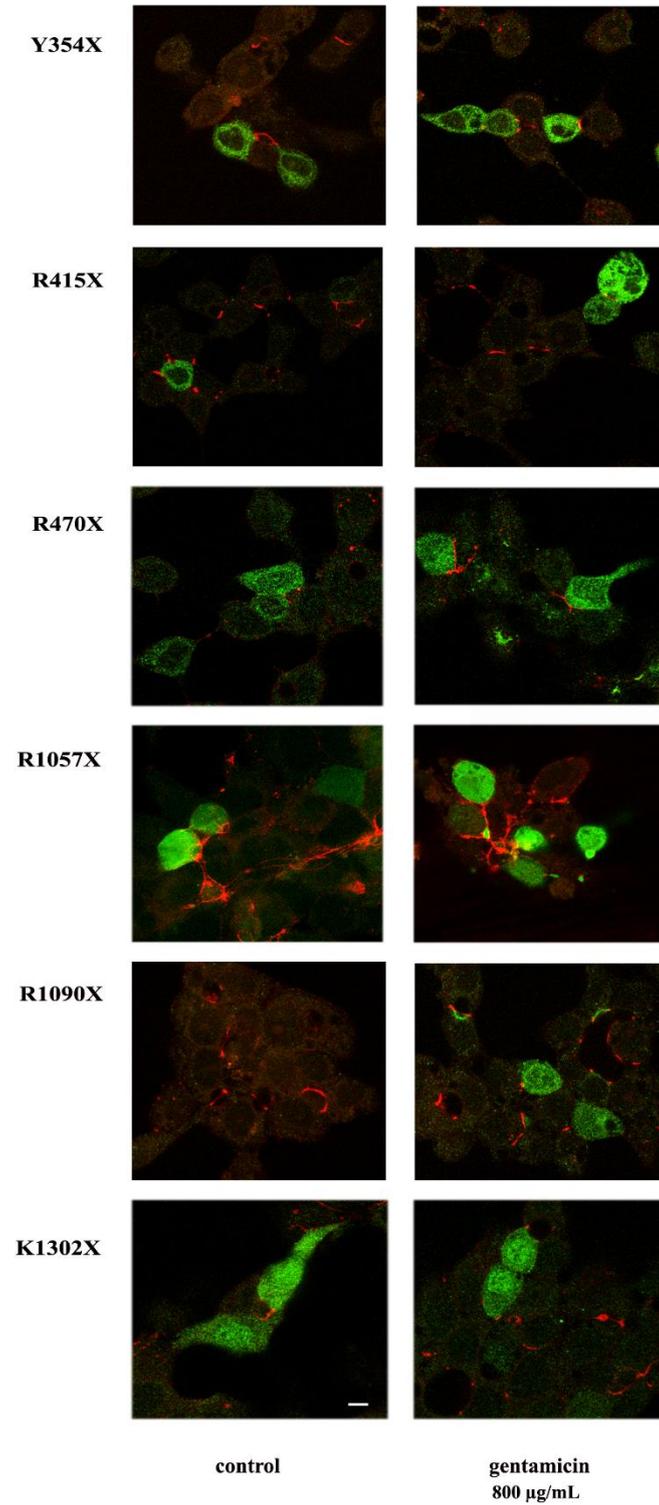


FIGURE 3

A



B

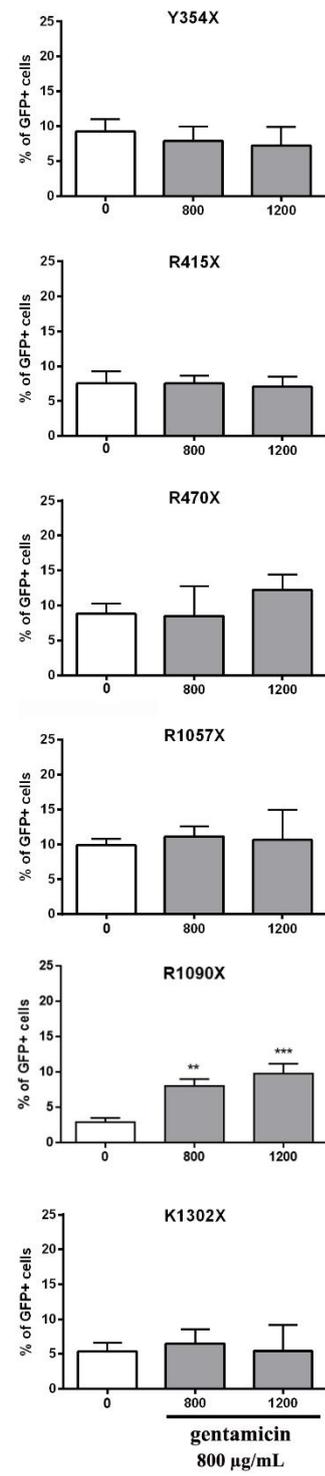


FIGURE 4

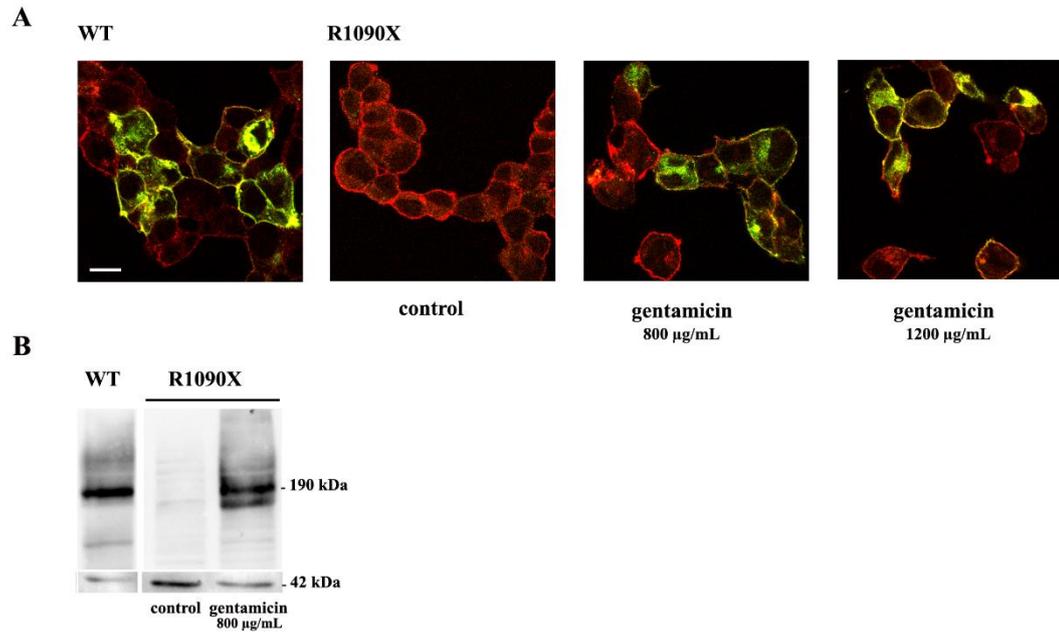


FIGURE 5

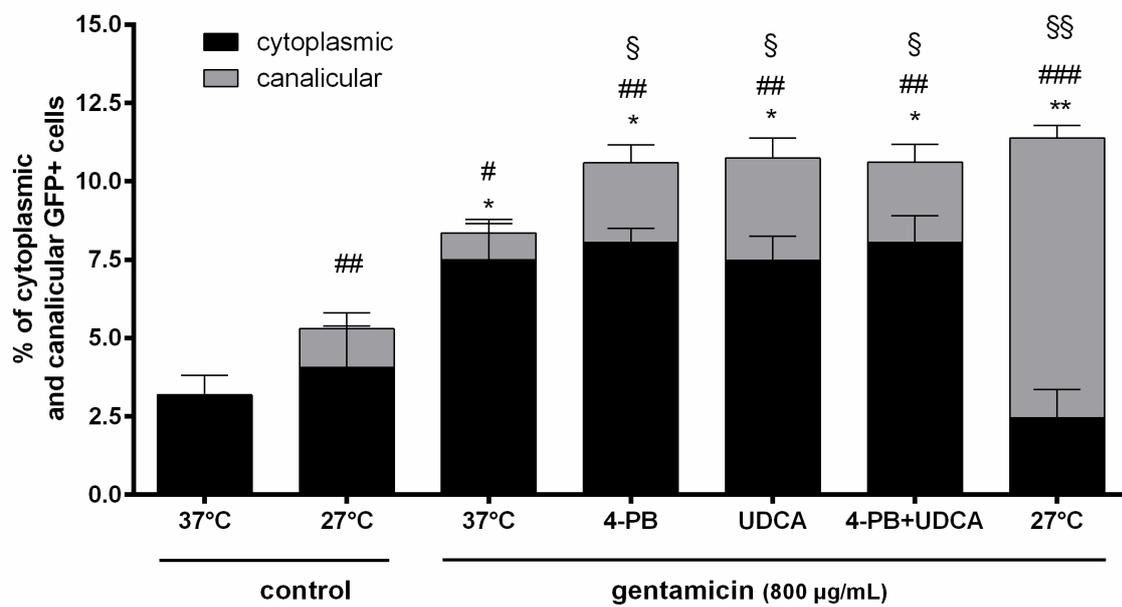
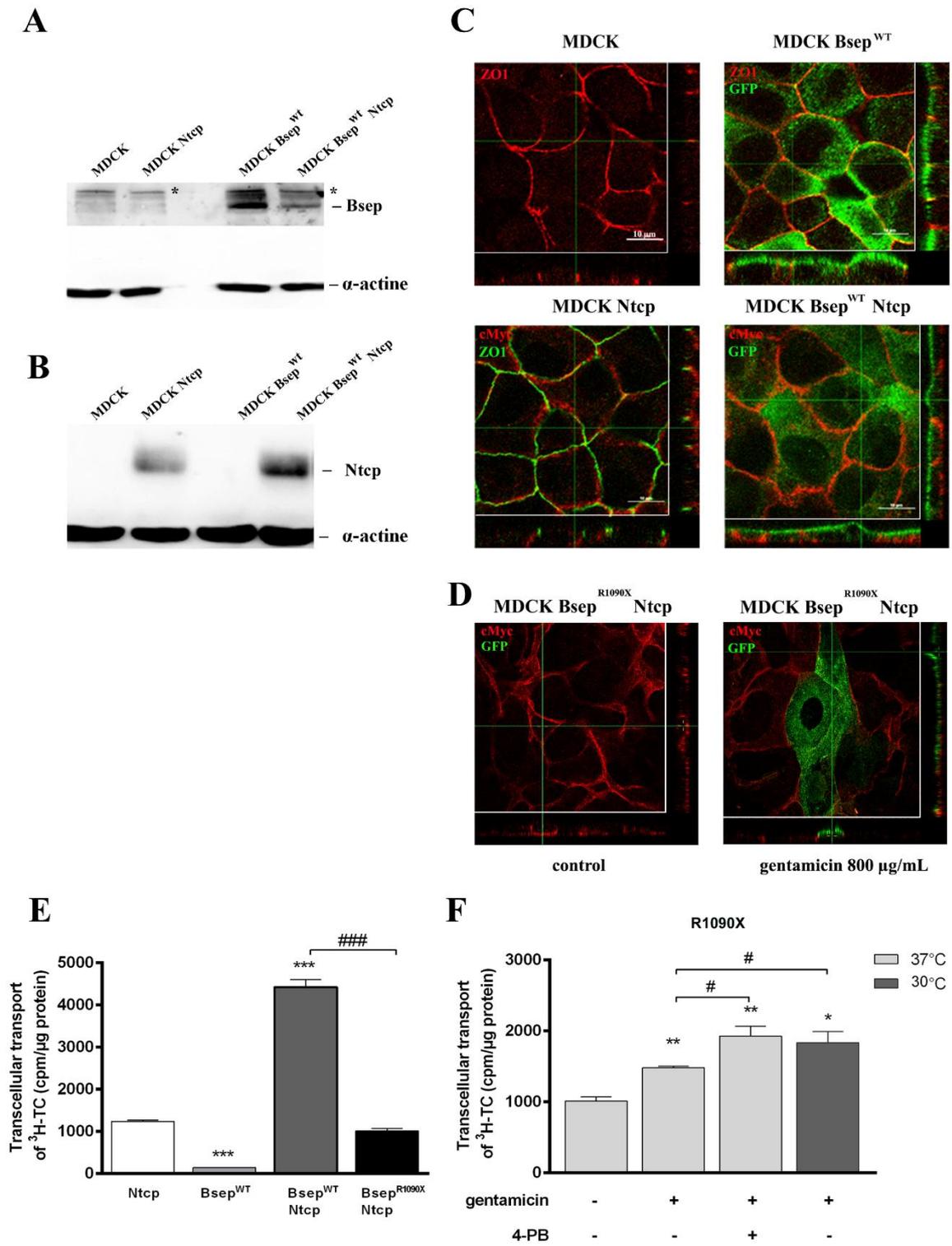


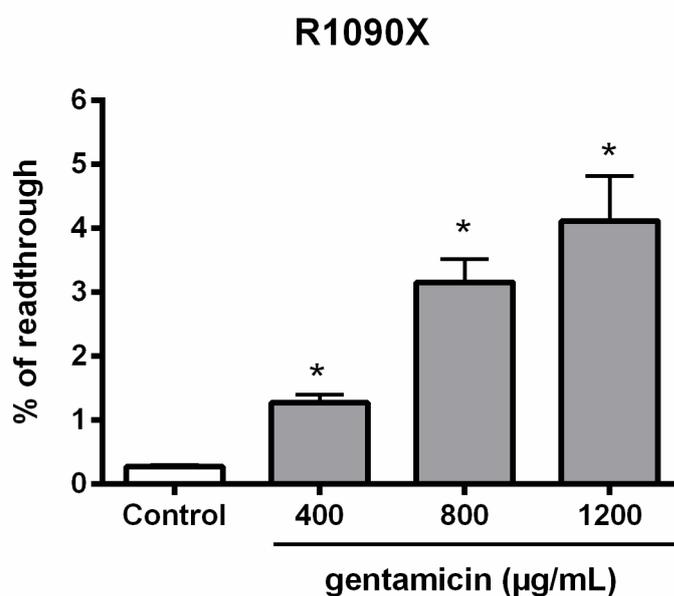
FIGURE 6



SUPPORTING TABLE 1: Primers (forward and reverse) used for site-directed mutagenesis to reproduce the six *ABCB11* nonsense mutations.

Y354X forward	5'-cctagatgaagaagag ta acaccagggacactggtc-3'
Y354X reverse	5'-gaccagtgtccctgggt tt actcttctcatctagg-3'
R 415X forward	5'-gagacggctacaagctagact ga atcaagggtgaaattgag-3'
R 415X reverse	5'-ctcaatttcacccttgatt ca gtct agctttagccgtctc -3'
R470X forward	5'-gcattacagctcattcag tg attctatgaccctgtg-3'
R470X reverse	5'-cacaggggtcatagaat ca ctgaatgagctgtaatgc-3'
R1057X forward	5'-cacgctttttcaactgctagatt ga aaacctccaattaatgtgtacag-3'
R1057X reverse	5'-ctgtacacattaattggagg ttt caatctagcagttgaaaaagcgtg-3'
R1090X forward	5'-cgtatccttct tg accgatattcaagttctg-3'
R1090X reverse	5'-cagaacttgaatatcgg gt caagaaggatacg-3'
K1302X forward	5'-aaaagggacccatgag ta actgatggcccagaag-3'
K1302X reverse	5'-cttctgggcatcag tt actcatgggtccctttt-3'

SUPPORTING FIGURE 1



IV- Article: Chaperone therapy for missense BSEP^{R1128C} mutation responsible for progressive familial intrahepatic cholestasis type 2

CHAPERONE THERAPY FOR MISSENSE BSEP^{R1128C} MUTATION RESPONSIBLE FOR PROGRESSIVE FAMILIAL INTRAHEPATIC CHOLESTASIS TYPE 2

(En préparation)

Rachida Amzal¹, Brigitte Grosse¹, Sylvain petit², Emmanuelle Drège², Delphine Joseph², Emmanuel Jacquemin^{1,3}, Emmanuel Gonzales^{1,3}

¹University of Paris-Sud, Paris-Saclay, INSERM, UMR_S 1174, Hepatinov, Orsay, France.

²Université of Paris-Sud, Paris-Saclay, BioCIS, CNRS, F-92296 Châtenay-Malabry, France.

³Pediatric hepatology and pediatric liver transplantation unit and National Reference Centre for rare pediatric liver diseases, Bicêtre University Hospital, Faculty of Medicine Paris-Sud, University of Paris-Sud, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin Bicêtre, France.

CORRESPONDING AUTHOR : Pr Emmanuel Gonzales, M.D., Ph.D., Service d'Hépatologie et de transplantation hépatique pédiatriques, Département de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France. Tel : 33-1-45-21-37-88. Fax : 33-1-45-21-28-16. E-mail : emmanuel.gonzales@aphp.fr

ABBREVIATIONS : **BSEP:** bile salt export pump; **ER:** endoplasmic reticulum, **GPB:** Glycerol Phenyl Butyric Acid; **HMPB:** 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Acid; **³H-TC:** ³H-taurocholate; **MHMPB:** Methyl 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Ester; **MMPB-2E:** Methyl (*E*)-2-Methyl-4-Phenylbut-3-Enoate ; **MMPB-3E:** Methyl (*E*)-2-Methyl-4-Phenylbut-3-Enoate; **OTNC:** 4-Oxo-1,2,3,4-Tetrahydro-Naphthalene-2-Carboxylic acid; **PA:** Phenyl Acetic Acid; **4-PB:** 4-Phenyl Butyric Acid; **PFIC2:** Progressive Familial Intrahepatic

Cholestasis type 2; **SAHA**: SuberoylAnilide Hydroxamic Acid; **UDCA** : Urso Desoxy Cholic Acid.

ACKNOWLEDGEMENTS : We thank AMFE ("Association Maladies Foie Enfants", Malakoff, France), MLD (Monaco Liver Disorder, Monaco), Association "Pour Louis 1000 Foie Merci" (Fournet Luisans, France), Association "Il était un Foie" (Plouescat, France) and Fondation Rumsey-Cartier (Geneva, Switzerland) for their support. We thank Viral Vector and Gene Transfer Platform (Université Paris Descartes- Sorbonne Paris Cité, Institut Fédératif de Recherche Necker Enfants Malades, Paris, France) for lentiviral particles production and Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics for providing the CFTR corrector compounds. We also be grateful to the University Paris-Sud for financial support.

GRANT SUPPORT : RA was supported by « Association pour la Recherche en Hépatologie Pédiatrique » (CHU Bicêtre, France), « Association Robert Debré pour la recherche médicale » (Paris, France) and by « Association Maladie Foie Enfants » (Malakoff, France).

ABSTRACT

Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) is a severe hepatocellular cholestasis due to biallelic mutations in the *ABCB11* gene encoding the canalicular bile salt export pump (BSEP). Missense mutations such as Bsep^{R1128C} identified in some patients with PFIC2 are unable to traffic into the canalicular membrane. 4-Phenylbutyrate (4-PB) a chaperone drug, has been shown, *in vitro* and *in vivo*, to partially correct mistrafficking as well as clinical improvement with disappearance of pruritus and improved liver tests. However, a relatively high dose (1 mM) is required to show benefic effect. Here, we show that analogues of 4-PB such as 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenylbutyrate (HMPB), Methyl 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Ester (MHMPB) and 4-Oxo-1,2,3,4-Tetrahydro-Naphthalene-2-Carboxylate (OTNC) promote proper trafficking with a potent pharmacological chaperone activity and able to enhance the transport capacity of Bsep^{R1128C} mutant at lower doses. We, also, show that others chaperone drugs such as Glycerol Phenyl Butyric Acid (GPB), Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid (SAHA), C18 and Phenyl Acetate (PA), a metabolite of 4-PB, can partially correct Bsep^{R1128C} targeting and increase the transport of ³H-taurocholate.

Keywords: BSEP, PFIC2, missense mutation, 4-PB, chaperone drug,

INTRODUCTION

Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type 2 (PFIC2), the most severe *ABCB11*-related disease is a rare autosomal recessive disease with a frequency estimated around 1/100 000 births (1, 2). In PFIC2, impaired biliary bile acid excretion leads to a decreased bile flow, bile salt accumulation in hepatocytes, ongoing hepatocellular damage and increased risk of hepatocellular carcinoma. Clinical signs of cholestasis usually appear in the first months of life with jaundice and pruritus. In the liver of most children with PFIC2, BSEP is not detected at the canaliculus (1-3). Patients develop fibrosis and end-stage liver disease before adulthood. Medical therapy with ursodeoxycholic acid (UDCA), rifampicin, and surgical therapy such as biliary diversion may provide some symptomatic relief. Nevertheless, in most cases, liver transplantation is required because of unremitting pruritus, hepatic failure or hepatocellular carcinoma (2). More than 200 mutations have been reported, mostly point mutations (missense, nonsense and splicing) located throughout the gene's 27 exons, but also small deletions, insertions and duplications (1-5). All these mutations can result in truncated or misfolded BSEP proteins that would be subject to quality control mechanisms in the endoplasmic reticulum (ER), thus preventing their expression on the plasma membrane. Wild-type (WT) BSEP is synthesized and folded at the ER. Then, correctly folded BSEP acquires Golgi-related glycosylation and is trafficked to the canalicular membrane. But, the p.R1128C mutation is considered to be folding-defective (misfolded) (6). As a result, it is retained within the cell on the ER, and does not acquire the Golgi-related glycosylation. Targeted pharmacotherapy is a promising personalized therapeutic approach which aims to partially correct the consequence of the mutations identified in a specific patient. It is a field of active research especially in diseases involving protein of the ATP binding cassette (ABC) family such as BSEP (6-8). We and others have shown that some drugs called correctors –able to correct miss-trafficking and to reduce ERAD-, such as 4-phenylbutyrate (4-PB) could be of benefit in BSEP deficiency

including PFIC2 both in vitro and in selected patients carrying specific missense mutations and permits clinical improvement with disappearance of pruritus and improved liver tests (6, 7, 9-11). In vitro studies suggested that some missense Bsep mutants (including Bsep^{G982R}, Bsep^{T1210P}, Bsep^{E297G} and Bsep^{D482G}) might be functional and that treatment with 4-PB could increase bile acids transport function (9, 12-14). The transport function of Bsep^{T1210P} mutant observed after 4-PB treatment correlated with an increase of the protein expression level of this mutant (9).

Although 4-PB can be beneficial for the treatment for PFIC2, a relatively high dose (1 mM or more) is required to rescue the function of the mutant BSEP in vivo. Pharmacological chaperones are low-molecular-weight, organic compounds and protein-stabilizing agents that can help to correct protein folding abnormalities and promote proper trafficking (15, 16). There are various compounds that are consecrated as chemical chaperones, which have extensive actions such as enzyme inhibitors, glycerol, dimethylsulfoxide (DMSO), 4-PB and Glycerol Phenylbutyrate acid (GPB), Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid (SAHA) and curcumin. The advantages of pharmacological chaperones are considered to include high specificity and efficacy at much lower dose levels than 4-PB.

In the present study, we identified two compounds by screening the BioCIS chemical library (a local compounds collection contributed to The French National Compound Library - Chimiothèque Nationale-) by structural homology with 4-PB : Methyl 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenylbutyrate (MHMPB) and 4-Oxo-1,2,3,4-Tetrahydro-Naphthalene-Carboxylate (OTNC) (Fig. 1). Then, we synthesized 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenylbutyrate (HMPB) by saponification (17) of MHMPB (prodrug) as well as Methyl (E)-2-Methyl-4-Phenylbut-3-Enoate (MMPB-3E) and Methyl (E)-2-Methyl-4-Phenylbut-2-Enoate (MMPB-2E) by dehydration (18) of HMPB. All these compounds are structural analogues of 4-PB preserving the pharmacophore elements, a phenyl ring separated from a carboxyl group by a

flexible or semi-rigid three-carbon chain (Fig. 1). We also tested the potential of other chaperone drugs: Glycerol Phenyl Butyric Acid (GPB), a metabolite of 4-PB (Phenyl Acetic Acid, PA), Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid (SAHA), curcumin and small-molecule corrector compound C18 emerged from studies performed on ER- retained *ABCC7*/CFTR mutants (F508del, the most common CFTR mutant impairs protein folding). Except curcumin, MMPB-3E and MMPB-2E, these compounds have a potent pharmacological chaperone activity, promote proper trafficking of Bsep^{R1128C} and are able to enhance bile acids transport capacity of Bsep^{R1128C} mutant at lower doses than 4-PB.

RESULTS

Structure–activity relationship

4-PB is metabolized into PA through a cycle of chain shortening. T. Kasumov et al. (19) identified the presence of the β -hydroxy phenylbutyrate (HPB) metabolite in urine of patients treated with PB allowing to decipher the metabolic pathway of 4-PB into PA. The latter proceeds by the subsequent formation of 4-phenylcrotonate (4-PC), HPB and then β -keto phenylbutyrate (KPB). High structural homology between 4-PC or ferulic acid and MMPB-2E as well as between HPB and HMPB (or the prodrug MHMPB) suggest that the synthetic compounds HMPB, MHMPB, MMPB-2E and MMPB-3E may follow a similar metabolic pathway authorizing the production of the active metabolite (Fig. 1).

ONTC is a constrained analogue of PA (suppression of the conformational freedom of the carboxylic arm). It may be active without prior metabolization.

HMPB and MHMPB: HPB-like structure; could be the active metabolites; could be better absorb thanks to an optimized HLB. MHMPB can be considered as a prodrug of HMPB (Fig. 1).

Effect of chaperone drugs and analogue compounds of 4-PB on canalicular Bsep expression

In Can 10 cells, Bsep^{wt} was, as expected localized at the canalicular membrane. In contrast, Bsep^{R1128C} was not detected at the canalicular membrane but in the cytoplasm instead (Fig. 2, 3). Treatment with 4-PB partially corrected Bsep^{R1128C} targeting to the canalicular membrane. In cells, 4-PB is metabolized in PA, the latter being the "chaperone active" drug. Treatment with PA indeed increased also canalicular expression of Bsep^{R1128C}. Effects of 4-PB and PA were observed in the same range of concentrations. Based on the molecular structure of 4-PB and PA, we screened the BioCIS chemical library and identified two compounds, MHMPB and OTNC with potential chaperone properties. We tested three concentrations for all compounds: 150, 500 μ M and 1 mM (which is the reference concentration of 4-PB). In Can 10 cells, treatment with MHMPB (150 μ M) did not significantly increase the canalicular expression of Bsep^{R1128C} as did OTNC (Fig.3A). At 500 μ M and 1 mM, MHMPB and OTNC had a similar effect as 4-PB and PA and increased significantly the expression of Bsep^{R1128C} at the canalicular membrane (Fig.2, 3B and 3C). We did not observe toxicity of treatments with MHMPB and of OTNC using concentration up to 1mM (data not shown). Thereafter, we synthesized HMPB by saponification of MHMPB (Fig. 1). We observed an increase of a percentage of cells expressing Bsep^{R1128C} when treated by 150, 500 μ M or 1 mM of HMPB suggesting that MHMPB acts as a prodrug of HMPB. This increase was not significantly different from 4-PB except at 1 mM (Fig.3C). In order to mimic the metabolic pathway of 4-PB into PA, (MMPB-3E) and (MMPB-2E) were prepared by dehydration of HMPB (Fig. 1). However, they had no effect on increasing the percentage of Can 10 cells expressing Bsep^{R1128C} at the canalicular membrane (Fig.3A). At 150 μ M, these two molecules were already toxic, that's why we did not test them at higher concentrations.

We also tested GPB (Ravicti®) which is a prodrug, SAHA (Vorinostat®) a synthetic hydroxamic acid derivative which is a member of a larger class of compounds that inhibit histone deacetylases (HDAC) and interesting correctors emerged from studies performed on ER- retained *ABCC7/CFTR* mutants such as C18 (corrector 18). Treatment with GPB (1 mM), SAHA (1 μ M) and C18 (3 μ M) also increased canalicular expression of Bsep^{R1128C}-GFP but to a lesser extent than curcumin (1 μ M) (Fig. 3D).

Functional study of Bsep^{R1128C}

The activity of Bsep^{R1128C} missense mutant was performed in MDCK cells stably co-expressing Bsep^{R1128C} and the basolateral co-transporter Ntcp by measuring the vectorial transport of ³H-TC across MDCK monolayer cultured in insert. The localization of Bsep and Ntcp were assessed by using confocal microscopy. In MDCK Bsep^{R1128C} Ntcp cells, Bsep was localized on the cytoplasm of the cells and Ntcp on the basolateral membrane as shown in figure 4A. After treatment with 4-PB (1 mM), UDCA (50 μ M), PA (1 mM), GPB (1 mM), SAHA (1 μ M), C18 (3 μ M), HMHPB (500 μ M), OTNC and MHPB (150 μ M) but not curcumin (1 μ M), Bsep^{R1128C}-GFP was detected within the cytoplasm and also at the apical membrane of MDCK clones but less prominently than in Can 10 cells (Fig.4A). As shown in figure 5A, treatments with 4-PB (1mM), UDCA (50 μ M) as well incubation at low temperature (30°C), the latter being known to stabilize misfolded mutant proteins (13, 20-23) increased by 40%, 86% and 121% respectively compared to control, the basal to apical flux of ³H-TC across MDCK co-expressing Bsep^{R1128C} and Ntcp. The combination of treatments with 4-PB and UDCA further increased by 153% the transport of ³H-TC (Fig. 5A). These data corroborate the results already obtained during the study of the canalicular expression of Bsep^{R1128C} mutant (6). Treatment with, PA, MHMPB, OTNC, HMPB, GPB, SAHA C18 (doses as indicated below) and incubation at 30°C also increased transport of ³H-TC (Fig.5B, 5C). These compounds are as

efficient as the 4-PB as well for targeting Bsep to the canalicular membrane and as for increasing the activity of the mutant at low doses than 4-PB.

MATERIALS AND METHODS

1- BIOLOGY

DNA constructs and mutagenesis

Patient mutation p.R1128C was introduced in a pEGFP-N1 vector (Clontech,) encoding a rat Bsep/green fluorescent protein (GFP) fusion protein (a gift of JL Boyer, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA) with the following primer forward 5'- CAGCATTTCAGCTGTTGGAATGTTTCTATGATCCCGATCAG - 3', reverse 5' – CTGATCGGGATCATAGAAACATTCCAACAGCTGAATGCTG - 3', using QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene, Santa Clara, CA) according to manufacturer's instructions. Rat Bsep was used because of its high degree of homology with the human ortholog and a higher level of expression in cultured cells (12). The whole constructs were verified by automated Sanger sequencing.

Transfection, treatment and quantification of cells targeting Bsep to the canalicular pole

Can 10, a rat hepatocellular polarized line that express only minimal level of Bsep was used (21). Can 10 cells were plated at 1.5×10^4 .cm⁻² onto glass coverslips (18 mm diameter) in 12well-plates were transiently transfected at day 2 of culture with Bsepwt-GFP or Bsep^{R1128C}-GFP plasmid, using X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Meylan, France; DNA/transfection reagent ratio: 1 µg/2 µL) according to the manufacturer's instructions. Six hours after transfection, cells were either cultured at 30°C or treated for 24 h at 37°C with 4-PB, PA (Biovision, clinisciences, Montrouge, France), MHMPB, OTNC and HMPB (150 µM, 500 µM or 1 mM), GPB (1 mM), SAHA, curcumin (1 µM; Biovision,

clinisciences, Montrouge, France), C18 (3 μ M; Cystic Fibrosis Foundation Therapeutics) or with corresponding vehicle (PBS or DMSO). Then, cells were fixed and immunostained (ice-cold 2% formaldehyde 1 min, then 100% methanol 10 min) using the following primary antibodies mouse anti-GFP (1:80), and rat anti-zonula occludens 1 (ZO-1) (undiluted, obtained from B. Stevenson (24)). Appropriate goat anti-immunoglobulin G Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594 secondary antibodies were used at a dilution of 1:500 as described (6). Cells were examined with a Zeiss Axioskop epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a x40 oil-immersion objective. Images were collected with a CCD camera (Orca, Hamamatsu) and digitized with the HCI imaging software (Hamamatsu).

Cells expressing Bsep^{R1128C}-GFP forming bile canaliculi (BC) were examined by epifluorescence microscopy. BC were identified by phase contrast and by immunolocalization of ZO-1 (a protein present at the tight junctions that seal the BC). The percentage of cells with Bsep-GFP enrichment at the canalicular pole was determined (40-100 cells examined per coverslip, mean of 2 coverslips per culture, 3-9 independent cultures) as previously described (6).

Generation of MDCK clones stably expressed rat Bsep and Ntcp

MDCK cells, a well-characterized polarized kidney cell line allowing vectorial transport, were first transfected with Bsep-GFP (WT or R1128C) using Fugene HD Transfection reagent (Promega, Madison, Wisconsin, USA; DNA/transfection reagent ratio: 1 μ g/4 μ L) according to manufacturer's instructions. Clonal selection of stably transfected cells was obtained with 600 μ g/mL of G418 added 2 days after transfection.

To allow BA entry in MDCK cells, the rat cDNA of Ntcp (Na⁺-taurocholate co-transporting polypeptide, *Slc10A1*), a basolateral BA transporter, was cloned into the lentiviral vector pLenti-cMyc-DDK-IRES-Puro plasmid (PS100069, OriGene, Rockville, MD). Bsep^{WT} and Bsep^{R1128C} expressing MDCK clones, were plated into 60 mm diameter Petri dishes at 1.8×10^5

cells. Twenty-four hours after seeding, cells were infected with lentiviral particles containing the recombinant plasmid at a multiplicity of infection of 30 and recombinants were selected with 3 µg/mL puromycin (Ozyme, Paris, France). Expression of Bsep-GFP and Ntcp-cMyc were examined by immunolocalization using rabbit anti-GFP (1:500) and mouse anti-cMyc (1:250, BD Pharmigene, San Diego, CA) as described in the previous section and by immunoblotting. Briefly, cells were lysed as previously described (25) and immunoblotting was performed with specific primary antibodies against mouse GFP (1:500), rabbit actin (1:1000, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO) and mouse cMyc (1:500). Appropriate peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) were used to detect peroxidase activity by chemiluminescence.

Functional study: vectorial taurocholate transport assay

MDCK clones stably expressing Bsep-GFP and/or Ntcp-cMyc were seeded on polyethylene terephthalate membrane inserts (pore size 3 µm; BD Falcon) in 24-well plates at a density of 1.4×10^5 cells per insert. During the five following days, the integrity of cells monolayer was assessed by transepithelial electrical resistance (TEER) measuring and Lucifer yellow (LY) permeability test (26). The cell monolayers were treated for 24 h at 37°C with 4-PB, PA, GPB (1 mM), UDCA (50 µM), SAHA (1 µM), C18 (3 µM), HMHPB (500 µM), ONTC and MHPB (150 µM), vehicle (PBS or DMSO), or grown at 30°C. Thereafter, culture medium was replaced by prewarmed transport buffer (118 mM NaCl, 23.8 mM NaHCO₃, 4.83 mM KCl, 0.96 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 12.5 mM HEPES, 5 mM glucose, and 1.53 mM CaCl₂, adjusted to pH 7.4) (27) in apical and basal compartments, in the presence of 3H-taurocholate (3H-TC) (0.1 µM, 1 µCi/mL, Perkin Elmer, Waltham, MA) and taurocholate (TC) (0.9 µM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) in the basal compartment. After 2 hours, the radioactivity in the apical compartment was measured by scintillation counter (Hidex 300 SL, Hidex Turku, Finland). Aliquots (50 µL) of cell lysate (120 µL 1% Triton X-100) were used to determine

protein concentration by using the BCA Protein Assay Kit (BioRad, Marnes-La-Coquette, France), according to the manufacturer's instructions. All transport data were expressed as a count per minute normalized to total protein concentration in each insert.

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 6 (San Diego, CA) and are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean). Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney test, with a P value < 0.05 being considered statistically significant.

2- CHEMISTRY

Materials

Commercially available reagents were used throughout without further purification other than those detailed below. Prior to use, THF was dried by means of a solvent purifier system. All anhydrous reactions were carried out under argon atmosphere. Analytical thin layer chromatography was performed on 60F-254 precoated silica (0.2 mm) on glass and was revealed by UV light and K \ddot{a} gi-Misher reagent. Flash chromatography separations were carried out on silica gel (40-63 μ m). Infrared (IR) spectra were obtained as neat films. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded respectively at 300 or 400 MHz and 75 or 100 MHz unless otherwise specified. The chemical shifts for ^1H NMR were recorded in ppm downfield from tetramethylsilane (TMS) with the deuterated solvent resonance as the internal standard. Coupling constants (J) are reported in Hz and refer to apparent peak multiplications. HRMS (ESI) analyses realized with a time-of-flight mass spectrometer yielded ion mass/charge (m/z) ratios in atomic mass units. The atmospheric pressure chemical ionization (APCI) mass spectra were recorded on a quadrupole time-of-flight mass spectrometer. Purity of synthesized compounds was determined by reverse phase HPLC using a 150 mm x 2.1 mm (3.5 μ m)

C18-column: compounds were eluted over 20 min with a gradient from 95% ACN/ 5% water/ 0.2% FA to 5% ACN/ 95% water/ 0.2% FA. All compounds were purified to > 95% purity as determined by HPLC.

OTNC and MHMPB were synthesized according to the procedure described in the literature. Their physical data are congruent with the published ones (28, 29).

Synthetic procedures

Methyl 3-hydroxy-2-methyl-4-phenyl butyric ester (MHMPB)

To a solution of LDA freshly prepared from diisopropylamine (4.14 g, 40.9 mmol) and 28.5 mL of n-BuLi (1.44 mmol/mL hexane) in 100 mL THF, is added dropwise methyl propionate (3.9 mL, 3.60 g, 40.8 mmol) at -78°C. The mixture is stirred during 30 min. Then, phenyl ethanal (2.45 g, 20.4 mmol) is rapidly added at -78°C. After 30 min of stirring, the reaction mixture is allowed to warm at -35°C and the reaction is quenched by the sequential addition of 15 mL of aqueous THF (1:1 v/v) and 15 mL of a saturated NH₄Cl solution. The solution is neutralized with concentrated HCl and extracted twice with diethyl ether (2 x 100 mL). The combined organic layers are washed with a 5% HCl solution (2 x 50 mL), water (50 mL) and a saturated NaCl solution (50 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under vacuum to afford a crude oil (4.60 g). Distillation at 102°C/1 Torr yielded 3.2 g (75%) of 3:1 diastereomeric mixture of **MHMPB**, IR (neat, cm⁻¹): 3510, 3425, 2980, 1735, 1270, 1140, 700; ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 7.35-7.22 (m, 5H_{Ar}), 4.21-3.90 (m, CH-O), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 2.7-2.2 (m, 1H, CH-CO), 2.31 (br s, 1H, OH), 2.93-2.53 (m, 2H, CH₂), 1.23 (d, J = 7.3 Hz, 3H, CH₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ 176.3, 175.9 (CO), 138.3, 138.2 (C_{Ar}), 129.5, 129.3 (2 x CH_{Ar}), 128.4 (2 x CH_{Ar}), 126.4 (CH_{Ar}), 74.3, 73.0 (CH₃O), 51.7 (CH-O), 44.5, 44.0 (CH), 41.0, 40.6 (CH₂), 14.1, 12.1 (CH₃); Anal. calcd. for C₁₂H₁₆O₃: C 69.21, H 7.74; found C, 69.31, H 7.70.

3-hydroxy-2-methyl-4-phenyl butyric acid (HMPB):

To a solution of **MHMPB** (278 mg, 1.3 mmol) in aqueous THF (3.7 mL; 1:1 v/v), lithium hydroxide (32 mg, 1.3 mmol) is added at room temperature and the mixture is stirred for 12 h. The aqueous phase was washed with ethyl acetate (5 mL), and the aqueous phase was acidified at 0 °C with a 1N HCl solution. The precipitate is filtered and recrystallized in acetone/hexane to afford **HMPB** as white crystals (114 mg, 44% yield). The 100 % purity of **HMPB** ($t_R = 10.88$ min) was determined by reverse phase HPLC ($\lambda = 254$ nm). ^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6): δ : 10.68 (br s, 1H), 7.28-7.17 (m, 5H), 4.16 (dt, $J = 7.7, 5.0$ Hz, 1H), 3.85 (br s, 1H), 2.83 (dd, $J = 13.6, 5.2$ Hz, 1H), 2.74 (dd, $J = 13.6, 8.1$ Hz, 1H), 2.48 (qd, $J = 7.1, 5.2$ Hz, 1H), 1.23 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, acetone- d_6): δ 176.77 (C=O), 140.41 (C_{Ar}), 130.36 (2 CH_{Ar}), 129.12 (2 CH_{Ar}), 126.98 (CH_{Ar}), 73.91 (CH-O), 45.22 (CH-CO), 42.12 (CH_2), 11.78 (CH_3); HRMS (m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_3$, 195.1016; found 195.1067.

General procedure for methyl (*E*)-2-Methyl-4-phenylbut-3-enoate (MMPB-3E) and Methyl (*E*)-2-methyl-4-phenylbut-2-enoate (MMPB-2E)

To a solution of MHMPB (194 mg, 1 mmol) and DMAP (244 mg, 2 mmol) in THF (2 mL, 0.4 M) was added 4-nitrobenzenesulfonyl chloride (222 mg, 1 mmol) at room temperature. The mixture was heated at 40 °C for 2h. The crude is extracted with ethyl acetate and washed successively with a 1 N HCl solution, a saturated NaHCO_3 solution then brine. The organic phase was dried over MgSO_4 and concentrated under vacuum to afford an oily liquid (177 mg, 93% yield) with respectively a ratio of (**MMPB-3E** / **MMPB-2E**) (7/3). The both isomers were separated on a Xbridge column with an isocratic eluent water/methanol 4/6 and fully characterized. Physical data of **MMPB-3E** are in accordance with literature (30).

MMPB-3E : ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.24 - 7.37 (m, 5 H_{Ar}), 6.48 (d, $J = 16.2$ Hz, 1 H), 6.28 (dd, $J = 16.2$ Hz, $J = 7.1$ Hz, 1 H), 3.71 (s, 3H), 3.33 (m, 1 H), 1.37 (d, $J = 1.1$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 175.1 (C=O), 136.8 (C_{Ar}), 131.2 (=CH), 128.6 (2 x CH_{Ar}), 128.5 (2 x CH_{Ar}), 127.5 (CH_{Ar}), 126.3 (=CH),

51.9 (OCH₃), 43.1 (CH), 17.4 (CH₃); HRMS (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₂H₁₄O₂, 191.1067; found 191.1116.

MMPB-2E : ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.18-7.31 (m, 5 H_{Ar}), 6.93 (dt, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.4 Hz, 1 H), 3.74 (s, 3 H), 3.54 (d, *J* = 7.2 Hz, 2 H), 1.97 (d, *J* = 1.4 Hz, 3 H); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 168.5 (C=O), 140.4 (C_{Ar}), 139.0 (2 x CH_{Ar}), 128.5 (2 x CH_{Ar}), 128.2 (CH_{Ar}), 127.3 (=C), 126.4 (=CH), 51.8 (OCH₃), 34.9 (CH₂), 12.5 (CH₃); HRMS (*m/z*): [M + H]⁺ calcd for C₁₂H₁₄O₂, 191.1067; found 191.1118.

REFERENCES

1. Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebecauerova D, Rayner A, Dutton L, Meier Y, et al. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* 2008;134:1203-1214.
2. Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, Baussan C, Gonzales E, Stieger B, Bernard O, et al. ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 2010;51:1645-1655.
3. Pawlikowska L, Strautnieks S, Jankowska I, Czubkowski P, Emerick K, Antoniou A, Wanty C, et al. Differences in presentation and progression between severe FIC1 and BSEP deficiencies. *J Hepatol* 2010;53:170-178.
4. Kubitz R, Droge C, Stindt J, Weissenberger K, Haussinger D. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:536-553.
5. Davit-Spraul A, Oliveira C, Gonzales E, Gaignard P, Therond P, Jacquemin E. Liver transcript analysis reveals aberrant splicing due to silent and intronic variations in the ABCB11 gene. *Mol Genet Metab* 2014;113:225-229.
6. Gonzales E, Grosse B, Schuller B, Davit-Spraul A, Conti F, Guettier C, Cassio D, et al. Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology* 2015;62:558-566.
7. 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;57:695-698.
8. Vauthier V, Housset C, Falguieres T. Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters. *Biochem Pharmacol* 2017;136:1-11.

9. Naoi S, Hayashi H, Inoue T, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, Kage M, 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;164:1219-1227 e1213.
10. Hayashi H, Naoi S, Hirose Y, Matsuzaka Y, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, et al. Successful treatment with 4-phenylbutyrate in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 refractory to biliary drainage and bilirubin absorption. *Hepatol Res* 2016;46:192-200.
11. Soroka CJ, Boyer JL. Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: therapeutic implications of BSEP mutations. *Mol Aspects Med* 2014;37:3-14.
12. Wang L, Soroka CJ, Boyer JL. The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest* 2002;110:965-972.
13. 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;45:1506-1516.
14. Kagawa T, Watanabe N, Mochizuki K, Numari A, Ikeno Y, Itoh J, Tanaka H, et al. Phenotypic differences in PFIC2 and BRIC2 correlate with protein stability of mutant Bsep and impaired taurocholate secretion in MDCK II cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G58-67.
15. Brown CR, Hong-Brown LQ, Welch WJ. Correcting temperature-sensitive protein folding defects. *J Clin Invest* 1997;99:1432-1444.
16. Cohen FE, Kelly JW. Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* 2003;426:905-909.
17. White JD AJ, Gut S, Ohira S and JayasingheLR. Stereoselective synthesis of the pyrrolizidine alkaloids (-)-integerrimine and (+)-usaramine. *Organic Chemistry* 1992;57:2270-2284.

18. Kang JH, Benzaria S, Sigano DM, Lewin NE, Pu Y, Peach ML, Blumberg PM, et al. Conformationally constrained analogues of diacylglycerol. 26. Exploring the chemical space surrounding the C1 domain of protein kinase C with DAG-lactones containing aryl groups at the sn-1 and sn-2 positions. *J Med Chem* 2006;49:3185-3203.
19. Kasumov T, Brunengraber LL, Comte B, Puchowicz MA, Jobbins K, Thomas K, David F, et al. New secondary metabolites of phenylbutyrate in humans and rats. *Drug Metab Dispos* 2004;32:10-19.
20. Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, de Bruin J, Elling G, Muller M, et al. A progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 mutation causes an unstable, temperature-sensitive bile salt export pump. *J Hepatol* 2004;40:24-30.
21. Lam P, Pearson CL, Soroka CJ, Xu S, Mennone A, Boyer JL. Levels of plasma membrane expression in progressive and benign mutations of the bile salt export pump (Bsep/Abcb11) correlate with severity of cholestatic diseases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C1709-1716.
22. Wang L, Dong H, Soroka CJ, Wei N, Boyer JL, Hochstrasser M. Degradation of the bile salt export pump at endoplasmic reticulum in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *Hepatology* 2008 ;48:1558-1569.
23. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Delautier D, Rada A, Gautherot J, Jacquemin E, Ait-Slimane T, 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.
24. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986;103:755-766.

25. Bender V, Buschlen S, Cassio D. Expression and localization of hepatocyte domain-specific plasma membrane proteins in hepatoma x fibroblast hybrids and in hepatoma dedifferentiated variants. *J Cell Sci* 1998;111 (Pt 22):3437-3450.
26. Mahdi ZM, Synal-Hermanns U, Yoker A, Locher KP, Stieger B. Role of Multidrug Resistance Protein 3 in Antifungal-Induced Cholestasis. *Mol Pharmacol* 2016;90:23-34.
27. Mita S, Suzuki H, Akita H, Stieger B, Meier PJ, Hofmann AF, Sugiyama Y. Vectorial transport of bile salts across MDCK cells expressing both rat Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide and rat bile salt export pump. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G159-167.
28. Caro Y, Masaguer CF, Ravina E. Preparation of (R)-(-)- and (S)-(+)-3-hydroxymethyl-1-tetralone tosylates, key intermediates in the synthesis of new CNS drugs, via resolution of precursors. *Tetrahedron-Asymmetry* 2003;14:381-387.
29. Reinhout HVDV GJaCH. Reactions of α -aryl carbonyl compounds with lithium ester enolates. *Canadian Journal of Chemistry* 1983;62:2089-2093.
30. Tran L, Deshmukh AR, Biehl E. Facile synthesis of (E)-4-aryl-2-methyl-3-butenic acids and their methyl esters by the condensation of tiglic acid dianion with arynes. *Synthetic Communications* 1996;26:963-971.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Structure of evaluated compounds and synthetic routes of 4-PB derivatives.

Figure 2. Canalicular targeting of Bsep^{R1128C}-GFP in hepatic polarized Can 10 cells. Effect of 4-PB, PA (1 mM), MHMPB (500 μ M) and OTNC, HMPB (150 μ M). Immunolocalization of Bsep^{wt}-GFP and Bsep^{R1128C}-GFP examined by epifluorescence microscopy. Phase contrast of cells and tight junction protein zonula occludens-1 (ZO-1) immunostaining revealed canalicular joint (white point). GFP immunostaining revealed Bsep protein. Bsep-GFP levels

were quantified along the red line. Resulting graphs are shown on the right. * Canaliculus, bar: 5 μm . 4-PB: 4-Phenyl Butyric Acid; HMPB: 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Acid; MHMPB: Methyl 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Ester; OTNC: 4-Oxo-1,2,3,4-Tetrahydro-Naphthalene-2-Carboxylic acid; PA: Phenyl Acetic Acid.

Figure 3. Effect of compounds with potential chaperon properties on canalicular targeting of Bsep^{R1128C}. Quantification of the effect of 4-PB, PA, MHMPB, OTNC, HMPB, MMPB-3E and MMPB-2E at 150 μM (A), 500 μM (B) and 1 mM (C); GPB, SAHA, C18 and curcumin (D) on Bsep^{R1128C}-GFP. Can 10 cells transfected with plasmid containing Bsep^{R1128C}-GFP and were treated for 24 h with 4-PB, PA, MHMPB, OTNC, and HMPB (150 μM , 500 μM or 1 mM), GPB (1 mM), SAHA (1 μM), C18 (3 μM) and curcumin (1 μM) or with corresponding vehicles. Cells were immunostained using anti-GFP and anti-ZO-1 antibodies and analysed using epifluorescence microscopy. Percentage of cells expressing Bsep^{R1128C}-GFP at the canalicular membrane was assessed as described in the material and methods section and expressed as means +/- SEM of 3 to 5 independent experiments. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ as compared to control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ as compared to treatment with 4-PB. 4-PB: 4-Phenyl Butyric Acid; GPB: Glycerol Phenyl Butyric Acid; HMPB: 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Acid; MHMPB: Methyl 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Ester; OTNC: 4-Oxo-1,2,3,4-Tetrahydro-Naphthalene-2-Carboxylic acid; PA: Phenyl Acetic Acid; SAHA: Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid. UDCA: Urso Desoxy Cholic Acid.

Figure 4. Characterization of the functional model. MDCK clones stably expressing Bsep (WT or R1128C) and Ntcp were cultured onto insert membrane, treated with 4-PB (1 mM), UDCA (50 μM) or PA, GPB (1 mM), MHMPB (500 μM), OTNC and HMPB (150 μM), (1 mM) and SAHA (1 μM), C18 (3 μM) or with corresponding vehicles (PBS, DMSO) and

immunostained using anti-GFP and anti-cMyc antibodies and examined by confocal microscopy. Bar: 10 μm . 4-PB: 4-Phenyl Butyric Acid; GPB: Glycerol Phenyl Butyric Acid; HMPB: 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Acid; MHMPB: Methyl 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Ester; OTNC: 4-Oxo-1,2,3,4-Tetrahydro-Naphthalene-2-Carboxylic acid; PA: Phenyl Acetic Acid; SAHA: Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid. UDCA: Urso Desoxy Cholic Acid.

Figure 5. Functional study of Bsep^{R1128C}. Effect of 4-PB and/or UDCA and incubation at 30°C (A) PA, MHMPB, OTNC, HMPB (B), GPB, SAHA, C18 and curcumin (C) on MDCK clones expressing Bsep^{R1128C} and Ntcp. MDCK clones stably expressing Bsep^{R1128C}-GFP and Ntcp-cMyc were incubated at 30°C for 24 h or treated with 4-PB (1mM) and/or UDCA (50 μM) or PA, GPB (1 mM), MHMPB (500 μM), OTNC and HMPB (150 μM), (1 mM) and SAHA (1 μM), C18 (3 μM) or with corresponding vehicles (control). As described in the material and methods section, transcellular transport of ³H-TC was measured. Results (means +/- SEM of 3 to 6 independent experiments) were expressed as the counts per minute (cpm) and normalized to protein amount. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs control. # $p < 0.05$, ##### $p < 0.0001$ vs 4-PB. §§ $p < 0.01$ vs UDCA or MHMPB. ♂ $p < 0.05$ vs OTNC. 4-PB: 4-Phenyl Butyric Acid; GPB: Glycerol Phenyl Butyric Acid; HMPB: 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Acid; ³H-TC: ³H-taurocholate; MHMPB: Methyl 3-Hydroxy-2-Methyl-4-Phenyl Butyric Ester; OTNC: 4-Oxo-1,2,3,4-Tetrahydro-Naphthalene-2-Carboxylic acid; PA: Phenyl Acetic Acid; SAHA: Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid. UDCA: Urso Desoxy Cholic Acid.

FIGURES

Figure 1

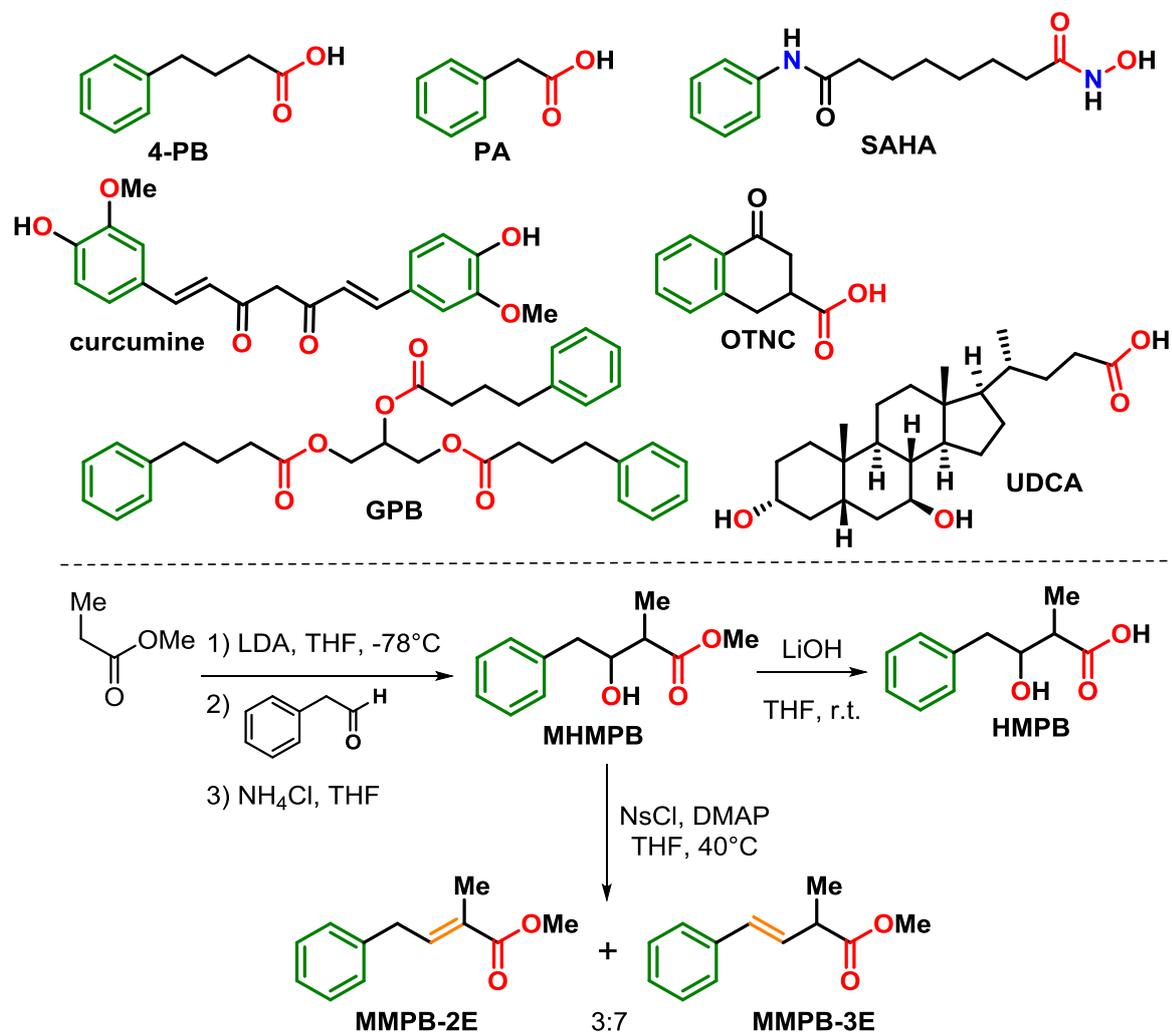


Figure 2

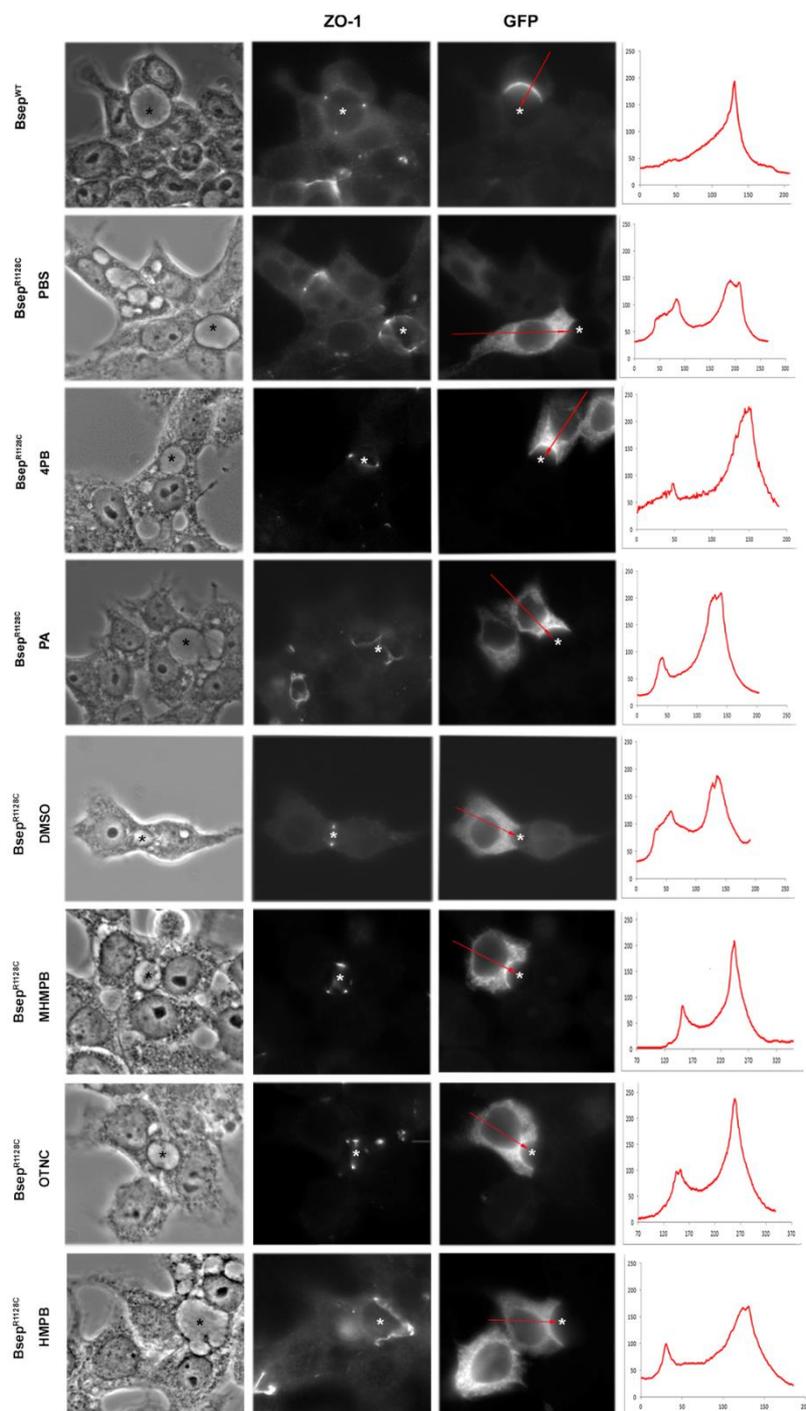


Figure 3

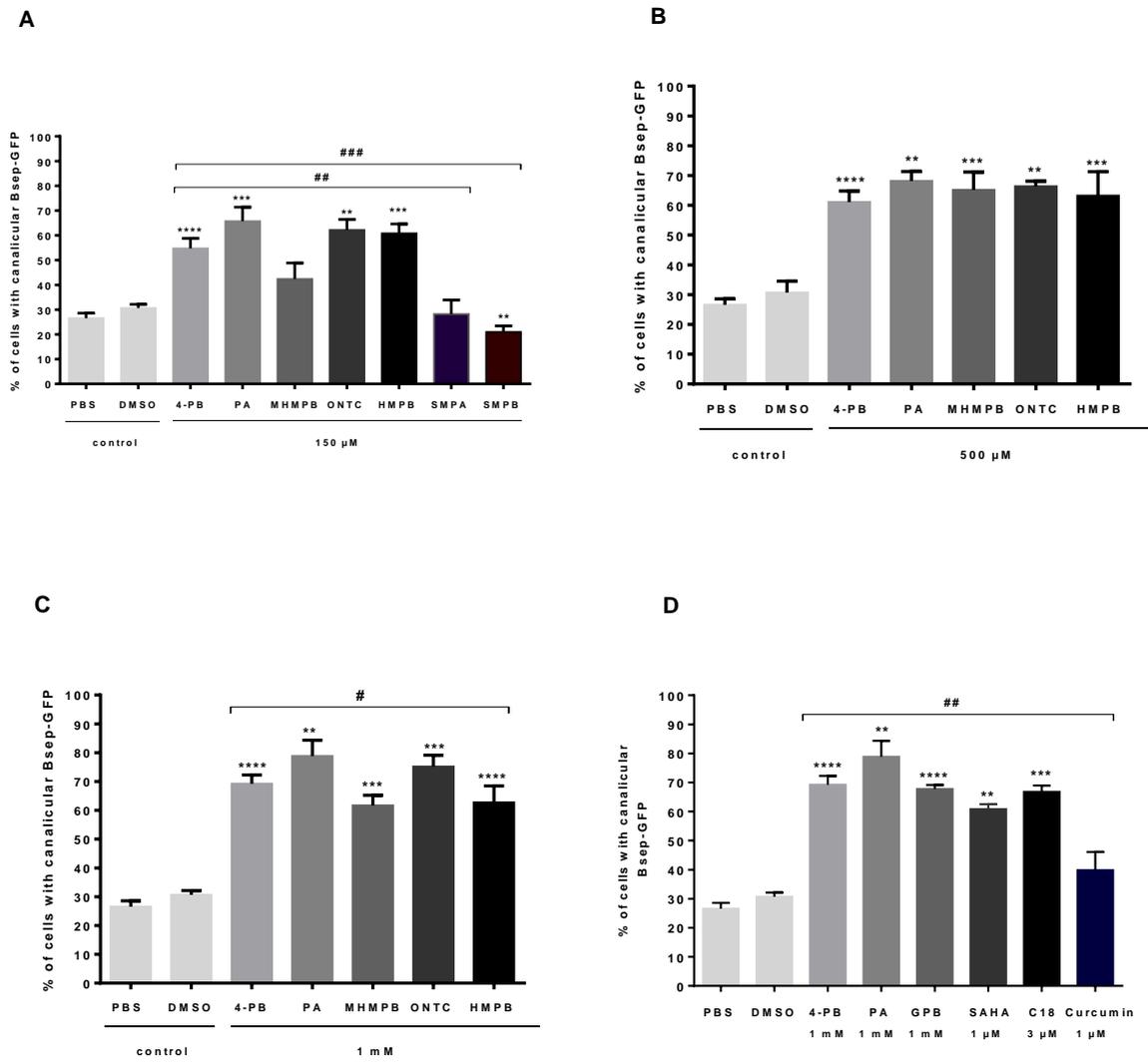


Figure 4

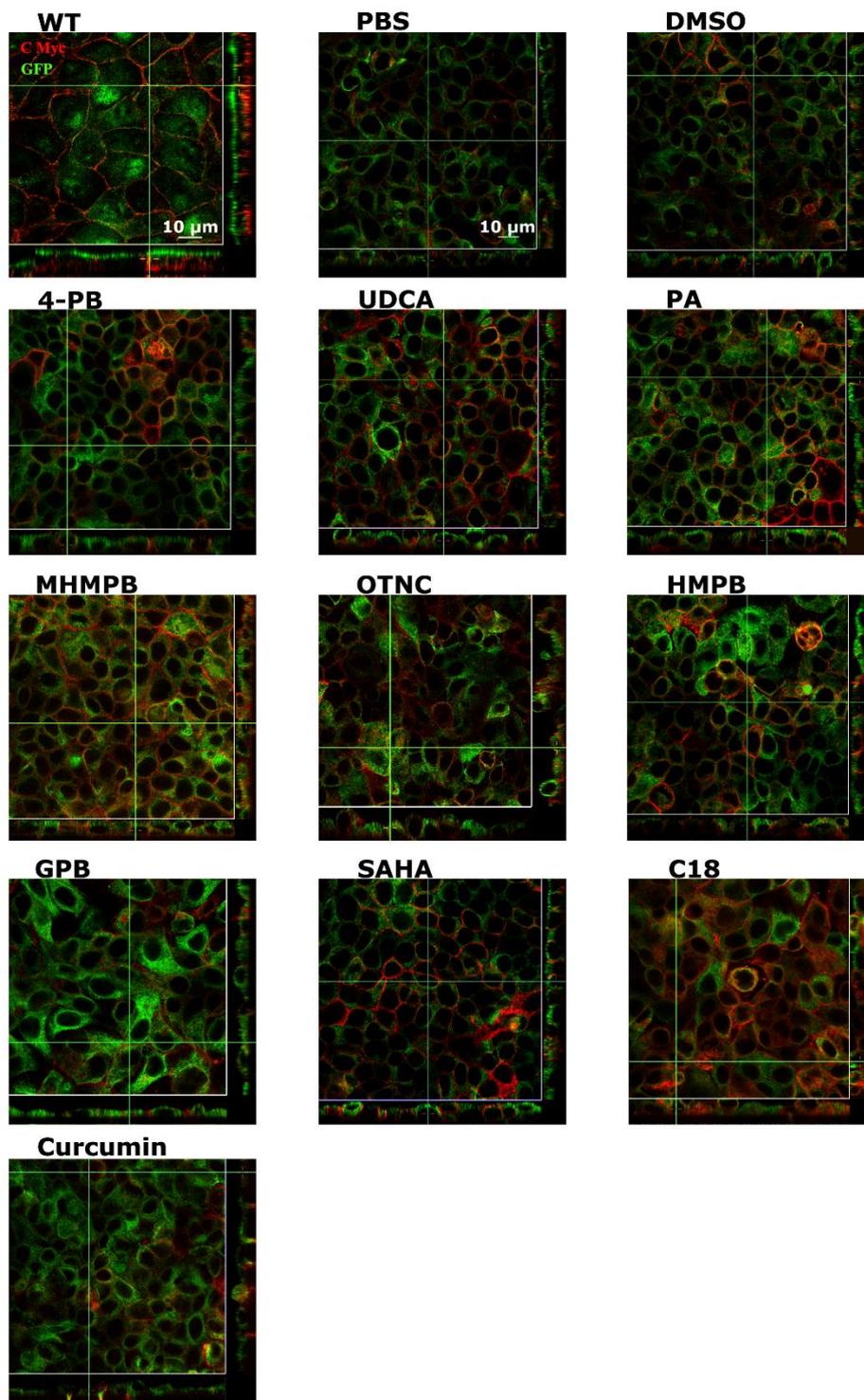
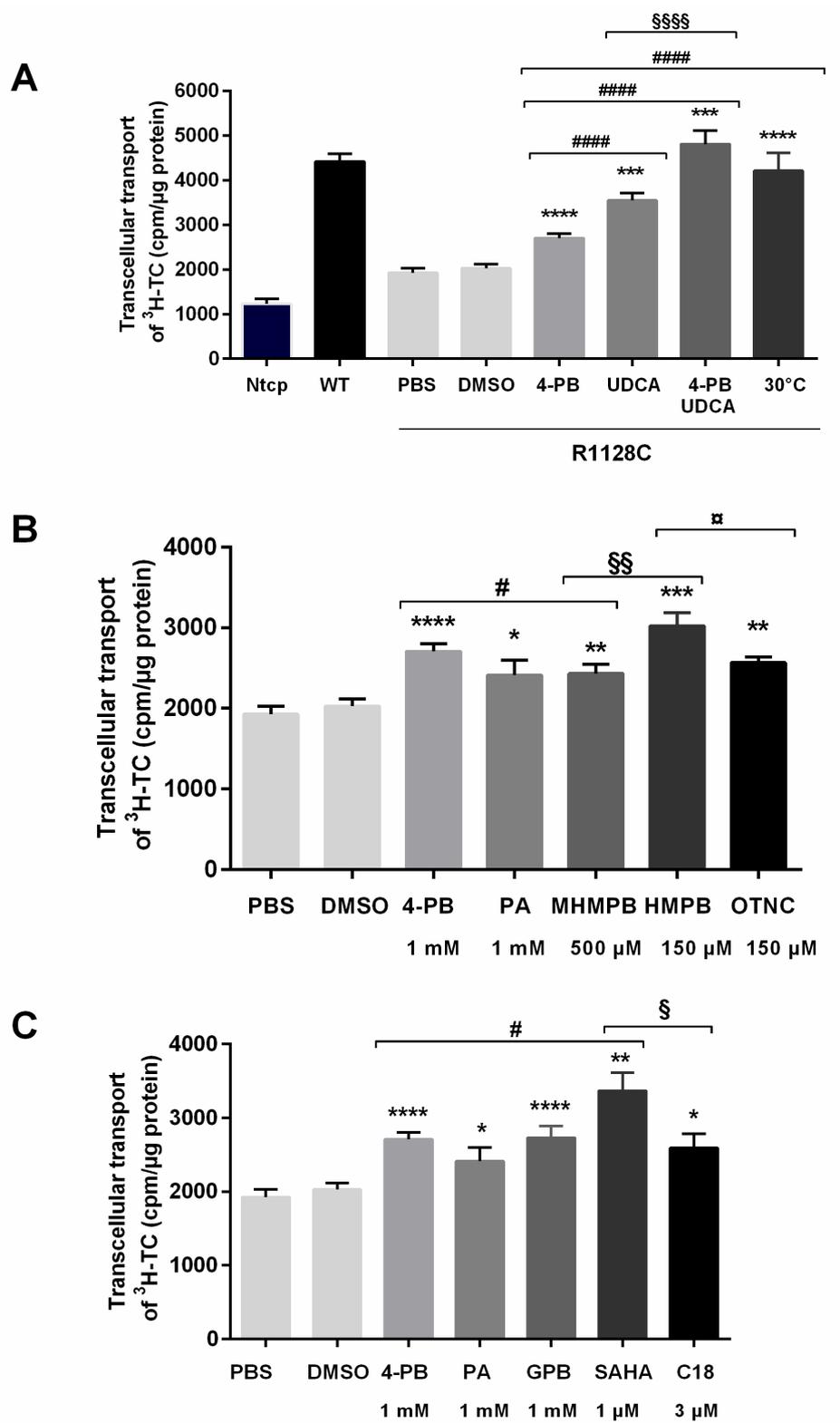


Figure 5



V- Résultats complémentaires

L'importance de l'adressage canaliculaire des mutants translus de Bsep^{R1090X} obtenu après traitement par gentamicine nous a conduit à nous interroger sur la nature de l'acide aminé incorporé lors de la translecture. L'acide aminé qui est incorporé peut-être différent de celui de la protéine sauvage lors du saut du codon-stop prématuré. Il a été montré que selon la nature du CSP, plusieurs possibilités de décodage peuvent exister. Le codon UGA est le plus souvent décodé en tryptophane (W), mais il peut également être décodé par les ARNt cystéine (C) ou de l'arginine (R). L'UAA est décodé en glutamine et l'UAG est décodé soit en glutamine (G), tryptophane (W), tyrosine (Y) ou lysine (L). Bsep^{R1090X} se retrouve dans le premier cas de figure (porteur du codon UGA). L'arginine correspond à l'acide aminé sauvage générant la protéine sauvage Bsep^{WT}. Nous avons généré, par mutagenèse dirigée, les deux mutants faux sens possibles de Bsep^{R1090X} : Bsep^{R1090C} et Bsep^{R1090W}.

1- Caractérisation des mutants faux sens Bsep^{R1090C} et Bsep^{R1090W}

A- Localisation et quantification de l'adressage aux canalicules: les mutants faux sens Bsep^{R1090C} et Bsep^{R1090W} sont correctement adressés

La lignée Can 10 caractérisée au laboratoire présentant une polarité de type hépatocytaire formant des canalicules biliaires a été utilisée pour l'étude de la localisation des protéines et la quantification de l'adressage canaliculaire. L'immunomarquage GFP/ZO1 nous a permis d'évaluer l'adressage canaliculaire des mutants faux sens dans cette lignée. La figure 29 illustre les marquages de ces mutants obtenus ainsi que les comptages réalisés. Pratiquement toutes les cellules transfectées expriment ces 2 mutants faux sens aux canalicules.

Les cellules Can 10 ont été transfectées transitoirement avec les plasmides Bsep^{R1090C} et Bsep^{R1090W}. En microscopie confocale, nous observons que sans aucun traitement, les deux mutants sont correctement adressés à la membrane canaliculaire. Ce marquage est comparable à celui de la protéine sauvage Bsep^{WT}. En microscopie à épifluorescence, nous avons quantifié le pourcentage de cellules adressées au canalicule. Les résultats de quantification sont représentés dans la figure 29B. Plus de 80% des cellules présentent un marquage canaliculaire pour les deux mutants faux sens contre presque 100% pour la protéine sauvage. Ces deux mutations n'affectent pas le trafic intracellulaire de Bsep à la membrane canaliculaire.

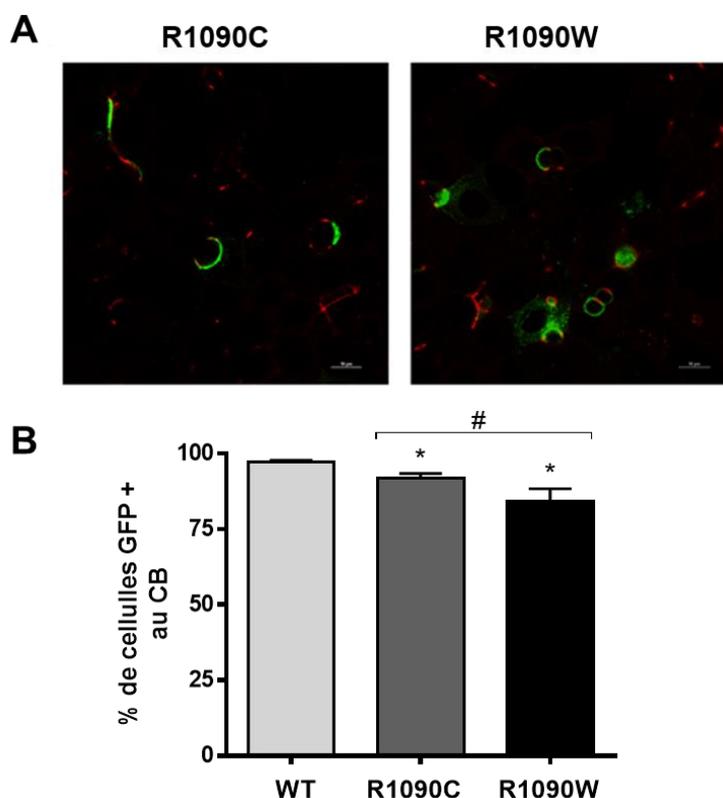


Figure 29 : Caractérisation des mutations faux sens p.R1090C et p.R1090W dans la lignée Can 10. (A) Localisation cellulaire de Bsep^{R1090C} et Bsep^{R1090W}. Un double immunomarquage GFP (vert)/ZO-1 (rouge) a été réalisé. Les images sont réalisées au microscope confocal et représentent une projection de 2 à 3 coupes de 0.3µm ; Barre : 10 µm. (B) Quantification de l'adressage aux canalicules. Le comptage des cellules Can 10 avec un canalicule biliaire marqué (CB+) a été effectué en microscopie à épifluorescence. Les résultats sont exprimés en pourcentage de CB+/CB total. Les résultats sont exprimés en moyenne des pourcentages ± SEM de 3 expériences indépendantes. * p < 0,05 versus WT et # p < 0,05.

B- Analyse fonctionnelle : les mutants Bsep^{R1090C} et Bsep^{R1090W} ne sont pas fonctionnels

L'activité des deux mutants faux sens potentiellement générés après translecture du mutant non-sens Bsep^{R1090X} a été évaluée. Grâce au test fonctionnel, le transport vectoriel (du pôle basal vers le pôle apical) du ³H-TC a été mesuré dans les cellules MDCK exprimant de manière stable les différents mutants ainsi que le transporteur basolatéral des ABs, Ntcp. Ces clones ont été caractérisés par les techniques d'immunodétection. L'expression et la localisation de Bsep et de Ntcp ont été contrôlées en western blot et microscopie confocale, respectivement. En western blot, une bande de 190 kDa dont le poids moléculaire correspond à celui de la protéine Bsep^{WT}-GFP « mature » (après glycosylation) a été détectée dans les cellules MDCK Bsep^{R1090C} et Bsep^{R1090W} Ntcp. Ntcp est également détectée au poids moléculaire attendu (55 kDa) dans toutes les cellules (Figure 30A). La figure 30B, montre une localisation apicale de Bsep et une localisation basolatérale de Ntcp dans MDCK Bsep^{R1090C} et Bsep^{R1090W} Ntcp comparable au marquage obtenu dans MDCK Bsep^{WT} Ntcp.

Après avoir confirmé une localisation correcte des protéines d'intérêt Bsep et Ntcp, le test fonctionnel a pu être réalisé. Les cellules ont été cultivées sur insert. La figure 30 montre que l'activité des deux mutants faux sens potentiellement générés après translecture est réduite d'un facteur 4 et 7 pour Bsep^{R1090C} et Bsep^{R1090W}, respectivement, comparée à la protéine sauvage. Cette activité n'est significativement pas différente du mutant non-sens Bsep^{R1090X}. Cela suggère que ces deux mutants n'ont aucune activité de transport et donc ne sont pas fonctionnels malgré une localisation apicale dans MDCK et canaliculaire dans Can 10.

Les deux mutants faux sens potentiellement générés après translecture du mutant non-sens Bsep^{R1090X} ne sont pas fonctionnels malgré leur localisation correcte au canalicule biliaire.

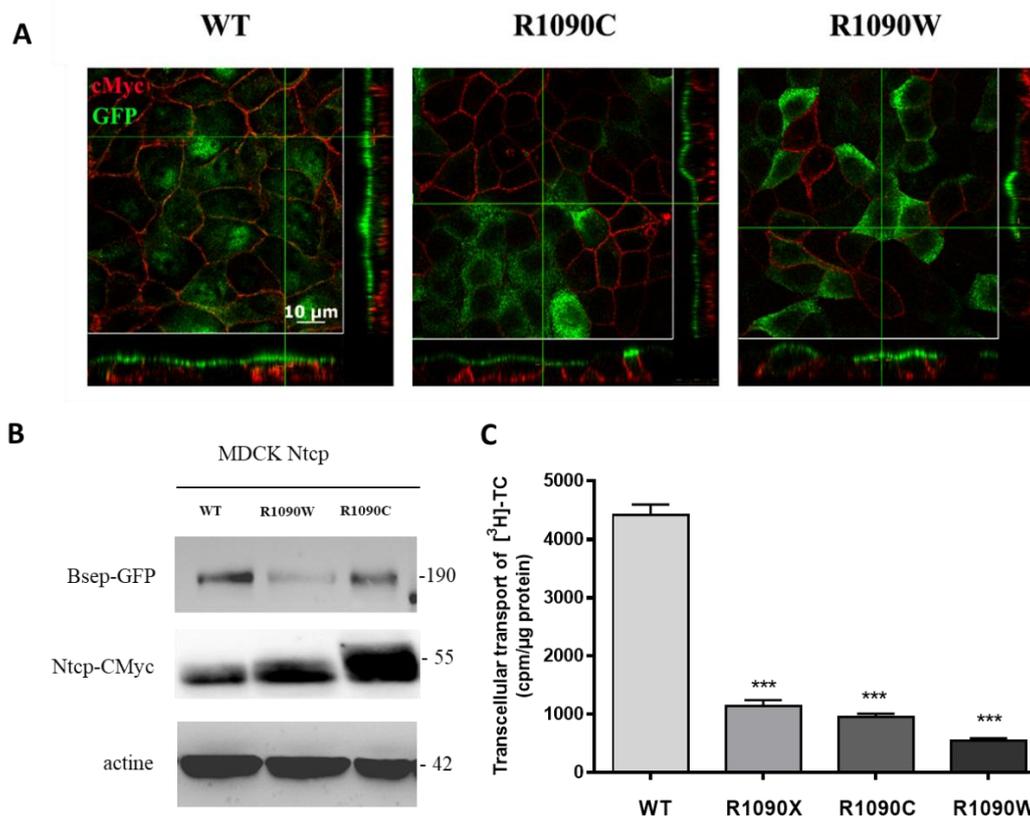


Figure 30 : Caractérisation des mutants faux sens Bsep^{R1090C} et Bsep^{R1090W} et transport vectoriel du ³H-TC, dans la lignée MDCK.

(A) Localisation cellulaire de Bsep et Ntcp. Un double immunomarquage GFP (vert)/ZO1 (rouge) a été réalisé puis les cellules ont été examinées par microscopie confocale. Les parties hors de l'encadré blanc représentent la section en Z de l'image. Barre : 10 μ m. (B) Analyse par western blot de l'expression de Bsep et Ntcp. Réalisé sur 30 μ g de lysat cellulaire des clones MDCK Bsep^{WT, R1090C} et R1090W Ntcp. Les anticorps anti-GFP, anti-cMyc et anti-actine ont permis de révéler Bsep-GFP (WT et mutants) et Ntcp-cMyc et la protéine de référence β -actine, respectivement. (C) Transport vectoriel du ³H-TC. L'activité de transport a été mesurée dans MDCK Bsep^{WT} Ntcp, MDCK Bsep^{1090X} Ntcp, MDCK Bsep^{1090C} Ntcp et MDCK Bsep^{1090W} Ntcp cultivées sur insert pendant 5 jours. 1 μ M de taurocholate (1 μ Ci/mL de ³H-TC et 0,9 μ M de TC non marqué) a été ajouté au compartiment basolatéral. Après 2h, le transport vectoriel du compartiment basolatéral vers le compartiment apical qui correspond à la radioactivité dans le compartiment apical, a été mesuré. Les résultats sont exprimés en coup par minute (cpm)/ μ g de protéines de chaque membrane d'insert (moyenne +/- SEM de 3 à 6 expériences indépendantes). *** $p < 0,001$ versus WT.

2- Validation, *in vitro*, sur le plan fonctionnel des données précédemment publiées

Notre équipe a publié un article sur la pharmacothérapie ciblée de la PFIC2 et l'amélioration de la cholestase avec du 4-PB *in vivo*. Dans cette étude, l'équipe a montré une amélioration de la sécrétion biliaire accompagnée d'une amélioration clinique lors du traitement par voie orale avec le 4-PB. Les quatre patients traités, atteints de PFIC2, présentent au moins une mutation faux-sens (p.R1128C et p.T1210P). *In vitro*, ces mutations ont été reproduites dans un plasmide qui exprime Bsep-GFP. Dans la lignée Can 10, le traitement par le 4-PB, l'UDCA ou la combinaison des deux a permis le ciblage de Bsep muté retenu dans le RE, au canalicule (181). Cependant, l'analyse fonctionnelle, *in vitro*, de la capacité de transport d'ABs de ces mutants faux sens n'avait pas été effectuée.

Après avoir mis au point le test fonctionnel, j'ai validé les données *in vitro* publiées en étudiant l'activité de ces mutants faux sens. La figure 31 illustre les résultats de cette étude. Dans Can 10, les mutants faux sens (p.R1128C et p.T1210P) ont été détectés dans le RE au lieu de la membrane canaliculaire comme c'est le cas de la protéine sauvage Bsep^{WT} et du mutant faux sens p.A257V. Le trafic de Bsep^{A257V} n'est pas impacté comme le montre son adressage correct au canalicule biliaire. Le traitement par le 4-PB, l'UDCA ou la combinaison des deux ainsi que l'abaissement de température lors de la culture des cellules à 27°C a partiellement corrigé l'adressage des mutants Bsep^{R1128C} et Bsep^{T1210P} en augmentant le pourcentage de cellules GFP positives à la membrane canaliculaire (Figure 31A, (181)).

Pour étudier, *in vitro*, la fonction de ces mutants, nous avons généré les différents clones MDCK exprimant de manière stable ces mutants faux sens. Ces clones sont ensuite transduits avec les particules lentivirales afin d'exprimer Ntcp en basolatéral. Comme pour l'étude précédente, nous avons vérifié en western blot et en microscopie confocale l'expression de Bsep et Ntcp dans les différents clones MDCK. La figure 31B montre une bande de 190 kDa

correspondant à la protéine Bsep « mature » glycosylée dans les MDCK Bsep^{A257V} Ntcp comparable à la protéine sauvage. Dans les MDCK Bsep^{R1128C} et T1210P Ntcp, une bande dont le poids moléculaire est inférieur à 190 kDa est détectée. Cette bande correspond à la protéine Bsep « immature » non glycosylée (reflet d'une rétention dans le RE). Une bande de 55 kDa (correspondant au poids moléculaire de Ntcp) est détectée dans tous les clones. En microscopie confocale, Ntcp est localisé à la membrane basolatérale de tous les clones. Bsep quant à lui, est localisé dans la membrane apicale dans MDCK Bsep^{WT} et Bsep^{A25V} Ntcp tandis que dans MDCK Bsep^{R1128C} et Bsep^{T1210P} Ntcp, Bsep est majoritairement dans le cytoplasme (Figure 31C).

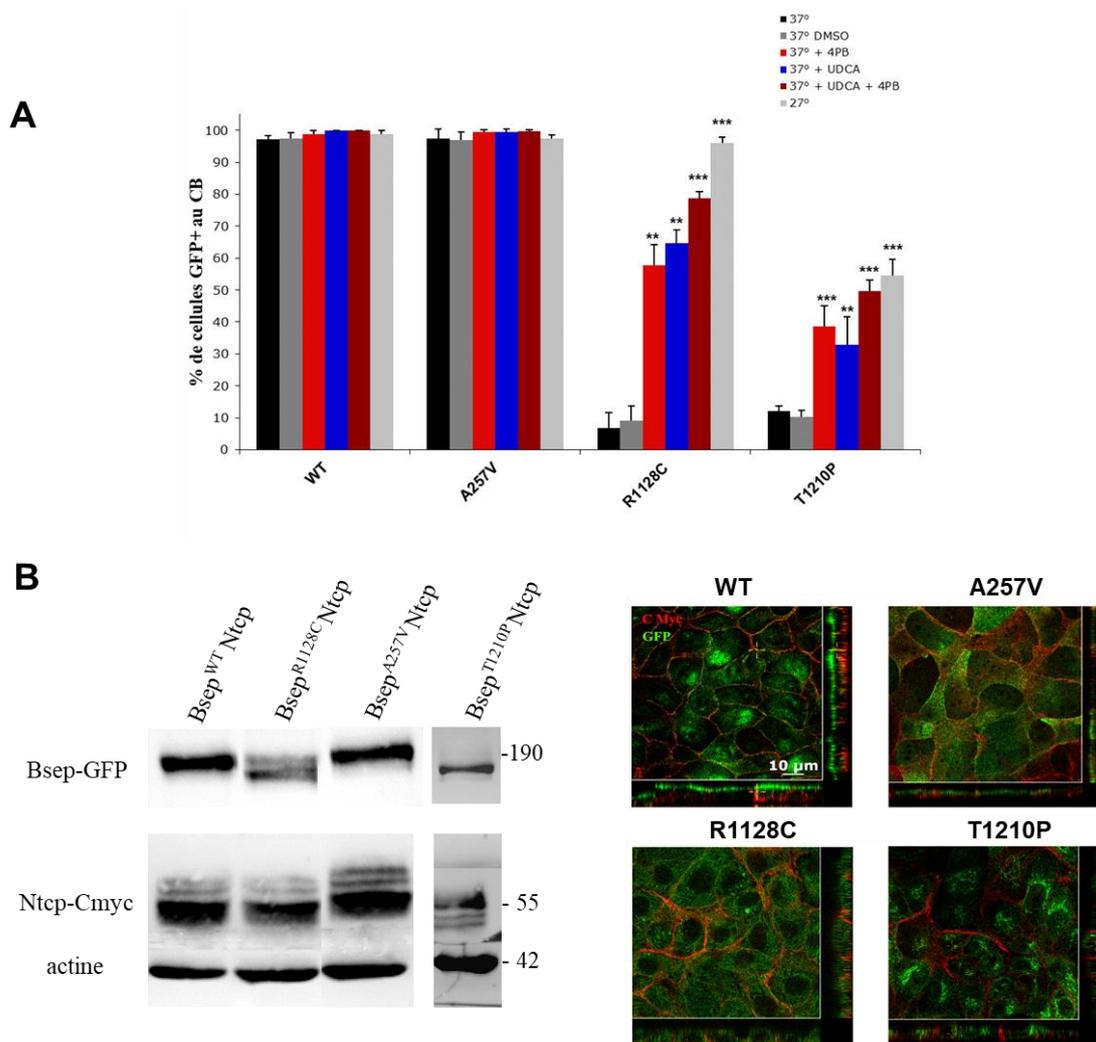


Figure 31 : Effet du 4-PB, UDCA et l'abaissement de température.

(A) Quantification des cellules exprimant Bsep^{WT}, A257V, R1128C, ou T1210P aux canalicules biliaires. Les résultats sont exprimés en moyenne des pourcentages du rapport du nombre de cellules exprimant la GFP au CB/ le nombre total de CB. Ces résultats représentent la moyenne de 3 lamelles (10 champs/lamelle). ** p < 0,01, *** p < 0.001 versus témoin non traité. (B) Analyse par western blot de l'expression de Bsep et Ntcp. Réalisé sur 30 μg de lysat cellulaire des clones MDCK Bsep^{WT}, A257V, R1128C et T1210P Ntcp). Les anticorps anti-GFP, anti-cMyc et anti-actine ont permis de révéler Bsep-GFP (WT et mutants) et Ntcp-cMyc et la protéine de référence β-actine, respectivement. (C) Localisation cellulaire de Bsep et Ntcp. Un double immunomarquage GFP (vert)/ZO1 (rouge) a été réalisé puis les cellules ont été examinées par microscopie confocale. Les parties hors de l'encadré blanc représentent la section en Z de l'image. Barre : 10 μm.

La figure 32 montre que la mutation p.A257V n'affecte pas la fonction de Bsep. En effet, le transport du ³H-TC représente 80% du transport observé avec Bsep^{WT}. En revanche, le transport du ³H-TC obtenu avec la mutation p.R1128C et p.T1210P est nettement diminué (57% et 82%, respectivement) par rapport à Bsep^{WT}. Le traitement par le 4-PB, UDCA ou la combinaison des deux ainsi que l'abaissement de température lors de la culture des cellules à 30°C augmente le transport des deux mutants. Cela suggère pour les deux mutants qu'il y a une corrélation entre le marquage canaliculaire observé et le transport obtenu. L'augmentation de la sécrétion biliaire d'ABs observée chez les patients traités avec le 4-PB est bien due à la capacité des mutants reciblés à transporter les ABs.

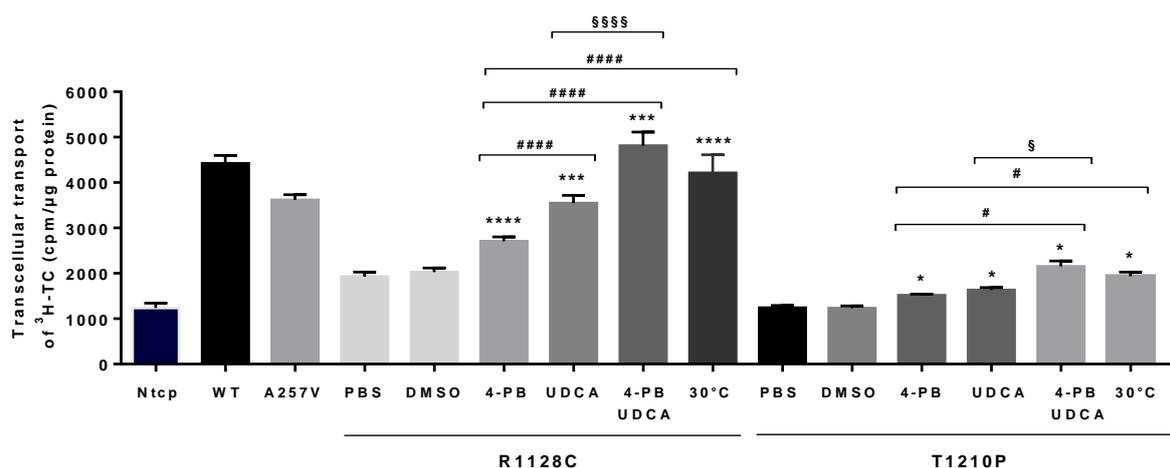


Figure 32 : Transport vectoriel de ³H-TC. L'activité de transport a été mesurée dans les clones MDCK Ntcp, MDCK Bsep^{WT} Ntcp, MDCK Bsep^{A257V, R1128C, ou T1210P} Ntcp cultivées sur insert pendant 5 jours. 1 μM de taurocholate (1 μCi/mL de ³H-TC et 0,9 μM de TC non marqué) a été ajouté au compartiment basolatéral. Après 2 heures, la radioactivité a été mesurée dans le compartiment apical correspondant au transport vectoriel du TC du compartiment basolatéral vers le compartiment apical. Les résultats sont exprimés en coup par minute (cpm)/μg de protéines de chaque membrane d'insert (moyenne +/- SEM de 3 à 6 expériences indépendantes). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus témoin non traité. ### $p < 0,001$ versus 4-PB. §§§ $p < 0,001$ versus UDCA.

Il existe une corrélation entre le marquage canaliculaire observé et le transport obtenu. Ceci est en accord avec la diminution de la concentration sérique en ABs observé chez les patients, reflet de la restauration de la fonctionnalité de BSEP.

3- Identification de nouvelles molécules avec un potentiel effet chaperon

La description, dans la littérature, de nouvelles molécules capables de corriger l'adressage des mutants faux sens et ainsi améliorer leurs activités une fois bien adressés, ne cesse d'augmenter. Outre le VX-809, plusieurs correcteurs ont été identifiés et sont disponibles auprès de la CFRT. Dans cette étude, nous avons étudié, en plus du C18 (VRT-534) présenté dans l'article 2, le C3 (VRT-525), C4 (Corr-4a), C5 (Corr-5a), C17 (Compound 15Jf) seuls ou en combinaison entre eux. Nous avons évalué la capacité de ces molécules à transporter le $^3\text{H-TC}$ dans le clone MDCK Bsep^{R1128C} Ntcp (notre mutation faux sens prototype présentant un défaut d'adressage). Hormis le C18, aucune des autres molécules testées seule ou en combinaison n'augmente significativement le transport vectoriel du $^3\text{H-TC}$. Certaines de ces molécules semblent avoir même l'effet contraire. Ces résultats suggèrent que ces composés pourraient être des correcteurs spécifiques au CFTR et pas de régulateurs de protéasome.

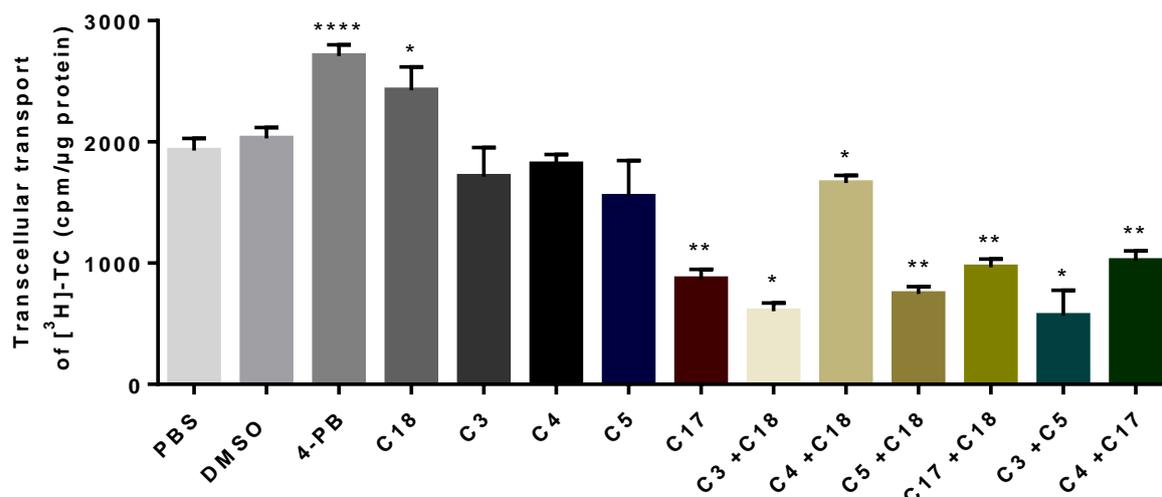


Figure 33 : Transport vectoriel de ³H-TC

L'activité de transport a été mesurée dans les clones MDCK Ntcp, MDCK Bsep^{WT} Ntcp, MDCK Bsep^{A257V, R1128C, ou T1210P} Ntcp cultivées sur insert pendant 5 jours. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec les molécules C3 (4 μM), C4 (4 μM), C5 (10 μM), C17 (4 μM), C18 (3 μM). 1 μM de taurocholate (1 μCi/mL de ³H-TC et 0,9 μM de TC non marqué) a été ajouté au compartiment basolatéral. Après 2 heures, la radioactivité a été mesurée dans le compartiment apical correspondant au transport vectoriel du TC du compartiment basolatéral vers le compartiment apical. Les résultats sont exprimés en coup par minute (cpm)/μg de protéines de chaque membrane d'insert (moyenne +/- SEM de 3 à 6 expériences indépendantes). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus témoin non traité.

Discussion

Plusieurs centaines de mutations du gène *ABCB11* codant le transporteur canalulaire des acides biliaires BSEP ont été identifiées chez des enfants atteints de PFIC2. Il n'existe aucun traitement curatif pour traiter ces patients. Les traitements symptomatiques par l'administration d'UDCA et de rifampicine permettent parfois d'améliorer la cholestase. Malheureusement, une transplantation hépatique est nécessaire dans la plupart des cas avant l'âge adulte. Différentes approches pourraient être utilisées pour permettre une expression suffisante d'une protéine fonctionnelle au niveau de la membrane canalulaire. Selon le type de mutation et le déficit fonctionnel observé, une pharmacothérapie ciblée pourrait être envisagée afin d'augmenter l'expression canalulaire ainsi que la fonction de BSEP.

1- Caractérisation des mutations

La caractérisation des mutants de BSEP correspondant aux mutations d'*ABCB11* identifiées chez les patients permet de déterminer les effets de ces mutations (non-sens ou faux sens), de préciser leur pathogénicité et de les classer sur la base des défauts moléculaires ainsi identifiés. De plus, cette caractérisation permet de proposer une stratégie thérapeutique ciblant spécifiquement le défaut moléculaire identifié (pharmacothérapie ciblée).

2- Pharmacothérapie ciblée : thérapie de translecture

La stratégie de translecture est une approche très prometteuse pour le traitement des maladies dues à des mutations stop (ce qui représente 10% des mutations impliquées dans les maladies génétiques). Cette stratégie a fait l'objet d'un nombre important d'études depuis la publication princeps en 1996 montrant l'efficacité des aminoglycosides à supprimer les CSPs dus à la mutation non-sens (CFTR/ Δ F508) responsable de la mucoviscidose (193). Cette étude

a montré la capacité du G418, un antibiotique de la famille des aminoglycosides à restaurer à la fois l'expression d'une protéine entière de CFTR et son activité, *in vitro*. Dans le cadre de la PFIC2, ce travail apporte une preuve de concept sur la possibilité d'induire une translecture pharmacologique de CSP due à des mutations non-sens d'*ABCB11* lorsqu'elles sont reproduites dans les lignées NIH3T3, HEK293, Can 10 et MDCK. Nous avons développé un modèle expérimental visant à identifier les mutations favorables par deux approches complémentaires : une approche exclusivement quantitative de mesure du taux de translecture « inductible » selon la mutation, puis une approche à la fois quantitative et qualitative pour l'étude de la protéine générée ainsi que la mise au point d'un test fonctionnel nous permettant d'évaluer l'efficacité des traitements sur l'expression d'une protéine fonctionnelle. Au cours de ce travail, nous avons étudié la capacité des aminoglycosides (gentamicine et G418) et du PTC124 à induire un saut du codon-stop (translecture) de six mutations non-sens identifiées chez des patients atteints de PFIC2 (p.Y354X, p.R415X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X et p.E1302X). Dans un premier temps, les niveaux de translecture de chaque mutation (environnement nucléotidique : 21 nucléotides autour du codon-stop) en présence ou non des différents traitements ont été quantifiés en utilisant un système double rapporteur dans des cellules NIH3T3. Les aminoglycosides ont induit la translecture de tous les codons stop dans leurs environnements nucléotidiques correspondant aux mutations testées (Figure 1, article 1).

❖ *La nature du codon et son contexte influencent l'efficacité de la translecture*

Il est admis que les différents codons stop n'ont pas la même capacité à être translus en présence d'inducteurs de translecture en particuliers les aminoglycosides. Plusieurs études ont montré que l'UGA est le codon-stop le plus favorable à l'induction de translecture suivi du codon UAG puis UAA (192-195). De plus, il a été montré que la nature du nucléotide situé juste après le codon-stop c'est-à-dire en position N+4 influence la capacité du codon-stop à être

translu par les aminoglycosides. Ainsi, un nucléotide N+4 de type « C » serait plus favorable (C>U>A>G) (195-198). Parmi les deux types de codons stop étudiés, UGA (p.R415X, p.R470X, p.R1057X, p.R1090X) et UAA (p.Y354X, p.E/K1302X), nous avons observé une induction de translecture par les aminoglycosides plus élevée dans les séquences cibles des codons de type UGA que de ceux de type UAA. Les deux séquences cibles les plus favorables dans notre système quantitatif double rapporteur sont celles correspondant aux mutations p.R1090X et p.R1057X. Elles sont conformes à cette configuration (codon de type UGA-C) contrairement à la mutation p.R415X qui est dans la configuration de type UGA-A. La mutation la moins « répondeuse » p.Y354X induit un codon-stop décrit comme étant moins favorable (UAA-A). Dans cette étude, nous n'avons étudié aucune mutation introduisant un codon-stop de type UAG. De plus, pour certaines mutations, nous avons testé parallèlement deux séquences extrêmement proches (Rat et Homme). Il est intéressant de constater que le seul changement du nucléotide en position N+4 modifie effectivement l'efficacité de la translecture : le pourcentage de translecture avec le G418 passe de 8% pour R1057X-Homme (UGA-C) à 3% pour R1057X-rat (UGA-A) (Figure 1, article 1). Cette cohérence avec les publications antérieures (192-198) contribue à valider nos résultats. Nous avons également testé un autre composé avec un potentiel effet d'induction de la translecture, bien toléré *in vivo* et dont les doses efficaces sont bien inférieures à celles utilisées pour la gentamicine (216) : le PTC124 (Ataluren®). Il a été identifié par *PTC Therapeutics* lors d'un criblage à grande échelle de plus de 800 000 composés (216). Le PTC124 est une petite molécule achirale de 284 Da qui n'a aucune similitude de structure avec les aminoglycosides ou d'autres médicaments utilisés en clinique. Dans nos expériences, ce médicament, approuvé par la FDA et l'EMA pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne et la mucoviscidose, n'a pas augmenté les niveaux de translecture des 10 séquences cibles d'*ABCB11* étudiées, à l'exception de la séquence correspondant à la mutation E1302X (Homme) (Figure 1B, article 1). Cependant,

dans d'autres expériences, le PTC124 n'a pas réussi à induire la production d'une protéine de pleine taille BSEP^{R1057X} (Figure 1B, article 1). Certaines publications ont rapporté sa capacité à induire *in vitro* et *in vivo* la translecture de CSPs (216-219). Cependant, le PTC124 a fait l'objet de nombreuses critiques car il stabilise la luciférase (système du gène rapporteur) et peut donc augmenter la mesure de l'activité de cette enzyme indépendamment de la translecture (280, 281). Plusieurs études ont également mis en évidence l'inefficacité de PTC124 à induire la translecture dans différents modèles (282-285) et l'EMA a reconsidéré l'utilisation de ce médicament contre la DMD suite à ces résultats contradictoires (286). Tant que le mécanisme d'action du PTC124 n'est pas découvert, la question de l'efficacité de PTC124 restera ouverte. Depuis, d'autres composés (RTC13 et RTC14) favorisant la translecture ont été identifiés par criblage à haut débit mais ces composés sont toujours en développement pour améliorer leur efficacité (287).

La transposition de cette pharmacothérapie ciblée chez les patients atteints de PFIC2 présente des limites. D'une part, l'efficacité des aminoglycosides à induire la translecture dépend de la nature du codon stop et de son environnement nucléotidique. Seuls les patients porteurs du de CSP de type UGA-C, le plus favorable seraient de bons candidats pour un tel traitement. D'autre part, leurs utilisations se heurte à la toxicité bien connue des aminoglycosides notamment une ototoxicité et une néphrotoxicité incompatibles avec un usage à long terme (288). La néphrotoxicité induite par les aminoglycosides est réversible et peut être prise en charge cliniquement mais ce n'est pas le cas de l'ototoxicité qui provoque une perte auditive irréversible (289, 290). Par ailleurs, les aminoglycosides traversent difficilement la barrière intestinale, ce qui contraint à les administrer par voie intraveineuse ou intramusculaire. Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux de recherche ont été menés dans le but d'optimiser ces molécules en atténuant leur toxicité tout en améliorant leur activité de translecture. Plusieurs groupes de dérivés d'aminoglycosides ont été synthétisés tels que les

dérivés de la paromomycine ou la généticine nommés NB : NB30 (1^{ère} génération), NB54 (2^{ème} génération), NB84 (3^{ème} génération) et NB124 (4^{ème} génération). Le NB124 dérivé de la paromomycine et du G418, a été décrit *in vitro* et dans un modèle souris de la mucoviscidose (G542X-hCFTR), pour avoir une meilleure efficacité de translecture (aussi efficace que le G418 pour supprimer les CSP) et une moindre toxicité (291, 292). Il a été récemment rapporté que le composé CDX-5 pourrait potentialiser l'effet de translecture des aminoglycosides permettant ainsi une réduction des doses utilisées et donc leur toxicité (293). De plus, les programmes de criblage ont conduit à l'identification de nouvelles classes de molécules non aminoglycosides, telle que la clitocine (analogue de nucléotides) (294), le H7 (extrait de champignons qui contient plusieurs molécules dont la clitocine) (295), le PTC414 (296) ainsi que des composés déjà approuvés pour une utilisation clinique tels que l'Escine (297). Certains de ces composés ont des propriétés de translecture qui diffèrent des profils d'efficacités des aminoglycosides car ils n'agissent pas sur les mêmes types de CSP. Ces molécules pourraient permettre le traitement de patients porteurs de CSP considérés comme non favorables (tels que le UAA). Il convient de mentionner que dans les modèles expérimentaux utilisés dans notre travail, la voie NMD n'est pas prise en compte, ce qui pourrait représenter une autre limite de l'efficacité de cette pharmacothérapie ciblée chez les patients. Le fait de travailler sur l'ADNc au lieu de l'ADN génomique, ne permettait pas d'étudier l'effet des inhibiteurs de la dégradation des ARNm par la voie NMD. L'inhibition de cette voie en association avec des inducteurs de translecture pourrait stabiliser les transcrits de Bsep et augmenter davantage l'expression de Bsep entier.

❖ La protéine entière générée après induction de translecture n'est pas correctement adressée pour tous les mutants

Nous avons ensuite étudié la capacité de la gentamicine à induire la translecture de ces mutations non-sens et la production d'une protéine Bsep entière dans deux lignées, l'une non polarisée (HEK293) et l'autre polarisée de type hépatocellulaire (Can 10). Dans HEK293, la

gentamicine a induit la translecture de quatre CSPs de type UGA, ce qui a entraîné une augmentation significative de l'expression d'une protéine Bsep entière (Figure 1A, article 1). Pas moins de 30% des cellules ont exprimé une protéine Bsep entière après traitement par la gentamicine du mutant Bsep^{R1090X}. Inversement, les 2 mutants porteurs du CSP de type UAA n'ont pas répondu au traitement à la gentamicine (Figure 2B, article 1). Dans les cellules Can 10, Bsep^{R1090X} était le seul mutant parmi les six étudiés pour lequel l'expression était significativement augmentée avec le traitement par la gentamicine (Figure 3A, article 1). Conformément à sa séquence unique favorable UGA-C, Bsep^{R1090X} était le mutant le plus répondeur au traitement à la gentamicine et le seul à répondre dans les trois systèmes testés. En conséquence, nous avons sélectionné ce mutant pour d'autres études qualitatives. Dans la lignée HEK293, nous avons montré par western blot que la gentamicine induisait l'expression à la fois d'une forme immature et d'une forme mature d'une protéine Bsep^{R1090X} entière (Figure 4B, article 1). En outre, nos études en microscopie confocale ont montré que Bsep^{R1090X} entier, induit par la gentamicine, était localisé à la fois dans le cytoplasme et au niveau de la membrane plasmique ou de la membrane canaliculaire des cellules HEK293 et Can 10, respectivement (Figure 4A et 3A, article 1).

❖ *La gentamicine génère une protéine entière partiellement fonctionnelle*

La réexpression d'une protéine entière est une étape essentielle, mais rien ne garantit que cette protéine soit fonctionnelle. Pour cela, il est important de déterminer l'activité de la protéine entière restaurée. Pour déterminer si Bsep^{R1090X} était fonctionnel, nous avons vérifié sa capacité à transporter le ³H-TC. Dans les cellules MDCK le traitement par la gentamicine entraînait une augmentation significative de l'activité de transport du TC du mutant Bsep^{R1090X}. Cette augmentation de 40% suggérait que Bsep entier restauré était partiellement fonctionnel (Figure 6F, article 1). L'activité de la protéine entière pourrait dépendre de l'acide aminé

incorporé à la place du CSP. Il a déjà été montré chez la levure qu'au moins 3 acides aminés différents (l'arginine, la cystéine et le tryptophane) sont incorporés lors du saut du CSP de type UGA et la proportion relative d'incorporation de ces acides aminés est différente (229). Donc, l'acide aminé incorporé pourrait être différent de celui de la protéine sauvage et il peut aboutir à la synthèse d'une protéine correspondant à un mutant faux sens et donc potentiellement mal adressée et/ou non fonctionnelle, avec des propriétés biochimiques différentes et une stabilité altérée. En effet, un certain nombre d'études ont montré que, même si la protéine entière a été produite après induction de la translecture, son activité ainsi que sa localisation subcellulaire étaient souvent altérées (282, 298, 299). Il a été décrit, *in vitro*, que les codons stop UAG et UAA incorporent plutôt une glutamine, une lysine ou une tyrosine alors que le codon UGA permet l'incorporation de l'arginine, du tryptophane et de la cystéine (190, 223, 227-229). De plus, il a été montré par spectroscopie de masse que l'environnement nucléotidique du CSP est susceptible d'influencer à la fois l'identité et la fréquence des acides aminés insérés lors de la suppression du CSP par les aminoglycosides (G418) (228) et que la fréquence d'insertion des acides aminés au niveau d'un CSP particulier est affectée par la nature de l'inducteur de translecture, indépendamment de l'abondance de l'ARNt dans la cellule (190).

3- Pharmacothérapie ciblée : thérapie chaperone

La recherche de molécules capables de corriger l'adressage constitue un champ de recherche très actif. La stratégie chaperone avec le 4-PB dans le cas de mutations faux sens, et après validation *in vitro* dans nos différents systèmes cellulaires, a été utilisée avec des résultats prometteurs chez les malades (181, 249, 251-254). Cependant, les chaperones pharmacologiques, pour exercer leurs effets, nécessitent souvent des concentrations élevées, d'où le besoin d'identifier et d'optimiser de nouvelles molécules dont l'efficacité d'adressage a déjà été démontrée (181). Pour cela, en collaboration avec des chimistes médicaux nous avons

étudié des molécules analogues aux 4-PB qui pourraient présenter un meilleur profil d'efficacité/tolérance que le 4-PB.

❖ *Validation fonctionnelle, in vitro, des travaux précédents*

Notre équipe a montré l'efficacité du 4-PB à corriger partiellement le défaut d'adressage de certaines mutations faux sens (p.R1128C et p.T1210P) *in vitro* dans la lignée hépatocytaire Can 10. À la suite de ces résultats, quatre patients ont été traités par voie orale avec le 4-PB. Durant cette thérapie, une diminution de la cholestase, du prurit et de la concentration sérique des ABs ainsi qu'une amélioration des autres paramètres hépatiques, biologiques (transaminases et fonction hépatique-TP/FV) ont été observés (181). Ces résultats ainsi que les résultats de transport du TC obtenus suggèrent une corrélation entre le marquage canaliculaire observé, le transport obtenu et l'amélioration de l'état clinique des patients. L'augmentation de la sécrétion biliaire d'ABs objectivée chez un de ces patients est bien due à la capacité du 4-PB à recibler à la membrane canaliculaire des mutants qui ont une fonction résiduelle à transporter les ABs. Pour la mutation p.A257V correctement localisée comme la protéine sauvage à la membrane canaliculaire des cellules Can 10, il a été suggéré que sa fonction serait altérée (181). Cependant, les résultats de transport du TC obtenus avec cette mutation ont montré que son activité n'est diminuée que de 20% par rapport à celle de la protéine sauvage (Figure 32). Une des hypothèses pour expliquer la pathogénicité de cette mutation est qu'elle serait responsable d'une instabilité à la membrane du mutant qui serait rapidement dégradé. Cette mutation est située dans le domaine transmembranaire et n'est pas située dans les motifs cruciaux impliqués dans la liaison ou l'hydrolyse de l'ATP, mais elle pourrait modifier la structure globale de la protéine expliquant son instabilité. La gravité de l'instabilité peut varier selon les mutations (300).

Au cours des dernières années, des efforts considérables ont été entrepris pour mettre au point de nouveaux dérivés de médicaments piégeant l'ammoniac ayant moins d'effets indésirables et mieux acceptés par le patient. C'est le cas du GPB (Ravicti®), médicament dérivé du 4-PB et est approuvé par la FDA et l'EMA pour le traitement des troubles du cycle de l'urée chez des patients âgés de 2 ans et plus dont les niveaux d'ammoniac ne peuvent pas être diminués suffisamment par la seule restriction en protéines alimentaires (301). Il a été récemment proposé pour remplacer le phénylbutyrate de sodium qui pose des problèmes d'appétence et d'autres effets indésirables associés à une teneur élevée en sodium et à une charge de comprimés élevée. Structurellement, le GPB correspond à un triglycéride contenant 3 molécules de PB liées à un squelette de glycérol. Le GPB est une prodrogue, son hydrolyse par les lipases pancréatiques libère 3 molécules de 4-PB du squelette glycérol, lesquelles sont transformées par bêta-oxydation dans l'hépatocyte en PA (302). Étant donné que le GPB nécessite une digestion par les lipases pancréatiques dans l'intestin, le GPB est absorbé environ 75% plus lentement que le 4-PB (303). De plus, il est bien toléré avec moins de complications gastro-intestinales que le 4-PB (304). Les propriétés chaperones du GPB n'ont jamais été étudiées *in vitro*. Dans cette étude, nous avons montré que comme pour le phénylbutyrate de sodium, le GPB avait des propriétés chaperones. Le traitement par le GPB augmentait l'adressage et le transport du TC du mutant faux sens Bsep^{R1128C} dans les cellules Can 10 et MDCK respectivement (Figure 3D et 5C, article 2). Ces augmentations étaient comparables à celles observées après traitement par le 4-PB. Ces résultats suggèrent que le GPB pourrait être utilisé comme drogue chaperone pour la population pédiatrique. Nos résultats montrent pour la première fois *in vitro* l'effet chaperon du GPB et suggèrent que le GPB pourrait avoir le même mécanisme d'action que le 4-PB (modulation de chaperones endogènes par ex.). Des études plus poussées seront envisagées pour confirmer cet effet.

Cependant, il a été rapporté une potentielle toxicité du GPB chez un patient atteint de PFIC1. Ce patient traité avec une certaine efficacité par le 4-PB avait arrêté de prendre ce traitement du fait d'une mauvaise tolérance au bout de 5 mois. Un traitement par GPB a été proposé dans l'espoir d'améliorer l'observance. Après 155 jours sous GPB une aggravation majeure des tests hépatiques a été observée, le GPB a été arrêté et les tests hépatiques sont retournés à leurs niveaux de base. Les auteurs ont proposé que ces anomalies étaient dues à une hépatotoxicité aiguë et sévère du GPB probablement liée à une augmentation des concentrations circulantes en PA possiblement favorisée par un arrêt dans le même temps d'un traitement par rifampicine (inducteur enzymatique). Une telle toxicité n'a pas été observée chez les malades traités par GPB pour un déficit du cycle de l'urée mais ces malades ne reçoivent pas de rifampicine et ont un foie sain contrairement au malade atteint de PFIC1 (305).

Nous avons également testé le PA métabolite du 4-PB. Ce métabolite pharmacologiquement actif permet la formation d'un conjugué avec de la glutamine (la phénylacétylglutamine) dans l'hépatocyte, qui chélate efficacement l'ammoniac (306). Ensuite, la phénylacétylglutamine est directement excrétée par les reins. Le 4-PB n'est pas le principal agent actif mais sert plutôt de précurseur ou de prosubstance à l'agent actif PA. Comme pour le GPB, les propriétés chaperones du PA n'avaient jamais été étudiées *in vitro*. Il est intéressant de noter que le traitement par le PA augmentait significativement l'expression canaliculaire de Bsep^{R1128C} dans cellules Can 10 et le transport du TC dans les cellules MDCK (Figure 3D et 5C, article 2). Cette augmentation était équivalente à celle observée après traitement par le 4-PB et le GPB et ce pour les mêmes doses. Le PA et le 4-PB sont tous les deux efficaces dans les mêmes gammes de concentrations.

❖ *Identification de composés structurellement identiques au 4-PB*

Le criblage de la chimiothèque de BioCIS (Chimiothèque Nationale) par homologie structurale avec le 4-PB a permis d'identifier deux composés : le MHMPB et l'OTNC avec de potentielles propriétés chaperones. Ce sont des assemblages d'énantiomères. De ce fait, les énantiomères pouvaient présenter des effets différents voire antagoniques. Cependant, il arrive que deux énantiomères aient des activités similaires au niveau biologique. Dans notre études, le MHMPB et l'OTNC (500 μM et 1 mM) avaient un effet similaire à celui du 4-PB et augmentaient l'expression canaliculaire du mutant Bsep^{R1128C} dans la lignée hépatocytaire Can 10 (Figure 3B, 3C et 5B, article 2). Cependant, le MHMPB utilisé à 150 μM n'avait pas d'effet significatif sur l'augmentation de l'adressage canaliculaire (Figure 3A, article 2). Le MHMPB est une prodrogue et donc peut libérer une autre molécule qui elle pourrait être plus active et plus efficace. Nous avons, donc, testée cette molécule (le HMPB) qui avait été préalablement synthétisée par réaction de saponification à partir de la prodrogue MHMPB. D'un point de vue structural, le HMPB ne diffère du MHMPB que par l'absence du groupement méthyl. Ce dérivé s'avérait plus efficace que la prodrogue à corriger l'adressage du mutant Bsep^{R1128C} suggérant que la fonction carboxylique est essentielle pour les propriétés biologiques.

Afin de mimer la voie métabolique du 4-PB en PA, le MMPB-3E et le MMPB-2E ont été préparés par déshydratation du HMPB. Ces deux métabolites pourraient être actifs. Contrairement au PA (principe actif du 4-PB), les deux composés issus du HMPB n'avait aucun effet sur l'adressage et en plus présentait une toxicité élevée (Figure 3A, article 2). Ceci est dû au fait que le MMPB-3E possède une fonction dite « accepteur de Michael » expliquant la toxicité observée en tant qu'agent alkylant. Ce dernier est capable de greffer des groupements alkyle à divers groupes dans la cellule (ces agents sont utilisés pour le traitement de divers

cancers et sont connus pour être cytotoxiques). De la même manière, MMPB-2E peut se transformer en MMPB-3E par tautomérisation justifiant sa toxicité.

L'augmentation de l'expression de Bsep^{R1128C} au canalicule suite aux traitements par MHMPB, HMPB et l'OTNC était accompagnée d'une augmentation du transport du TC (Figure 5C, article 2). Les trois analogues (composés ayant les éléments pharmacophores, un cycle phényle séparé d'un groupe carboxyle par une chaîne carbonée flexible ou semi-rigide) ainsi identifiées étaient aussi efficaces que le 4-PB pour restaurer l'activité de Bsep^{R1128C} et à des doses beaucoup plus faibles que ce dernier.

❖ *Autres drogues chaperones*

Plusieurs études ont été menées dans le but d'identifier des correcteurs capables de restaurer un trafic normal des protéines retenues dans le RE. Nous nous sommes intéressés à certains d'entre eux, en particulier ceux étudiés pour corriger l'adressage de mutants CFTR.

Le SAHA (Vorinostat®) est un autre médicament approuvé pour le traitement de certains lymphomes (307). C'est un dérivé de l'acide hydroxamique, membre de la famille des inhibiteurs des histones désacétylases induisant l'accumulation d'histones acétylées, qui bloque la prolifération des cellules en culture et inhibe la progression tumorale. Les résultats obtenus avec le SAHA (Figure 3D et 5C, article 2) sont en ligne avec d'autres études *in vitro*, montrant une correction du repliement des protéines lors du traitement dans d'autres maladies comme la PFIC1 (308), le déficit en α -antitrypsine (309), et la maladie de Gaucher (310), suggérant son potentiel en tant que régulateur plus général du protéasome. Il a également été rapporté que le SAHA a un effet transcriptionnel et augmente la quantité des ARNm de la mutation *ATP8B1/p.I661T in vitro* (308).

La réalisation d'un criblage à haut débit de milliers de composés disponibles issus de diverses chimiothèques a permis d'identifier plusieurs petites molécules correctrices que nous avons obtenues par la CFFT. Parmi les cinq correcteurs de CFTR (C3, C4, C5, C17 et C18) que nous avons testés seuls ou en combinaison, seul le correcteur C18 améliorait l'expression de Bsep^{R1128C} à la membrane canaliculaire et son activité de transport du TC. (Figure 33). Le correcteur C18 correspond au VRT-(534) identifié par *Vertex Pharmaceuticals* (257). Il a été montré que le C18 est efficace pour corriger le défaut de repliement et de trafic du mutant CFTR/ Δ F508 (255). Les mécanismes impliqués dans la propriété de correction de ces composés ne sont pas encore clairement identifiés. Ces correcteurs ont récemment été classés. Le C3 et le C18 sont des correcteurs de classe I, supposés stabiliser les interactions entre les NBD1 et TMD1/2. Le C4 et le C17 sont affectés à la classe II, les composés qui restaurent la stabilité des mutations situées dans le NBD2 (311). Il a été montré *in vitro* que quelques-uns de ces correcteurs pouvaient augmenter l'expression de *ATP8B1/p.I661T*, de *ABCA4/p.R1108C* et *p.R1129C* (308, 312) et que toutes les mutations ne répondent pas forcément aux mêmes correcteurs. Cela indique que même si les mutants interagissent avec un réseau de protéasome similaire, ils peuvent se lier différemment à chacun des composants du réseau, entraînant des efficacités différentes pour le même traitement ; et chaque mutant peut avoir un impact différent sur la structure globale de la protéine, nécessitant différents traitements pour corriger les défauts de la protéine (313). Le mécanisme d'action de ces molécules pour restaurer le trafic des mutants à la membrane ne sont pas encore élucidés. Certains de ces correcteurs pourraient agir spécifiquement sur le mutant en tant que chaperones pharmacologiques en se liant directement et en favorisant le repliement de telle sorte que la protéine peut passer le contrôle de qualité du RE. Une autre possibilité est que ces correcteurs modulent la machinerie de l'homéostasie cellulaires des protéines (protéasome). Les combinaisons de correcteur, idéalement de classes

et/ou de mécanismes d'action différents pourraient permettre une meilleur efficacité thérapeutique.

La curcumine, composant de couleur jaune du curcuma est un inhibiteur de faible affinité de la pompe SERCA. Il a été montré qu'elle corrigeait le trafic et rétablissait la fonction du CFTR/ Δ F508 dans des modèles cellulaires et animaux (314). Nous n'avons pas observé d'effet de la curcumine sur le mutant Bsep^{R1128C} dans les cellules Can 10 (Figure 3D, article 2). Chez des souris homozygotes pour la mutation CFTR/ Δ F508, Eganet *et al.* (314) ont rapporté qu'une administration orale de curcumine corrigeait les différences de potentiel nasal au niveau de celui observé chez les souris sauvages et augmentait la survie des souris mutées. Cependant, Song *et al.* (315) n'ont pas pu montrer cette correction dans les cellules de voies respiratoires humaines et chez les souris mutées malgré l'utilisation de préparations à base de curcumine et de plusieurs protocoles d'administration (315). Il a été suggéré que ces différences pourraient être due à la biodisponibilité de la curcumine. En effet, il a été montré chez l'homme que la curcumine administrée par voie orale a une très faible biodisponibilité car son métabolisme hépatique est rapide (204, 316), seuls de faibles taux (60 nM) étant détectables dans le sang après l'administration d'une dose élevée de curcumine.

4- Pharmacothérapie ciblée :la bithérapie (combinaison d'inducteurs de translecture et de drogues chaperones)

Après translecture du mutant Bsep^{R1090X} par la gentamicine, une expression d'une protéine entière de Bsep a été détectée à la fois au niveau de la membrane canaliculaires mais également dans le cytoplasme suggérant un mauvais adressage (Figure 3A et 4A, article 1). Ceci pourrait être corrigé par l'addition de drogues chaperones.

Pour évaluer l'efficacité d'une bithérapie combinant translecture et thérapie chaperone, nous avons testé l'effet d'une diminution de température (27°C) après saut du CSP par la

gentamicine. Cette température mime l'effet des drogues chaperones, à savoir, inhiber la dégradation des protéines dans la cellule par le protéasome (148). Cela stabilise l'expression des protéines et permet de « réadresser » des protéines mutées ou mal repliées qui s'accumulent dans le RE. Bien qu'il ne soit pas possible de « mettre les patients à 27°C », ces résultats ont ouvert des perspectives de traitement de certains patients atteints de PFIC2 par des moyens pharmacologiques (4-PB, UDCA) (repositionnement). Le 4-PB ayant une AMM dans le traitement des déficits du cycle de l'urée présente également des propriétés chaperones permettant aux protéines retenues dans le RE d'atteindre la membrane canaliculaire. Différentes équipes dont la nôtre ont montré l'efficacité du 4-PB à augmenter l'expression et l'activité de certains mutants faux sens de Bsep *in vitro* et chez certains patients atteints de PFIC2 (140, 150-152, 181, 250-252), de BRIC2 (254), de PFIC1 (253), de PFIC3 (231, 317) et de mucoviscidose (247-249). L'UDCA, un acide biliaire hydrophile peu détergent, a un effet similaire. Il est également un agoniste faible du récepteur nucléaire FXR intervenant dans la régulation transcriptionnelle de BSEP. Enfin, il régule également les modifications post-traductionnelles de BSEP ce qui expliquerait sa capacité à stabiliser BSEP au canalicule biliaire. Dans cette étude, la thérapie combinée/séquentielle par la gentamicine et la mise à 27°C des cellules a un effet significatif sur la translecture et l'adressage du mutant Bsep^{R1090X} Dans Can 10. Cet effet représente l'effet maximal obtenu (Figure 5, article 1). De manière intéressante, des traitements supplémentaires avec des correcteurs tels que 4-PB, l'UDCA ou 4PB+UDCA à la suite du traitement par la gentamicine reproduisent cet effet entraînant une augmentation de l'expression du contingent canaliculaire d'une protéine entière induite par la gentamicine (Figure 5, article 1).

Compte-tenu de ces indications, nous avons généré par mutagenèse dirigée les deux mutants faux sens potentiellement produits après translecture de la mutation non-sens p.R1090X, p.R1090C et p.R1090W (la 3^{ème} possibilité étant la protéine sauvage : arginine) afin d'évaluer

leur localisation et leur activité de transport. D'après nos résultats, ces mutants faux sens sont essentiellement adressés aux canalicules biliaires dans Can 10 (Figure 29A). Contrairement à ce qui a été démontré pour d'autres mutants faux sens de Bsep (181), bien que leur adressage canaliculaire soit légèrement inférieur à celui de la protéine sauvage. En termes de fonctionnalité, dans les cellules MDCK aucune activité de transport du $^3\text{H-TC}$ n'a été détectée pour les deux mutants, cela suggère que la fonctionnalité de ces deux mutants est impactée et qu'ils ne sont pas fonctionnels malgré une localisation apicale dans MDCK et canaliculaire dans Can 10 (Figure 30A, 30C et 29A). De plus, ces mutants sont prédits pour être délétères, *in silico*. Ces résultats suggèrent que la restauration partielle de l'activité de Bsep^{R1090X} était due à la protéine sauvage. Ces deux mutations sont situées au début du NBD2 juste après le motif A-loop et ce motif semble être conservé entre les transporteurs ABC. Ceci suggère que ces mutations pourraient relever d'une thérapie potentiatrice telle que le potentiateur VX-770.

Comme les correcteurs peuvent également augmenter l'expression canaliculaire de Bsep^{WT}, nous ne connaissons pas l'apport respectif de Bsep^{WT}, de Bsep^{R1090C} et de Bsep^{R1090W} dans l'augmentation de l'expression de la protéine Bsep entière induite par la gentamicine observée après un traitement par UDCA et 4-PB. Dans ce système, nous n'avons pas observé d'effets additifs entre l'UDCA et le 4-PB en terme de contingent canaliculaire, comme nous l'avions précédemment montré pour plusieurs mutants faux sens de Bsep (181). L'effet de la bithérapie sur l'activité de transport de ce mutant a été également évalué. Après l'addition du 4-PB (effet chaperon) ou l'incubation des cellules à 30°C (mimant l'effet chaperon), le transport du TC était augmenté (Figure 6F, article 1). Ceci est dû au fait que le 4-PB ou la diminution de la température d'incubation augmentent l'expression apicale de la protéine Bsep entière induite par la gentamicine dans les clones MDCK comme nous l'avons observé dans les cellules Can 10 (181, 251). En résumé, nos résultats montrent que la gentamicine peut induire la translecture du mutant non-sens Bsep^{R1090X} conduisant à l'expression d'une protéine entière ayant une

activité de transport du TC. Un traitement supplémentaire par 4-PB ou par la diminution de la température d'incubation des cellules augmentait son expression à la membrane canaliculaire (Can 10) et son activité de transport du TC.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la suppression traductionnelle de CSP dans le cas de mutation non-sens et à la correction d'adressage dans le cas de mutations faux sens du transporteur hépatocellulaire des acides biliaires *ABCB11/Bsep*.

Ce travail qui a porté sur des mutations identifiées chez des enfants atteints de PFIC2, apporte une preuve de concept sur la possibilité d'induire une translecture pharmacologique de CSP. En effet, j'ai pu montrer que certains aminoglycosides tels que la gentamicine favorisent l'incorporation d'un ARNt suppresseur naturel au niveau du CSP (phénomène de translecture) aboutissant à l'expression d'une protéine entière (dans le cas de la mutation p.R1090X). La protéine entière résultante était partiellement localisée à la membrane canaliculaire dans la lignée hépatocytaire Can 10 et partiellement fonctionnelle.

Concernant les mutations faux sens, l'identification de composés capable d'améliorer l'adressage de protéines mal repliées retenues dans le RE (correcteurs) ou capables de restaurer, au moins partiellement, la fonction de protéines correctement localisées mais non fonctionnelles (potentiateurs) constituent un champ de recherche très actif. Le repositionnement de médicament (molécule ayant déjà une AMM et donc un profil de toxicité bien établi comme c'est le cas du 4-PB) est une approche qui permet une utilisation rapide chez les malades. Les stratégies de criblage de chimiothèques (comprenant ou non des molécules avec AMM) permettent de tester rapidement de nombreuses molécules. La chimie médicale permet en se basant sur la structure chimique des molécules d'identifier des composés analogues à des composés déjà identifiés comme efficaces et d'envisager des modifications chimiques de ces composés dans le but d'augmenter leur rapport efficacité/toxicité. Nous avons montré que 2 médicaments détournés de leur première utilisation ont été utilisés comme des drogues chaperones. Le GPB et le SAHA étaient aussi efficace que le 4-PB pour corriger l'adressage et

augmenter l'activité du mutant Bsep^{R1128C}. Nous avons également montré que le PA, principe actif du 4-PB dans les hépatocytes et considéré comme la molécule active responsable de l'effet chaperon du 4-PB ainsi que le correcteur C18 issu d'un criblage à haut débit efficace pour corriger le défaut de repliement et de trafic du mutant CFTR/ Δ F508 augmentaient l'adressage canaliculaire et la fonction de Bsep^{R1128C}. Une des limites de l'utilisation du 4-PB (Ammonaps®, phénylbutyrate de sodium) est sa présentation qui oblige les patients à prendre jusqu'à 20 comprimés, 2 fois par jour d'où l'intérêt du GPB (Ravicti®) qui est concentré et sous forme de sirop.

Plusieurs analogues du 4-PB identifiés par une approche de chimie médicale en collaboration avec l'équipe de Delphine Joseph (BioCIS) ont été étudiés. Certaines de ces molécules étaient efficaces pour corriger l'adressage du mutant Bsep^{R1128C} au canalicule biliaire et augmentaient ainsi l'activité de transport du ³H-TC et ceci à des doses beaucoup plus faibles que le 4-PB. Ces molécules pourraient constituer de nouvelles thérapeutiques.

La bithérapie combinant translecture et thérapie chaperone a permis d'augmenter la fraction canaliculaire de cellules exprimant Bsep^{R1090X}. L'augmentation de l'expression de Bsep^{R1090X} au canalicule biliaire était accompagnée de l'augmentation du transport du ³H-TC, reflet d'une restauration plus importante de l'activité de la protéine.

L'étude des relations structure/fonction qui constitue un moyen privilégié pour comprendre l'impact des mutations sur le transporteur et par conséquent envisager leur correction d'une manière plus spécifique et plus efficace avec des molécules chimiques dont la structure sera prédite comme étant active serait une approche intéressante à développer. Notre collaboration avec le Dr. Isabelle Callebaut (CNRS UMR 7590) spécialiste en modélisation moléculaire s'inscrit, dans cet axe. Bien sûr, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'action des correcteurs permettrait d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques.

De plus, la combinaison de correcteurs et de potentiateurs avec différents mode d'action comme l'Orkambi® et le Symdeko®) pour la mucoviscidose, pourrait être une stratégie très prometteuse pour améliorer l'efficacité des traitements. Ainsi, la bithérapie (combinaison de chaperones et potentiateurs) dans le cas de mutations aux sens et la trithérapie (combinaison de translecteurs, de chaperones et de potentiateurs) dans le cas de mutations non-sens seront étudiées pour rechercher des effets additifs et des synergies entre les différentes stratégies de pharmacothérapie ciblée. La conception de molécules à activité duale voire triale qui associerait au sein d'une même molécule deux voire trois pharmacophores actifs complémentaires : par exemple à la fois inducteur de translecture, correcteur d'adressage et/ou potentiateur constitue une approche innovante qui pourrait favoriser l'utilisation chez les malades en diminuant le nombre de médicaments à prendre au quotidien.

Sur la base d'une caractérisation complète, dont fonctionnelle, des mutants, nous proposons de classer les mutations d'*ABCB11* selon qu'elles affectent la synthèse, le trafic, l'activité ou la stabilité de la protéine (Tableau 3).

Dans le cadre de la médecine personnalisée, l'apport d'un traitement médical efficace, permettrait de surseoir (ou de différer) à la transplantation hépatique et représenterait une avancée considérable pour les enfants atteints de PFIC2. Des mutations de BSEP étant impliquées dans d'autres pathologies (cholestase récurrente bénigne, cholestase gravidique, lithiase biliaire, et cholestase médicamenteuse), les applications potentielles de ce travail pourront s'appliquer non seulement à ces pathologies mais pourront aussi être étendues à d'autres maladies génétiques.

Tableau 4 : Classification des mutations d'*ABCB11* associées à une PFIC2

<i>Classes</i>	<i>Défauts</i>	<i>Mutations</i>	<i>Thérapies potentielles</i>
Classe I	Non-sens	p.Y354X p.R145X p.R470X p.R1057X p.R1090X p.E1302X	Inducteurs de translecture (aminoglycosides)
Classe II	Adressage/maturation	p.R1128C p.T1210P p.G982R	Drogues chaperones (4-PB, GPB)
Classe III	Activité	p.T463I p.R1090C p.R1090W	Potentiateurs (Ivacaftor)
Classe IV	Stabilité	p.A257V	Agonistes des récepteurs nucléaires (Acide obéticholique)

Références bibliographiques

1. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol* 2013;3:1035-1078.
2. Hépatogastro-Entérologie CdUe, editor. Les fondamentaux de la pathologie digestive. Editions Elsevier-Masson ed; 2014.
3. Ninomiya R, Matsuoka K, Moroi Y. Micelle formation of sodium chenodeoxycholate and solubilization into the micelles: comparison with other unconjugated bile salts. *Biochim Biophys Acta* 2003;1634:116-125.
4. Farina A, Dumonceau JM, Frossard JL, Hadengue A, Hochstrasser DF, Lescuyer P. Proteomic analysis of human bile from malignant biliary stenosis induced by pancreatic cancer. *J Proteome Res* 2009;8:159-169.
5. Holzbach RT, Marsh M, Olszewski M, Holan K. Cholesterol solubility in bile. Evidence that supersaturated bile is frequent in healthy man. *J Clin Invest* 1973;52:1467-1479.
6. Reshetnyak VI. Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation. *World J Gastroenterol* 2013;19:7341-7360.
7. Vlahcevic ZR, Jairath SK, Heuman DM, Stravitz RT, Hylemon PB, Avadhani NG, Pandak WM. Transcriptional regulation of hepatic sterol 27-hydroxylase by bile acids. *Am J Physiol* 1996;270:G646-652.
8. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 2009;89:147-191.
9. Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol* 2013;3:1191-1212.
10. Hofmann AF. Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* 2004;36:703-722.
11. Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res* 2009;50:1955-1966.
12. Trauner M, Fuchs CD, Halilbasic E, Paumgartner G. New therapeutic concepts in bile acid transport and signaling for management of cholestasis. *Hepatology* 2017;65:1393-1404.
13. Russell DW, Setchell KD. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 1992;31:4737-4749.
14. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 2000;6:517-526.

15. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2005;2:217-225.
16. Chiang JYL. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Res* 2017;1:3-9.
17. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 2003;83:633-671.
18. Boyer JL. New concepts of mechanisms of hepatocyte bile formation. *Physiol Rev* 1980;60:303-326.
19. Blitzer BL, Boyer JL. Cytochemical localization of Na⁺, K⁺-ATPase in the rat hepatocyte. *J Clin Invest* 1978;62:1104-1108.
20. Sztul ES, Biemesderfer D, Caplan MJ, Kashgarian M, Boyer JL. Localization of Na⁺,K⁺-ATPase alpha-subunit to the sinusoidal and lateral but not canalicular membranes of rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1987;104:1239-1248.
21. Latham PS, Kashgarian M. The ultrastructural localization of transport ATPase in the rat liver at non-bile canalicular plasma membranes. *Gastroenterology* 1979;76:988-996.
22. Graf J, Henderson RM, Krumpholz B, Boyer JL. Cell membrane and transepithelial voltages and resistances in isolated rat hepatocyte couplets. *J Membr Biol* 1987;95:241-254.
23. Fattinger K, Cattori V, Hagenbuch B, Meier PJ, Stieger B. Rifamycin SV and rifampicin exhibit differential inhibition of the hepatic rat organic anion transporting polypeptides, Oatp1 and Oatp2. *Hepatology* 2000;32:82-86.
24. Treiber A, Schneiter R, Hausler S, Stieger B. Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1400-1407.
25. Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Karpen SJ. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 2001;121:140-147.
26. Webster CR, Blanch C, Anwer MS. Role of PP2B in cAMP-induced dephosphorylation and translocation of NTCP. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G44-50.
27. Mukhopadhyay S, Ananthanarayanan M, Stieger B, Meier PJ, Suchy FJ, Anwer MS. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a serine, threonine phosphoprotein and is dephosphorylated by cyclic adenosine monophosphate. *Hepatology* 1998;28:1629-1636.

28. Hagenbuch B, Dawson P. The sodium bile salt cotransport family SLC10. *Pflugers Arch* 2004;447:566-570.
29. Geyer J, Wilke T, Petzinger E. The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006;372:413-431.
30. Shneider BL, Dawson PA, Christie DM, Hardikar W, Wong MH, Suchy FJ. Cloning and molecular characterization of the ontogeny of a rat ileal sodium-dependent bile acid transporter. *J Clin Invest* 1995;95:745-754.
31. Wong MH, Oelkers P, Dawson PA. Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity. *J Biol Chem* 1995;270:27228-27234.
32. Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ. Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis* 2000;20:273-292.
33. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 2004;447:653-665.
34. Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, et al. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 2001;120:525-533.
35. Obaidat A, Roth M, Hagenbuch B. The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:135-151.
36. Lee W, Glaeser H, Smith LH, Roberts RL, Moeckel GW, Gervasini G, Leake BF, et al. Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem* 2005;280:9610-9617.
37. Jung D, Hagenbuch B, Gresh L, Pontoglio M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA. Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver-specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. *J Biol Chem* 2001;276:37206-37214.
38. Vavricka SR, Jung D, Fried M, Grutzner U, Meier PJ, Kullak-Ublick GA. The human organic anion transporting polypeptide 8 (SLCO1B3) gene is transcriptionally repressed by hepatocyte nuclear factor 3beta in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004;40:212-218.

39. Jung D, Podvinec M, Meyer UA, Mangelsdorf DJ, Fried M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA. Human organic anion transporting polypeptide 8 promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *Gastroenterology* 2002;122:1954-1966.
40. Ballatori N, Li N, Fang F, Boyer JL, Christian WV, Hammond CL. OST alpha-OST beta: a key membrane transporter of bile acids and conjugated steroids. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:2829-2844.
41. 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;407:363-372.
42. Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS, et al. OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology* 2005;42:1270-1279.
43. Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV, Ballatori N. The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* 2005;280:6960-6968.
44. Fang F, Christian WV, Gorman SG, Cui M, Huang J, Tieu K, Ballatori N. Neurosteroid transport by the organic solute transporter OSTalpha-OSTbeta. *J Neurochem* 2010;115:220-233.
45. Landrier JF, Eloranta JJ, Vavricka SR, Kullak-Ublick GA. The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G476-485.
46. Boyer JL, Trauner M, Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Moustafa T, Zollner G, 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:G1124-1130.
47. Soroka CJ, Lee JM, Azzaroli F, Boyer JL. Cellular localization and up-regulation of multidrug resistance-associated protein 3 in hepatocytes and cholangiocytes during obstructive cholestasis in rat liver. *Hepatology* 2001;33:783-791.
48. Zamek-Gliszczyński MJ, Nezasa K, Tian X, Bridges AS, Lee K, Belinsky MG, Kruh GD, et al. Evaluation of the role of multidrug resistance-associated protein (Mrp) 3 and Mrp4 in hepatic basolateral excretion of sulfate and glucuronide metabolites of acetaminophen, 4-methylumbelliferone, and harmol in Abcc3^{-/-} and Abcc4^{-/-} mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;319:1485-1491.

49. Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, Sugiyama Y. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J Biol Chem* 2000;275:2905-2910.
50. Russel FG, Koenderink JB, Masereeuw R. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol Sci* 2008;29:200-207.
51. Slot AJ, Molinski SV, Cole SP. Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). *Essays Biochem* 2011;50:179-207.
52. Wen J, Luo J, Huang W, Tang J, Zhou H, Zhang W. The Pharmacological and Physiological Role of Multidrug-Resistant Protein 4. *J Pharmacol Exp Ther* 2015;354:358-375.
53. Leggas M, Adachi M, Scheffer GL, Sun D, Wielinga P, Du G, Mercer KE, et al. Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol Cell Biol* 2004;24:7612-7621.
54. 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;40:585-591.
55. Wagner M, Halilbasic E, Marschall HU, Zollner G, Fickert P, Langner C, Zatloukal K, et al. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology* 2005;42:420-430.
56. Sampath J, Adachi M, Hatse S, Naesens L, Balzarini J, Flatley RM, Matherly LH, et al. Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci* 2002;4:E14.
57. Mennone A, Soroka CJ, Cai SY, Harry K, Adachi M, Hagey L, Schuetz JD, et al. Mrp4-/- mice have an impaired cytoprotective response in obstructive cholestasis. *Hepatology* 2006;43:1013-1021.
58. Lecreur V, Sun D, Hargrove P, Schuetz EG, Kim RB, Lan LB, Schuetz JD. Cloning and expression of murine sister of P-glycoprotein reveals a more discriminating transporter than MDR1/P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* 2000;57:24-35.
59. Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 2000;102:731-744.
60. Green RM, Hoda F, Ward KL. Molecular cloning and characterization of the murine bile salt export pump. *Gene* 2000;241:117-123.
61. Meier PJ, Stieger B. Bile salt transporters. *Annu Rev Physiol* 2002;64:635-661.
62. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976;455:152-162.

63. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7735-7738.
64. Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, et al. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994;77:491-502.
65. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4028-4033.
66. Lam P, Wang R, Ling V. Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice. *Biochemistry* 2005;44:12598-12605.
67. Elferink RP, Tytgat GN, Groen AK. Hepatic canalicular membrane 1: The role of *mdr2* P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport. *FASEB J* 1997;11:19-28.
68. van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, van Meer G. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 1996;87:507-517.
69. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, 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.
70. Oude Elferink RP, Ottenhoff R, van Wijland M, Smit JJ, Schinkel AH, Groen AK. Regulation of biliary lipid secretion by *mdr2* P-glycoprotein in the mouse. *J Clin Invest* 1995;95:31-38.
71. Small DM. Role of ABC transporters in secretion of cholesterol from liver into bile. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4-6.
72. Nies AT, Gatmaitan Z, Arias IM. ATP-dependent phosphatidylcholine translocation in rat liver canalicular plasma membrane vesicles. *J Lipid Res* 1996;37:1125-1136.
73. Huang L, Zhao A, Lew JL, Zhang T, Hrywna Y, Thompson JR, de Pedro N, et al. Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3. *J Biol Chem* 2003;278:51085-51090.
74. 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;32:341-347.

75. Deleuze JF, Jacquemin E, Dubuisson C, Cresteil D, Dumont M, Erlinger S, Bernard O, et al. Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology* 1996;23:904-908.
76. de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, et al. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:282-287.
77. Dixon PH, Weerasekera N, Linton KJ, Donaldson O, Chambers J, Egginton E, Weaver J, et al. Heterozygous MDR3 missense mutation associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy: evidence for a defect in protein trafficking. *Hum Mol Genet* 2000;9:1209-1217.
78. Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology* 2001;120:1459-1467.
79. Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, Kojima H, et al. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 2001;27:79-83.
80. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16237-16242.
81. Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 2003;278:48275-48282.
82. Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290:1771-1775.
83. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996;383:728-731.
84. Paulusma CC, Elferink RP, Jansen PL. Progressive familial intrahepatic cholestasis type 1. *Semin Liver Dis* 2010;30:117-124.
85. Devaux PF, Lopez-Montero I, Bryde S. Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. *Chem Phys Lipids* 2006;141:119-132.
86. Konig J, Rost D, Cui Y, Keppler D. Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology* 1999;29:1156-1163.
87. Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors

pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem* 2002;277:2908-2915.

88. Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 1996;23:1061-1066.

89. Groen A, Romero MR, Kunne C, Hoosdally SJ, Dixon PH, Wooding C, Williamson C, et al. Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology* 2011;141:1927-1937 e1921-1924.

90. Nicolaou M, Andress EJ, Zolnerciks JK, Dixon PH, Williamson C, Linton KJ. Canalicular ABC transporters and liver disease. *J Pathol* 2012;226:300-315.

91. Bretscher MS. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol* 1972;236:11-12.

92. Bull LN, van Eijk MJ, Pawlikowska L, DeYoung JA, Juijn JA, Liao M, Klomp LW, et al. A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 1998;18:219-224.

93. Paulusma CC, Folmer DE, Ho-Mok KS, de Waart DR, Hilarius PM, Verhoeven AJ, Oude Elferink RP. ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology* 2008;47:268-278.

94. Paulusma CC, Groen A, Kunne C, Ho-Mok KS, Spijkerboer AL, Rudi de Waart D, Hoek FJ, et al. Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport. *Hepatology* 2006;44:195-204.

95. Childs S, Yeh RL, Georges E, Ling V. Identification of a sister gene to P-glycoprotein. *Cancer Res* 1995;55:2029-2034.

96. Childs S, Yeh RL, Hui D, Ling V. Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer Res* 1998;58:4160-4167.

97. Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, et al. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 1998;273:10046-10050.

98. Klein I, Sarkadi B, Varadi A. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999;1461:237-262.

99. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:67-113.

100. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:3-29.
101. Noe J, Hagenbuch B, Meier PJ, St-Pierre MV. Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system. *Hepatology* 2001;33:1223-1231.
102. Noe J, Stieger B, Meier PJ. Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver. *Gastroenterology* 2002;123:1659-1666.
103. Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM, Klein K, Schaeffeler E, Nussler AK, Nussler N, et al. Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology* 2006;44:62-74.
104. Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ, Thompson RJ. The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 2002;123:1649-1658.
105. Mochizuki K, Kagawa T, Numari A, Harris MJ, Itoh J, Watanabe N, Mine T, et al. Two N-linked glycans are required to maintain the transport activity of the bile salt export pump (ABCB11) in MDCK II cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G818-828.
106. Lai Y: The bile salt export pump (BSEP/ABCB11). In: ScienceDirect, ed. *Transporters in Drug Discovery and Development*, 2013; 327-352.
107. Hirano M, Maeda K, Hayashi H, Kusuhara H, Sugiyama Y. Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:876-882.
108. Padda MS, Sanchez M, Akhtar AJ, Boyer JL. Drug-induced cholestasis. *Hepatology* 2011;53:1377-1387.
109. Fattinger K, Funk C, Pantze M, Weber C, Reichen J, Stieger B, Meier PJ. The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:223-231.
110. Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 2000;118:422-430.
111. Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem* 2001;276:28857-28865.
112. Gerloff T, Geier A, Roots I, Meier PJ, Gattung C. Functional analysis of the rat bile salt export pump gene promoter. *Eur J Biochem* 2002;269:3495-3503.

113. Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, Faber KN, Jansen PL, Muller M. Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump. *Hepatology* 2002;35:589-596.
114. Ananthanarayanan M, Li Y, Surapureddi S, Balasubramaniyan N, Ahn J, Goldstein JA, Suchy FJ. Histone H3K4 trimethylation by MLL3 as part of ASCOM complex is critical for NR activation of bile acid transporter genes and is downregulated in cholestasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;300:G771-781.
115. Chopra AR, Kommagani R, Saha P, Louet JF, Salazar C, Song J, Jeong J, et al. Cellular energy depletion resets whole-body energy by promoting coactivator-mediated dietary fuel absorption. *Cell Metab* 2011;13:35-43.
116. Kubitz R, Droge C, Stindt J, Weissenberger K, Haussinger D. The bile salt export pump (BSEP) in health and disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36:536-553.
117. Woods A, Heslegrave AJ, Muckett PJ, Levene AP, Clements M, Mobberley M, Ryder TA, et al. LKB1 is required for hepatic bile acid transport and canalicular membrane integrity in mice. *Biochem J* 2011;434:49-60.
118. Song X, Kaimal R, Yan B, Deng R. Liver receptor homolog 1 transcriptionally regulates human bile salt export pump expression. *J Lipid Res* 2008;49:973-984.
119. Matakis C, Magnier BC, Houten SM, Annicotte JS, Argmann C, Thomas C, Overmars H, et al. Compromised intestinal lipid absorption in mice with a liver-specific deficiency of liver receptor homolog 1. *Mol Cell Biol* 2007;27:8330-8339.
120. Honjo Y, Sasaki S, Kobayashi Y, Misawa H, Nakamura H. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its receptor inhibit the chenodeoxycholic acid-dependent transactivation by farnesoid X receptor. *J Endocrinol* 2006;188:635-643.
121. Klaassen CD, Reisman SA. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;244:57-65.
122. Tan KP, Yang M, Ito S. Activation of nuclear factor (erythroid-2 like) factor 2 by toxic bile acids provokes adaptive defense responses to enhance cell survival at the emergence of oxidative stress. *Mol Pharmacol* 2007;72:1380-1390.
123. Weerachayaphorn J, Cai SY, Soroka CJ, Boyer JL. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 is a positive regulator of human bile salt export pump expression. *Hepatology* 2009;50:1588-1596.
124. Matlack KE, Mothes W, Rapoport TA. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 1998;92:381-390.

125. Farinha CM, Canato S. From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cell Mol Life Sci* 2017;74:39-55.
126. 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;119:1173-1182.
127. 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;14:611-624.
128. 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;275:15917-15925.
129. 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;15:3485-3496.
130. Ullrich O, Reinsch S, Urbe S, Zerial M, Parton RG. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol* 1996;135:913-924.
131. Kipp H, Arias IM. Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters. *Semin Liver Dis* 2000;20:339-351.
132. Gatmaitan ZC, Nies AT, Arias IM. Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver. *Am J Physiol* 1997;272:G1041-1049.
133. Beuers U, Bilzer M, Chittattu A, Kullak-Ublick GA, Keppler D, Paumgartner G, Dombrowski F. 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;33:1206-1216.
134. Dombrowski F, Stieger B, Beuers U. Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver. *Lab Invest* 2006;86:166-174.
135. 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;121:407-419.
136. Hayakawa T, Bruck R, Ng OC, Boyer JL. DBcAMP stimulates vesicle transport and HRP excretion in isolated perfused rat liver. *Am J Physiol* 1990;259:G727-735.
137. 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;273:26638-26644.

138. Paulusma CC, Kothe MJ, Bakker CT, Bosma PJ, van Bokhoven I, van Marle J, Bolder U, et al. Zonal down-regulation and redistribution of the multidrug resistance protein 2 during bile duct ligation in rat liver. *Hepatology* 2000;31:684-693.
139. Rost D, Kartenbeck J, Keppler D. Changes in the localization of the rat canalicular conjugate export pump Mrp2 in phalloidin-induced cholestasis. *Hepatology* 1999;29:814-821.
140. Lam P, Pearson CL, Soroka CJ, Xu S, Mennone A, Boyer JL. Levels of plasma membrane expression in progressive and benign mutations of the bile salt export pump (Bsep/Abcb11) correlate with severity of cholestatic diseases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C1709-1716.
141. 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;102:15087-15092.
142. Kipp H, Pichetshote N, Arias IM. Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver. *J Biol Chem* 2001;276:7218-7224.
143. Chan W, Calderon G, Swift AL, Moseley J, Li S, Hosoya H, Arias IM, 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;280:23741-23747.
144. Kruglov EA, Gautam S, Guerra MT, Nathanson MH. Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates bile salt export pump activity in rat hepatocytes. *Hepatology* 2011;54:1790-1799.
145. 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;279:32761-32770.
146. Soroka CJ, Boyer JL. Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: therapeutic implications of BSEP mutations. *Mol Aspects Med* 2014;37:3-14.
147. Hayashi H, Inamura K, Aida K, Naoi S, Horikawa R, Nagasaka H, Takatani T, et al. AP2 adaptor complex mediates bile salt export pump internalization and modulates its hepatocanalicular expression and transport function. *Hepatology* 2012;55:1889-1900.
148. Ward CL, Omura S, Kopito RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 1995;83:121-127.
149. Tsai B, Ye Y, Rapoport TA. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:246-255.

150. Wang L, Dong H, Soroka CJ, Wei N, Boyer JL, Hochstrasser M. Degradation of the bile salt export pump at endoplasmic reticulum in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *Hepatology* 2008;48:1558-1569.
151. Hayashi H, Takada T, Suzuki H, Akita H, Sugiyama Y. Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11. *Hepatology* 2005;41:916-924.
152. Wang L, Soroka CJ, Boyer JL. The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest* 2002;110:965-972.
153. Plass JR, Mol O, Heegsma J, Geuken M, de Bruin J, Elling G, Muller M, et al. A progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 mutation causes an unstable, temperature-sensitive bile salt export pump. *J Hepatol* 2004;40:24-30.
154. Benharouga M, Haardt M, Kartner N, Lukacs GL. COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J Cell Biol* 2001;153:957-970.
155. Kagawa T, Watanabe N, Mochizuki K, Numari A, Ikeno Y, Itoh J, Tanaka H, et al. Phenotypic differences in PFIC2 and BRIC2 correlate with protein stability of mutant Bsep and impaired taurocholate secretion in MDCK II cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;294:G58-67.
156. Chen HL, Wu SH, Hsu SH, Liou BY, Chen HL, Chang MH. Jaundice revisited: recent advances in the diagnosis and treatment of inherited cholestatic liver diseases. *J Biomed Sci* 2018;25:75.
157. Clayton RJ, Iber FL, Ruebner BH, McKusick VA. Byler disease. Fatal familial intrahepatic cholestasis in an Amish kindred. *Am J Dis Child* 1969;117:112-124.
158. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:1.
159. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36 Suppl 1:S26-35.
160. Hori T, Nguyen JH, Uemoto S. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010;9:570-578.
161. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998;20:233-238.

162. 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.
163. Jacquemin E, De Vree JM, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, Scheffer GL, et al. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* 2001;120:1448-1458.
164. Wendum D, Barbu V, Rosmorduc O, Arrive L, Flejou JF, Poupon R. Aspects of liver pathology in adult patients with MDR3/ABCB4 gene mutations. *Virchows Arch* 2012;460:291-298.
165. Sambrotta M, Strautnieks S, Papouli E, Rushton P, Clark BE, Parry DA, Logan CV, et al. Mutations in TJP2 cause progressive cholestatic liver disease. *Nat Genet* 2014;46:326-328.
166. Gomez-Ospina N, Potter CJ, Xiao R, Manickam K, Kim MS, Kim KH, Shneider BL, et al. Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Commun* 2016;7:10713.
167. Qiu YL, Gong JY, Feng JY, Wang RX, Han J, Liu T, Lu Y, et al. Defects in myosin VB are associated with a spectrum of previously undiagnosed low gamma-glutamyltransferase cholestasis. *Hepatology* 2017;65:1655-1669.
168. Gonzales E, Taylor SA, Davit-Spraul A, Thebaut A, Thomassin N, Guettier C, Whittington PF, et al. MYO5B mutations cause cholestasis with normal serum gamma-glutamyl transferase activity in children without microvillous inclusion disease. *Hepatology* 2017;65:164-173.
169. Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, Baussan C, Gonzales E, Stieger B, Bernard O, et al. ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 2010;51:1645-1655.
170. Gonzales E, Spraul A, Jacquemin E. Clinical utility gene card for: progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *Eur J Hum Genet* 2014;22.
171. Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, Cebecauerova D, Rayner A, Dutton L, Meier Y, et al. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* 2008;134:1203-1214.
172. Sticova E, Jirsa M, Pawlowska J. New Insights in Genetic Cholestasis: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018;2018:2313675.

173. Keitel V, Burdelski M, Vojnisek Z, Schmitt L, Haussinger D, Kubitz R. De novo bile salt transporter antibodies as a possible cause of recurrent graft failure after liver transplantation: a novel mechanism of cholestasis. *Hepatology* 2009;50:510-517.
174. Droge C, Bonus M, Baumann U, Klindt C, Lainka E, Kathemann S, Brinkert F, et al. Sequencing of FIC1, BSEP and MDR3 in a large cohort of patients with cholestasis revealed a high number of different genetic variants. *J Hepatol* 2017;67:1253-1264.
175. Bull LN, Carlton VE, Stricker NL, Baharloo S, DeYoung JA, Freimer NB, Magid MS, et al. Genetic and morphological findings in progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease [PFIC-1] and Byler syndrome): evidence for heterogeneity. *Hepatology* 1997;26:155-164.
176. Locher KP. Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2009;364:239-245.
177. Byrne JA, Strautnieks SS, Ihrke G, Pagani F, Knisely AS, Linton KJ, Mieli-Vergani G, et al. Missense mutations and single nucleotide polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre-messenger RNA splicing. *Hepatology* 2009;49:553-567.
178. Wessel DV TR, Grammatikopoulos T, Kadaristiana A, Jankowska I, Lipiński P et al (NAtural course and Prognosis of PFIC and Effect of biliary Diversion). The Natural Course of Bsep Deficiency: Results from the Global Napped-Consortium [Abstract]. *Hepatology* 2018;68:1-183: 185A.
179. Meier Y, Zodan T, Lang C, Zimmermann R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, Stieger B, et al. Increased susceptibility for intrahepatic cholestasis of pregnancy and contraceptive-induced cholestasis in carriers of the 1331T>C polymorphism in the bile salt export pump. *World J Gastroenterol* 2008;14:38-45.
180. Linde L, Kerem B. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet* 2008;24:552-563.
181. Gonzales E, Grosse B, Schuller B, Davit-Spraul A, Conti F, Guettier C, Cassio D, et al. Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology* 2015;62:558-566.
182. Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990;63:827-834.
183. European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol* 2009;51:237-267.

184. Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology* 2002;36:525-531.
185. van der Woerd WL, Houwen RH, van de Graaf SF. Current and future therapies for inherited cholestatic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2017;23:763-775.
186. Fiorucci S, Clerici C, Antonelli E, Orlandi S, Goodwin B, Sadeghpour BM, Sabatino G, et al. Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:604-612.
187. 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;27:137-144.
188. Zhou M, Learned RM, Rossi SJ, DePaoli AM, Tian H, Ling L. Engineered fibroblast growth factor 19 reduces liver injury and resolves sclerosing cholangitis in Mdr2-deficient mice. *Hepatology* 2016;63:914-929.
189. Bordeira-Carrico R, Pego AP, Santos M, Oliveira C. Cancer syndromes and therapy by stop-codon readthrough. *Trends Mol Med* 2012;18:667-678.
190. Roy B, Leszyk JD, Mangus DA, Jacobson A. Nonsense suppression by near-cognate tRNAs employs alternative base pairing at codon positions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:3038-3043.
191. Dabrowski M, Bukowy-Bieryllo Z, Zietkiewicz E. Advances in therapeutic use of a drug-stimulated translational readthrough of premature termination codons. *Mol Med* 2018;24:25.
192. Manuvakhova M, Keeling K, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA* 2000;6:1044-1055.
193. Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 1996;2:467-469.
194. Bidou L, Hatin I, Perez N, Allamand V, Panthier JJ, Rousset JP. Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. *Gene Ther* 2004;11:619-627.
195. 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:e1002608.
196. McCaughan KK, Brown CM, Dalphin ME, Berry MJ, Tate WP. Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5431-5435.

197. Cassan M, Rousset JP. UAG readthrough in mammalian cells: effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals. *BMC Mol Biol* 2001;2:3.
198. Loughran G, Chou MY, Ivanov IP, Jungreis I, Kellis M, Kiran AM, Baranov PV, et al. Evidence of efficient stop codon readthrough in four mammalian genes. *Nucleic Acids Res* 2014;42:8928-8938.
199. Floquet C, Rousset JP, Bidou L. [Allele-specific therapy: suppression of nonsense mutations by readthrough inducers]. *Med Sci (Paris)* 2012;28:193-199.
200. Bonetti B, Fu L, Moon J, Bedwell DM. The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 1995;251:334-345.
201. Celik A, Kervestin S, Jacobson A. NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling. *Biochimie* 2015;114:2-9.
202. Lejeune F. Nonsense-mediated mRNA decay at the crossroads of many cellular pathways. *BMB Rep* 2017;50:175-185.
203. Ivanov PV, Gehring NH, Kunz JB, Hentze MW, Kulozik AE. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J* 2008;27:736-747.
204. Amrani N, Ganesan R, Kervestin S, Mangus DA, Ghosh S, Jacobson A. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 2004;432:112-118.
205. Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, Virgilis D, et al. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest* 2007;117:683-692.
206. Khajavi M, Inoue K, Lupski JR. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet* 2006;14:1074-1081.
207. Keeling KM, Xue X, Gunn G, Bedwell DM. Therapeutics based on stop codon readthrough. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2014;15:371-394.
208. Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, et al. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* 2003;349:1433-1441.
209. Moazed D, Noller HF. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* 1987;327:389-394.
210. Fan-Minogue H, Bedwell DM. Eukaryotic ribosomal RNA determinants of aminoglycoside resistance and their role in translational fidelity. *RNA* 2008;14:148-157.

211. Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1003-1012.
212. Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 1999;104:375-381.
213. Clancy JP, Bebok Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, et al. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1683-1692.
214. Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, Bidou L, Parbaille B, Pierrot S, Davy N, et al. In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med* 2007;5:5.
215. Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Wall C, King W, Al-Dahhak R, Lewis S, et al. Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 2010;67:771-780.
216. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007;447:87-91.
217. Du M, Liu X, Welch EM, Hirawat S, Peltz SW, Bedwell DM. PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2064-2069.
218. Yukihiro M, Ito K, Tanoue O, Goto K, Matsushita T, Matsumoto Y, Masuda M, et al. Effective drug delivery system for duchenne muscular dystrophy using hybrid liposomes including gentamicin along with reduced toxicity. *Biol Pharm Bull* 2011;34:712-716.
219. Finkel RS, Flanigan KM, Wong B, Bonnemann C, Sampson J, Sweeney HL, Reha A, et al. Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 2013;8:e81302.
220. Lentini L, Melfi R, Di Leonardo A, Spinello A, Barone G, Pace A, Palumbo Piccionello A, et al. Toward a rationale for the PTC124 (Ataluren) promoted readthrough of premature stop codons: a computational approach and GFP-reporter cell-based assay. *Mol Pharm* 2014;11:653-664.
221. Roy B, Friesen WJ, Tomizawa Y, Leszyk JD, Zhuo J, Johnson B, Dakka J, et al. Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113:12508-12513.

222. Dabrowski M, Bukowy-Bieryllo Z, Zietkiewicz E. Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes--The impact of RNA sequence. *RNA Biol* 2015;12:950-958.
223. Feng YX, Copeland TD, Oroszlan S, Rein A, Levin JG. Identification of amino acids inserted during suppression of UAA and UGA termination codons at the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:8860-8863.
224. Urban C, Beier H. Cysteine tRNAs of plant origin as novel UGA suppressors. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4591-4597.
225. Nilsson M, Ryden-Aulin M. Glutamine is incorporated at the nonsense codons UAG and UAA in a suppressor-free *Escherichia coli* strain. *Biochim Biophys Acta* 2003;1627:1-6.
226. Fearon K, McClendon V, Bonetti B, Bedwell DM. Premature translation termination mutations are efficiently suppressed in a highly conserved region of yeast Ste6p, a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *J Biol Chem* 1994;269:17802-17808.
227. Blanchet S, Rowe M, Von der Haar T, Fabret C, Demais S, Howard MJ, Namy O. New insights into stop codon recognition by eRF1. *Nucleic Acids Res* 2015;43:3298-3308.
228. Xue X, Mutyam V, Thakerar A, Mobley J, Bridges RJ, Rowe SM, Keeling KM, et al. Identification of the amino acids inserted during suppression of CFTR nonsense mutations and determination of their functional consequences. *Hum Mol Genet* 2017;26:3116-3129.
229. Blanchet S, Cornu D, Argentini M, Namy O. New insights into the incorporation of natural suppressor tRNAs at stop codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 2014;42:10061-10072.
230. Martin GM, Chen PC, Devaraneni P, Shyng SL. Pharmacological rescue of trafficking-impaired ATP-sensitive potassium channels. *Front Physiol* 2013;4:386.
231. Gautherot J, Durand-Schneider AM, Delautier D, Delaunay JL, Rada A, Gabillet J, Housset C, 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.
232. Cheepala SB, Bao J, Nachagari D, Sun D, Wang Y, Zhong TP, Naren AP, et al. Crucial role for phylogenetically conserved cytoplasmic loop 3 in ABCC4 protein expression. *J Biol Chem* 2013;288:22207-22218.
233. Sampson HM, Lam H, Chen PC, Zhang D, Mottillo C, Mirza M, Qasim K, et al. Compounds that correct F508del-CFTR trafficking can also correct other protein trafficking diseases: an in vitro study using cell lines. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:11.

234. Morello JP, Petaja-Repo UE, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding. *Trends Pharmacol Sci* 2000;21:466-469.
235. Loo TW, Clarke DM. Nonylphenol ethoxylates, but not nonylphenol, are substrates of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:478-480.
236. 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;288:32622-32636.
237. Loo TW, Clarke DM. Tariquidar inhibits P-glycoprotein drug efflux but activates ATPase activity by blocking transition to an open conformation. *Biochem Pharmacol* 2014;92:558-566.
238. Brossmer R, Patscheke H. 2-phenylethanol and some of its amphiphilic derivatives as inhibitors of platelet aggregation. Structure-activity relationship. *Arzneimittelforschung* 1975;25:1697-1702.
239. Wright JM, Zeitlin PL, Cebotaru L, Guggino SE, Guggino WB. Gene expression profile analysis of 4-phenylbutyrate treatment of IB3-1 bronchial epithelial cell line demonstrates a major influence on heat-shock proteins. *Physiol Genomics* 2004;16:204-211.
240. Dover GJ, Brusilow S, Samid D. Increased fetal hemoglobin in patients receiving sodium 4-phenylbutyrate. *N Engl J Med* 1992;327:569-570.
241. Perrine SP, Ginder GD, Faller DV, Dover GH, Ikuta T, Witkowska HE, Cai SP, et al. A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the beta-globin disorders. *N Engl J Med* 1993;328:81-86.
242. Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, Bassett SS. Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency. *N Engl J Med* 1996;335:855-859.
243. Kubota K, Niinuma Y, Kaneko M, Okuma Y, Sugai M, Omura T, Uesugi M, et al. Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem* 2006;97:1259-1268.
244. Kolb PS, Ayaub EA, Zhou W, Yum V, Dickhout JG, Ask K. The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;61:45-52.
245. Iannitti T, Palmieri B. Clinical and experimental applications of sodium phenylbutyrate. *Drugs R D* 2011;11:227-249.
246. Brose RD, Shin G, McGuinness MC, Schneidereith T, Purvis S, Dong GX, Keefer J, et al. Activation of the stress proteome as a mechanism for small molecule therapeutics. *Hum Mol Genet* 2012;21:4237-4252.

247. Rubenstein RC, Zeitlin PL. Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:C259-267.
248. 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;100:2457-2465.
249. Zeitlin PL, Diener-West M, Rubenstein RC, Boyle MP, Lee CK, Brass-Ernst L. Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate. *Mol Ther* 2002;6:119-126.
250. 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;45:1506-1516.
251. 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;57:695-698.
252. Naoi S, Hayashi H, Inoue T, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, Kage M, 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;164:1219-1227 e1213.
253. Hasegawa Y, Hayashi H, Naoi S, Kondou H, Bessho K, Igarashi K, Hanada K, et al. Intractable itch relieved by 4-phenylbutyrate therapy in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 1. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:89.
254. Hayashi H, Naoi S, Hirose Y, Matsuzaka Y, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, et al. Successful treatment with 4-phenylbutyrate in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 refractory to biliary drainage and bilirubin absorption. *Hepatol Res* 2016;46:192-200.
255. Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, Ballmann M, et al. Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* 2012;67:12-18.
256. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, et al. Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015;373:220-231.

257. Van Goor F, Straley KS, Cao D, Gonzalez J, Hadida S, Hazlewood A, Joubran J, 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:L1117-1130.
258. Wade PA. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet* 2001;10:693-698.
259. Loo TW, Bartlett MC, Clarke DM. Thapsigargin or curcumin does not promote maturation of processing mutants of the ABC transporters, CFTR, and P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:580-585.
260. Grubb BR, Gabriel SE, Mengos A, Gentsch M, Randell SH, Van Heeckeren AM, Knowles MR, et al. SERCA pump inhibitors do not correct biosynthetic arrest of deltaF508 CFTR in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:355-363.
261. Norez C, Noel S, Wilke M, Bijvelds M, Jorna H, Melin P, DeJonge H, et al. Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett* 2006;580:2081-2086.
262. Moran O. Model of the cAMP activation of chloride transport by CFTR channel and the mechanism of potentiators. *J Theor Biol* 2010;262:73-79.
263. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Cao D, Neuberger T, Turnbull A, 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.
264. Yu H, Burton B, Huang CJ, Worley J, Cao D, Johnson JP, Jr., Urrutia A, et al. Ivacaftor potentiation of multiple CFTR channels with gating mutations. *J Cyst Fibros* 2012;11:237-245.
265. Delaunay JL, Bruneau A, Hoffmann B, Durand-Schneider AM, Barbu V, Jacquemin E, Maurice M, 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;65:560-570.
266. Van der Plas SE, Kelgtermans H, De Munck T, Martina SLX, Dropsit S, Quinton E, De Blicke A, et al. Discovery of N-(3-Carbamoyl-5,5,7,7-tetramethyl-5,7-dihydro-4H-thieno[2,3-c]pyran-2-yl)-1H-pyr azole-5-carboxamide (GLPG1837), a Novel Potentiator Which Can Open Class III Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Channels to a High Extent. *J Med Chem* 2018;61:1425-1435.
267. Gees M, Musch S, Van der Plas S, Wesse AS, Vandeveldel A, Verdonck K, Mammoliti O, et al. Identification and Characterization of Novel CFTR Potentiators. *Front Pharmacol* 2018;9:1221.

268. Chen HL, Wang R, Chen HL, Hwu WL, Jeng YM, Chang MH, Ling V. Bone marrow transplantation results in donor-derived hepatocytes in an animal model of inherited cholestatic liver disease. *J Biomed Sci* 2008;15:615-622.
269. 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;28:530-536.
270. Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 1996;12:266-273.
271. Chen HL, Chen HL, Yuan RH, Wu SH, Chen YH, Chien CS, Chou SP, et al. Hepatocyte transplantation in bile salt export pump-deficient mice: selective growth advantage of donor hepatocytes under bile acid stress. *J Cell Mol Med* 2012;16:2679-2689.
272. Heath RD, Ertem F, Romana BS, Ibdah JA, Tahan V. Hepatocyte transplantation: Consider infusion before incision. *World J Transplant* 2017;7:317-323.
273. Quaglia A, Lehec SC, Hughes RD, Mitry RR, Knisely AS, Devereaux S, Richards J, et al. Liver after hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders in children. *Cell Transplant* 2008;17:1403-1414.
274. Boudechiche L, Tranchart H, Branchereau S, Davit-Spraul A, Lainas P, Groyer-Picard MT, Weber A, et al. Improvement of hepatocyte transplantation efficiency in the *mdr2*^{-/-} mouse model by glyceryl trinitrate. *Transplantation* 2015;99:36-40.
275. Flotte TR, Afione SA, Solow R, Drumm ML, Markakis D, Guggino WB, Zeitlin PL, et al. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 1993;268:3781-3790.
276. Jenks S. Gene therapy death--"everyone has to share in the guilt". *J Natl Cancer Inst* 2000;92:98-100.
277. Wang L, Wu J, Fang W, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Regenerative medicine: targeted genome editing in vivo. *Cell Res* 2015;25:271-272.
278. Nguyen VT, Morange M, Bensaude O. Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells. *Anal Biochem* 1988;171:404-408.
279. Grosse B, Degrouard J, Jaillard D, Cassio D. Build them up and break them down: Tight junctions of cell lines expressing typical hepatocyte polarity with a varied repertoire of claudins. *Tissue Barriers* 2013;1:e25210.

280. Auld DS, Thorne N, Maguire WF, Inglese J. Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:3585-3590.
281. Peltz SW, Welch EM, Jacobson A, Trotta CR, Naryshkin N, Sweeney HL, Bedwell DM. Nonsense suppression activity of PTC124 (ataluren). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:E64; author reply E65.
282. Brumm H, Muhlhaus J, Bolze F, Scherag S, Hinney A, Hebebrand J, Wiegand S, et al. Rescue of melanocortin 4 receptor (MC4R) nonsense mutations by aminoglycoside-mediated read-through. *Obesity (Silver Spring)* 2012;20:1074-1081.
283. Cogan J, Weinstein J, Wang X, Hou Y, Martin S, South AP, Woodley DT, et al. Aminoglycosides restore full-length type VII collagen by overcoming premature termination codons: therapeutic implications for dystrophic epidermolysis bullosa. *Mol Ther* 2014;22:1741-1752.
284. Dranchak PK, Di Pietro E, Snowden A, Oesch N, Braverman NE, Steinberg SJ, Hacia JG. Nonsense suppressor therapies rescue peroxisome lipid metabolism and assembly in cells from patients with specific PEX gene mutations. *J Cell Biochem* 2011;112:1250-1258.
285. Gomez-Grau M, Garrido E, Cozar M, Rodriguez-Sureda V, Dominguez C, Arenas C, Gatti RA, et al. Evaluation of Aminoglycoside and Non-Aminoglycoside Compounds for Stop-Codon Readthrough Therapy in Four Lysosomal Storage Diseases. *PLoS One* 2015;10:e0135873.
286. Mullard A. EMA reconsiders 'read-through' drug against Duchenne muscular dystrophy following appeal. *Nat Biotechnol* 2014;32:706.
287. Du L, Jung ME, Damoiseaux R, Completo G, Fike F, Ku JM, Nahas S, et al. A new series of small molecular weight compounds induce read through of all three types of nonsense mutations in the ATM gene. *Mol Ther* 2013;21:1653-1660.
288. Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem* 2012;45:1132-1144.
289. Lopez-Novoa JM, Quiros Y, Vicente L, Morales AI, Lopez-Hernandez FJ. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 2011;79:33-45.
290. Xie J, Talaska AE, Schacht J. New developments in aminoglycoside therapy and ototoxicity. *Hear Res* 2011;281:28-37.

291. Bidou L, Bugaud O, Belakhov V, Baasov T, Namy O. Characterization of new-generation aminoglycoside promoting premature termination codon readthrough in cancer cells. *RNA Biol* 2017;14:378-388.
292. Xue X, Mutyam V, Tang L, Biswas S, Du M, Jackson LA, Dai Y, et al. Synthetic aminoglycosides efficiently suppress cystic fibrosis transmembrane conductance regulator nonsense mutations and are enhanced by ivacaftor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50:805-816.
293. Baradaran-Heravi A, Balgi AD, Zimmerman C, Choi K, Shidmoosavee FS, Tan JS, Bergeaud C, et al. Novel small molecules potentiate premature termination codon readthrough by aminoglycosides. *Nucleic Acids Res* 2016;44:6583-6598.
294. Friesen WJ, Trotta CR, Tomizawa Y, Zhuo J, Johnson B, Sierra J, Roy B, et al. The nucleoside analog clitocine is a potent and efficacious readthrough agent. *RNA* 2017;23:567-577.
295. Benhabiles H, Gonzalez-Hilarion S, Amand S, Bailly C, Prevotat A, Reix P, Hubert D, et al. Optimized approach for the identification of highly efficient correctors of nonsense mutations in human diseases. *PLoS One* 2017;12:e0187930.
296. Moosajee M, Tracey-White D, Smart M, Weetall M, Torriano S, Kalatzis V, da Cruz L, et al. Functional rescue of REP1 following treatment with PTC124 and novel derivative PTC-414 in human choroideremia fibroblasts and the nonsense-mediated zebrafish model. *Hum Mol Genet* 2016;25:3416-3431.
297. Mutyam V, Du M, Xue X, Keeling KM, White EL, Bostwick JR, Rasmussen L, et al. Discovery of Clinically Approved Agents That Promote Suppression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Nonsense Mutations. *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194:1092-1103.
298. Yao Y, Teng S, Li N, Zhang Y, Boyden PA, Pu J. Aminoglycoside antibiotics restore functional expression of truncated HERG channels produced by nonsense mutations. *Heart Rhythm* 2009;6:553-560.
299. Simon AJ, Lev A, Wolach B, Gavrieli R, Amariglio N, Rosenthal E, Gazit E, et al. The effect of gentamicin-induced readthrough on a novel premature termination codon of CD18 leukocyte adhesion deficiency patients. *PLoS One* 2010;5:e13659.
300. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Dossier C, Falguieres T, Gautherot J, Davit-Spraul A, Ait-Slimane T, et al. A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Hepatology* 2016;63:1620-1631.

301. Berry SA, Lichter-Konecki U, Diaz GA, McCandless SE, Rhead W, Smith W, Lemons C, et al. Glycerol phenylbutyrate treatment in children with urea cycle disorders: pooled analysis of short and long-term ammonia control and outcomes. *Mol Genet Metab* 2014;112:17-24.
302. Brusilow SW, Valle DL, Batshaw M. New pathways of nitrogen excretion in inborn errors of urea synthesis. *Lancet* 1979;2:452-454.
303. Monteleone JP, Mokhtarani M, Diaz GA, Rhead W, Lichter-Konecki U, Berry SA, Lemons C, et al. Population pharmacokinetic modeling and dosing simulations of nitrogen-scavenging compounds: disposition of glycerol phenylbutyrate and sodium phenylbutyrate in adult and pediatric patients with urea cycle disorders. *J Clin Pharmacol* 2013;53:699-710.
304. Oishi K, Diaz GA. Glycerol phenylbutyrate for the chronic management of urea cycle disorders. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2014;9:427-434.
305. Shneider BL, Morris A, Vockley J. Possible Phenylacetate Hepatotoxicity During 4-Phenylbutyrate Therapy of Byler Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2016;62:424-428.
306. Brusilow SW. Phenylacetylglutamine may replace urea as a vehicle for waste nitrogen excretion. *Pediatr Res* 1991;29:147-150.
307. Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, Chiao JH, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* 2007;109:31-39.
308. van der Woerd WL, Wichers CG, Vestergaard AL, Andersen JP, Paulusma CC, Houwen RH, van de Graaf SF. Rescue of defective ATP8B1 trafficking by CFTR correctors as a therapeutic strategy for familial intrahepatic cholestasis. *J Hepatol* 2016;64:1339-1347.
309. Bouche-careilh M, Hutt DM, Szajner P, Flotte TR, Balch WE. Histone deacetylase inhibitor (HDACi) suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)-mediated correction of alpha1-antitrypsin deficiency. *J Biol Chem* 2012;287:38265-38278.
310. Lu J, Yang C, Chen M, Ye DY, Lonser RR, Brady RO, Zhuang Z. Histone deacetylase inhibitors prevent the degradation and restore the activity of glucocerebrosidase in Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:21200-21205.
311. Okiyonedo T, Lukacs GL. Fixing cystic fibrosis by correcting CFTR domain assembly. *J Cell Biol* 2012;199:199-204.
312. Sabirzhanova I, Lopes Pacheco M, Rapino D, Grover R, Handa JT, Guggino WB, Cebotaru L. 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.

313. Lopes-Pacheco M, Boinot C, Sabirzhanova I, Rapino D, Cebotaru L. Combination of Correctors Rescues CFTR Transmembrane-Domain Mutants by Mitigating their Interactions with Proteostasis. *Cell Physiol Biochem* 2017;41:2194-2210.
314. Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glockner-Pagel J, Canny S, et al. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* 2004;304:600-602.
315. Song Y, Sonawane ND, Salinas D, Qian L, Pedemonte N, Galiotta LJ, Verkman AS. Evidence against the rescue of defective DeltaF508-CFTR cellular processing by curcumin in cell culture and mouse models. *J Biol Chem* 2004;279:40629-40633.
316. Garcea G, Jones DJ, Singh R, Dennison AR, Farmer PB, Sharma RA, Steward WP, et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer* 2004;90:1011-1015.
317. 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.

Titre : Pharmacothérapie ciblée de la cholestase familiale intrahépatique progressive de type 2 (PFIC2)

Mots clés : BSEP, mutation non-sens, mutation faux sens, translecture, drogues chaperones.

Résumé : *ABCB11*/BSEP est le transporteur des acides biliaries, localisé au niveau du pôle canaliculaire des hépatocytes. Les mutations de ce gène sont responsables de la cholestase familiale intrahépatique progressive de type 2.

Au cours de ma thèse, j'ai évalué la capacité des aminoglycosides et du PTC124 à induire la translecture de codons stop prématurés, l'adressage et la fonction de mutants non-sens et faux sens de Bsep ainsi que l'effet d'une bithérapie (translecture+chaperone).

Dans nos modèles cellulaires, la gentamicine était capable d'induire la translecture du codon-stop prématuré du mutant non-sens Bsep^{R1090X} dans les lignées NIH3T3, HEK293 et Can 10. La protéine entière générée était partiellement détectée aux membranes plasmiques des cellules

HEK293 et canaliculaires des cellules Can 10 et était partiellement fonctionnelle puisqu'elle était responsable d'une augmentation de l'activité de transport de ³H-taurocholate (³H-TC) dans les clones MDCK. Ces effets étaient potentialisés par l'addition de drogues chaperones telles que le 4-phenylbutyrate (4-PB).

J'ai également mis en évidence la capacité de nouveaux composés dérivés du 4-PB (MHMPB, OTNC et HMPB) à corriger l'adressage et à augmenter le transport de ³H-TC du mutant faux sens Bsep^{R1128C} à des concentrations plus faibles que le 4-PB. Enfin, j'ai pu montrer que d'autres drogues chaperones (GPB, PA, SAHA et C18), pouvaient corriger l'adressage canaliculaire de Bsep^{R1128C} et augmenter son activité de transport de ³H-TC dans les clones MDCK.

Title: Targeted pharmacotherapy of progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC 2)

Keywords: Bsep, nonsense mutations, missense mutations, readthrough, chaperone drugs.

Abstract: *ABCB11*/BSEP is the main bile acids transporter located at the canalicular pole of hepatocytes. Mutations of *ABCB11* are responsible for progressive familial intrahepatic cholestasis type 2.

During my PhD, I evaluated the ability of aminoglycosides and PTC124 to induce readthrough of premature termination codons, targeting and function of nonsense and missense mutants of Bsep and also the effect of combined therapy (readthrough + chaperone).

In our experimental models, gentamicin increased readthrough of p.R1090X mutation NIH3T3, HEK293 and Can 10 lines. The resulting full-length protein was detected at the plasma membrane of HEK293 and at the

canalicular membrane of Can 10 cells; and was partially functional since it was responsible for increasing the transport activity of ³H-taurocholate (³H-TC) in MDCK clones. These effects were potentiated by the addition of chaperone drugs such as 4-phenylbutyrate (4-PB).

I have also demonstrated the ability of new 4-PB derived compounds (MHMPB, OTNC and HMPB) to correct mistrafficking and to increase ³H-TC transport of Bsep^{R1128C} missense mutant at lower concentrations than 4-PB. Finally, I showed that other chaperone drugs (GPB, PA, SAHA, and C18) were able to correct mistrafficking of Bsep^{R1128C} and to increase its ³H-TC transport activity in MDCK clones.