



**HAL**  
open science

# Pharmacothérapie ciblée et partenaires moléculaires du transporteur biliaire ABCB4

Amel Ben Saad

► **To cite this version:**

Amel Ben Saad. Pharmacothérapie ciblée et partenaires moléculaires du transporteur biliaire ABCB4. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS061 . tel-03559123

**HAL Id: tel-03559123**

**<https://theses.hal.science/tel-03559123v1>**

Submitted on 6 Feb 2022

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

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

# Sorbonne Université

## *Ecole Doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique ED394*

*Centre de Recherche Saint-Antoine – UMR\_S 938 Inserm / Sorbonne Université  
Équipe « Maladies fibro-inflammatoires d'origine métabolique et biliaire du foie »  
Faculté des sciences d'Orsay – UMR\_S 1193 Inserm / Université Paris-Saclay  
Équipe « Homéostasie biliaire et Réparation du foie »*

## **Pharmacothérapie ciblée et partenaires moléculaires du transporteur biliaire ABCB4**

Par Amel Ben Saad

Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par Thomas Falguières

Présentée et soutenue publiquement le 4 février 2021

Devant un jury composé de :

Pr Xavier Houard, Professeur des Universités, Sorbonne Université (UMR\_S 938), Président du jury

Dr, Marion Bouchecareilh, CRCN CNRS, Université de Bordeaux (UMR\_S 1053), Rapporteur

Pr Pascale Fanen, PU-PH, AP-HP, Université Paris Est-Créteil (UMR\_S 955), Rapporteur

Dr Wilfried le Goff, CRCN Inserm, Sorbonne Université (UMR\_S 1166), Examineur

Dr Etienne Morel, DR2 Inserm, Université de Paris (Inserm U1151–CNRS UMR 8253), Examineur

Dr Thomas Falguières, CRCN Inserm, Université Paris Saclay (UMR\_S 1193), Directeur de thèse

# **-TABLE DES MATIERES-**

<b>-REMERCIEMENTS-</b> .....	<b>4</b>
<b>-LISTE DES ABRÉVIATIONS-</b> .....	<b>6</b>
<b>-RESUME-</b> .....	<b>7</b>
<b>-ABSTRACT-</b> .....	<b>8</b>
<b>-INTRODUCTION-</b> .....	<b>9</b>
<b>Chapitre I : La sécrétion biliaire : une fonction essentielle du foie</b> .....	<b>9</b>
I-1. Le foie et les voies biliaires .....	9
I-2. Rôles physiologiques de la bile .....	11
I-3. Formation de la bile.....	12
I-4. Composition de la bile.....	13
I-4-1. Les acides biliaires.....	13
I-4-2. Les phospholipides .....	15
I-4-3. Le cholestérol.....	16
I-4-4. Autres composants de la bile .....	17
I-5. La bile : un équilibre entre acides biliaires, cholestérol et phospholipides .....	17
I-6. Les principaux transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire.....	19
I-6-1. Les transporteurs hépatocytaires.....	20
I-6-2. Les transporteurs cholangiocytaires.....	21
I-6-3. Les transporteurs entérocytaires .....	21
I-6-4. Autres transporteurs.....	21
<b>Chapitre II : Le transporteur ABCB4 : un acteur majeur de la sécrétion biliaire</b> .....	<b>22</b>
II-1. Expression et fonction d'ABCB4.....	22
II-1-1. Découverte du gène .....	22
II-1-2. Expression et distribution tissulaire.....	23
II-1-3. Rôle physiologique.....	23
II-2. Structure et trafic d'ABCB4.....	24
II-2-1. ABCB4, un membre de la famille ABC .....	24
II-2-2. Structure d'ABCB4 .....	28
II-2-3. Régulation transcriptionnelle.....	30
II-2-4. Biosynthèse et repliement.....	31
II-2-5. Trafic intracellulaire .....	32
II-2-6. Partenaires moléculaires d'ABCB4.....	32
II-2-6-1. Les partenaires connus.....	33
II-2-6-2. RAB10, un nouveau partenaire potentiel d'ABCB4.....	33
II-2-6-2-1. RAB10, un membre de la famille RAB .....	34
II-2-6-2-2. Expression et localisation de RAB10.....	36
II-2-6-2-3. RAB10, une protéine multifonctionnelle .....	36
II-2-6-2-4. Physiopathologie de RAB10 .....	37
<b>Chapitre III : Pathologies associées à des défauts d'ABCB4 et approches thérapeutiques</b> .....	<b>38</b>
III-1. Pathologies associées à un dysfonctionnement d'ABCB4.....	38
III-1-1. La cholestase intrahépatique familiale progressive de type 3 (PFIC3) .....	38
III-1-2. Le syndrome de lithiase intrahépatique cholestérolique (LPAC).....	40
III-1-3. La cholestase gravidique (ICP) .....	40

III-1-4. Autres pathologies liées à des défauts d'ABCB4.....	40
III-2. Approches thérapeutiques existantes .....	41
III-2-1. L'acide ursodeoxycholique (UDCA) .....	41
III-2-2. La transplantation hépatique .....	41
III-3. Développement de nouvelles thérapies.....	42
III-3-1. Les variations génétiques d' <i>ABCB4</i> .....	42
III-3-2. Thérapie ciblée pour <i>ABCB4</i> .....	44
III-3-2-1. Translecture des codons stop prématurés pour les variants de classe I .....	44
III-3-2-2. Des correcteurs pour les variants de classe II.....	45
III-3-2-3. Développement de potentiateurs pour les variants de classe III.....	46
III-3-2-4. Cibler les récepteurs nucléaires régulant l'expression d' <i>ABCB4</i> .....	47
III-3-2-5. Autres thérapies.....	47
<b>-OBJECTIFS-</b> .....	<b>49</b>
<b>-RESULTATS-</b> .....	<b>50</b>
<b>Première partie : Identification de correcteurs pour les variants d'<i>ABCB4</i> de classe II .....</b>	<b>50</b>
Articles .....	52
Article I.....	52
Article II.....	52
<b>Deuxième partie : <i>RAB10</i>, un nouveau partenaire potentiel d'<i>ABCB4</i>.....</b>	<b>119</b>
1. Matériels et méthodes.....	119
1-1. Immunoprécipitation d' <i>ABCB4</i> et analyse par spectrométrie de masse .....	119
1-2. Plasmides et ARN interférants .....	120
1-3. Modèles cellulaires, transfection et anticorps.....	120
1-4. Immunoblot et immunofluorescence .....	120
1-5. Invalidation de <i>RAB10</i> par la technologie CRISPR/Cas9 .....	121
2. Résultats obtenus.....	122
2-1. Identification de <i>RAB10</i> comme partenaire d' <i>ABCB4</i> .....	122
2-2. Validation de l'interaction entre <i>RAB10</i> et <i>ABCB4</i> .....	123
2-3. Localisation de <i>RAB10</i> dans nos modèles cellulaires.....	123
2-4. Effet de la surexpression de <i>RAB10</i> sur l'expression d' <i>ABCB4</i> .....	124
2-5. Effet de la surexpression de <i>RAB10</i> et ses différentes formes sur la fonction d' <i>ABCB4</i> .....	125
2-6. Effet de l'extinction de <i>RAB10</i> sur la localisation d' <i>ABCB4</i> .....	126
2-7. Développement d'un modèle cellulaire <i>RAB10</i> KO par la technologie CRISPR/Cas9 .....	127
<b>-DISCUSSION-</b> .....	<b>128</b>
Première partie : Identification de correcteurs pour les variants retenus d' <i>ABCB4</i> .....	128
Deuxième partie : <i>RAB10</i> , un partenaire potentiel d' <i>ABCB4</i> .....	133
<b>-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES-</b> .....	<b>136</b>
<b>-RÉFÉRENCES-</b> .....	<b>138</b>

## **-REMERCIEMENTS-**

Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres de jury pour avoir accepté de juger mon travail. Merci au Pr Xavier Houard de me faire l'honneur d'être président de ce jury, aux rapporteurs Pr Pascale Fanen et Dr Marion Bouchecareilh et à leur temps consacré à l'analyse de ce manuscrit ainsi qu'aux Dr Etienne Morel et Dr Wilfried le Goff pour leur participation en tant qu'examineurs.

Ce travail a commencé dans le centre de recherche Saint-Antoine et s'est terminé à la faculté de sciences d'Orsay. Je souhaite donc remercier le Pr Chantal Housset et le Dr Thierry Tordjmann pour m'avoir accueillie dans leur structure de recherche.

Un grand merci à Thomas qui m'a accueilli et encadré dès mon arrivée lors de mon stage de M2 et tout au long de ma thèse. Merci pour ta direction, tes disponibilités, tes conseils et ton temps consacré pour ce projet et aussi de m'avoir donné l'opportunité de présenter mes travaux dans des congrès scientifiques internationaux. Merci Thomas !

Merci à tous les membres du groupe 'ABCB4', à Virginie qui m'a formée et m'a appris beaucoup de choses, à Alix et Anne-Marie pour leur soutien et motivation au quotidien et à Jean-Louis et Tounsia pour les petites astuces techniques et pour leurs conseils.

Je remercie également tous les membres du groupe 'Cholestases'. Merci à Emmanuel Jacquemin et Emmanuel Gonzales pour leur accueil dans le groupe et à Elodie et Martine pour leur soutien et leur aide au quotidien.

Merci à tous les membres de l'équipe « Maladies fibro-inflammatoires d'origine métabolique et biliaire du foie » et l'équipe « Homéostasie biliaire et réparation du foie » avec qui j'ai partagé de nombreux moments scientifiques et humains.

Je n'oublie pas tous nos collaborateurs, merci à Florent Di Meo et aux filles Angelica et Agota pour leur expertise et contribution structurale dans ce travail. Merci à François Guillonnet de la plateforme protéomique 3P5, pour les analyses de spectrométrie de masse. Merci aux chimistes Charles Skarbek et Wadih Ghattas pour leur aide avec la lecture des plaques. Merci à Lynda Aoudjehane pour les hépatocytes primaires, à Jérémie Gautheron pour son aide dans l'élaboration de la technologie CRISPR/Cas9, à Isabelle Garcin et Romain Morichon pour l'aide avec les études microscopiques et enfin merci à Mark McNiven et Ahmed Zahraoui pour les constructions encodant les protéines RAB.

J'espère que je n'ai pas oublié personne. Je suis reconnaissante à toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et à toute personne qui m'a soutenu tout au long de mon aventure parisienne. Merci à tous !

Et enfin, un énorme merci à mes parents et sœurs pour leur soutien, encouragement et motivation. Maman, Papa, mes sœurs : Imen, Ines, Ameni et Oumaima, merci infiniment pour le soutien et les longues conversations quotidiennes.

## **-LISTE DES ABRÉVIATIONS-**

**ABC** : ATP Binding Cassette  
**ABCB4** : ATP Binding Cassette sub-family B member 4  
**AMM** : Autorisation de Mise sur Marché  
**ARN** : Acide RiboNucléique  
**ATP** : Adenosine TriPhosphate  
**Cas9** : CRISPR associated protein 9  
**CFTR** : Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator  
**CRISPR** : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats  
**CsA** : Cyclosporin A  
**FXR** : Farnesoid X Receptor  
**GDP** : Guanosine DiPhosphate  
**GFP** : Green Fluorescent Protein  
**GTP** : Guanosine TriPhosphate  
**HEK** : Human Embryonic kidney cells  
**HeLa** : Henrietta Lacks cells  
**HepG2** : Human hepatocellular carcinoma cells  
**ICP** : Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy  
**kDa** : kiloDaltons  
**KO** : Knock-Out  
**LPAC** : Low Phospholipid-Associated Cholelithiasis  
**MDR** : MultiDrug Resistance  
**MRP** : Multidrug Resistance-associated Protein  
**NBD** : Nucleotide Binding Domain  
**PC** : PhosphatidylCholine  
**PFIC** : Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis  
**PPAR $\alpha$**  : Peroxysome Proliferator Activated Receptor alpha  
**RAB** : Ras-related in Brain  
**RE** : Réticulum Endoplasmique  
**TMD** : TransMembrane Domain  
**UDCA** : UrsoDeoxyCholic Acid  
**WT** : Wild Type

## **-RESUME-**

ABCB4 (ATP Binding Cassette sub-family B member 4), nommé aussi MDR3 (MultiDrug Resistance 3) est l'un des principaux transporteurs biliaires. Ce transporteur ABC est exprimé à la membrane canaliculaire des hépatocytes où il assure la sécrétion de phosphatidylcholine dans la bile. Des variations génétiques d'*ABCB4* sont associées à plusieurs pathologies biliaires rares dont la plus sévère est la PFIC3 (Cholestase Intrahépatique Familiale Progressive de type 3). Les traitements actuellement proposés pour les patients atteints de PFIC3 sont peu efficaces et la transplantation hépatique reste souvent la seule option. Il est donc nécessaire de développer des thérapies pharmacologiques alternatives.

A ce jour, plus de 200 variations génétiques d'*ABCB4* ont été identifiées. Certaines de ces variations affectent le trafic d'*ABCB4*, le transporteur reste retenu dans le réticulum endoplasmique et est alors incapable de rejoindre la membrane plasmique. Le but de ma première partie de thèse a été d'identifier de nouveaux moyens pharmacologiques permettant de restaurer le trafic intracellulaire et la relocalisation membranaire de ces variants. Dans une optique de repositionnement pharmacologique, nous avons évalué l'effet de plusieurs correcteurs candidats, connus comme des correcteurs de CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), sur les variants d'*ABCB4*. Nous avons pu montrer que plusieurs de ces correcteurs, notamment les analogues de roscovitine, les composés C10, C13, C17 ainsi que les combinaisons de correcteurs C3+C18 et C4+C18 permettent de restaurer l'expression membranaire de quatre variants déficients d'*ABCB4* retenus dans le réticulum endoplasmique.

Le deuxième axe de ma thèse visait à comprendre les mécanismes moléculaires régulant l'expression, le trafic et l'activité d'*ABCB4*. Pour cela, l'identification de partenaires moléculaires d'*ABCB4* a été entreprise par une approche protéomique. Nous avons identifié la petite protéine RAB10 comme partenaire moléculaire potentiel d'*ABCB4*. Nos résultats préliminaires indiquent que RAB10 serait impliquée dans la régulation de l'adressage d'*ABCB4* à la membrane plasmique, modulant ainsi indirectement sa fonction de sécrétion de phosphatidylcholine.

L'ensemble de mes travaux de thèse permettent d'apporter une meilleure connaissance de la biologie cellulaire et du fonctionnement d'*ABCB4* ainsi que l'identification et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre de pathologies rares et sévères liées à des déficits de ce transporteur.

**Mots clés :** ABCB4 ; MDR3 ; Sécrétion biliaire ; Pharmacothérapie ciblée ; Partenaires moléculaires ; Trafic intracellulaire.



## **-ABSTRACT-**

ABCB4 (ATP Binding Cassette sub-family B member 4), also named MDR3 (MultiDrug Resistance 3) is an ABC transporter expressed at the canalicular membrane of hepatocytes where it ensures the secretion of phosphatidylcholine into bile. Genetic variations of *ABCB4* are associated with several rare biliary diseases, the most severe being PFIC3 (Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type 3). Available treatments are not efficient for the majority of PFIC3 patients who then most often require liver transplantation. It is thus essential to develop alternative pharmacological therapies for these patients.

To date, more than 200 variations of *ABCB4* gene have been identified. Some of these variations affect ABCB4 intracellular traffic, thus the transporter remains retained in the endoplasmic reticulum and cannot reach the plasma membrane. The aim of the first part of my thesis was to restore the intracellular traffic and the plasma membrane targeting of these defective variants. So we tried to repurpose molecules known as CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) correctors for ABCB4 variants. Our results show that some of these correctors, such as structural analogues of roscovitine or compounds from the Cystic Fibrosis Foundation chemical library (used alone or in combination), can rescue the traffic and the plasma membrane targeting of four intracellularly ABCB4 variants.

The second part of my thesis was dedicated to the understanding of the molecular mechanisms that regulate the expression, the traffic and the activity of ABCB4. By a proteomic approach, we have identified the small GTPase RAB10 as a potential molecular partner of ABCB4. Our preliminary results indicate that RAB10 would be involved in the plasma membrane targeting of ABCB4, and thus may indirectly regulate its phosphatidylcholine secretion activity.

Altogether, this study will provide a better knowledge of the cell biology and the function of ABCB4 and will help the development of new pharmacotherapeutic strategies in the frame of rare and severe pathologies related with defects of this ABC transporter.

**Key words:** ABCB4; MDR3; Biliary secretion; Target pharmacotherapy; Molecular partners; Intracellular traffic.

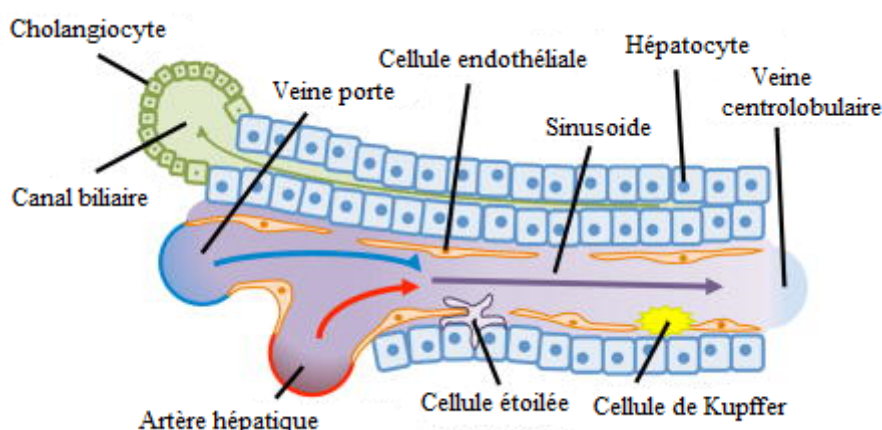
# -INTRODUCTION-

Cette première partie de manuscrit situe mes travaux de recherche dans leur contexte. Elle se subdivise en trois chapitres qui décrivent la physiologie biliaire, la biologie d'ABCB4 et enfin les pathologies associées à des déficits moléculaires de ce transporteur ainsi que les thérapies proposées dans le cadre de ces maladies.

## Chapitre I : La sécrétion biliaire : une fonction essentielle du foie

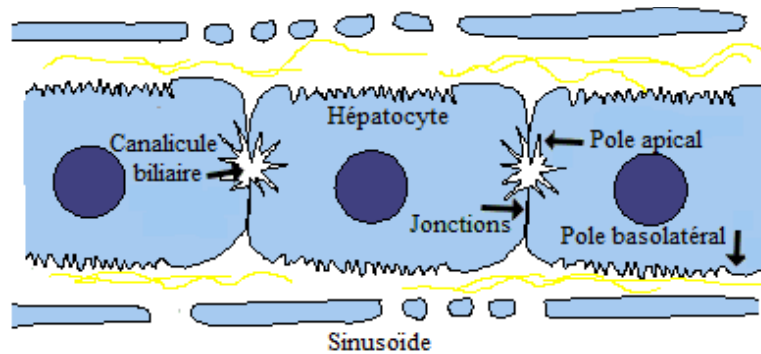
### I-1. Le foie et les voies biliaires

Le foie est l'un des principaux organes de l'organisme. Il fait partie du système digestif et assure plusieurs fonctions vitales : synthèse de protéines, métabolisme de glucides et lipides, dégradation et excrétion de xénobiotiques et la sécrétion de la bile. Il est constitué de plusieurs types cellulaires : hépatocytes, cholangiocytes, cellules étoilées, cellules de Kupffer et des cellules endothéliales. Ces différents types cellulaires sont organisés de façon typique sur une matrice fortement vascularisée par des capillaires sanguins spécifiques (les sinusoides hépatiques). Parallèlement aux vaisseaux sanguins, le foie est parcouru par un réseau de voies biliaires permettant la production et l'écoulement de la bile (Figure 1) (Trefts, Gannon, and Wasserman 2017).



**Figure 1 : Organisation des cellules hépatiques.** Les hépatocytes sont disposés en monocouches cellulaires sur les sinusoides hépatiques. Les sinusoides, tapissés par des cellules endothéliales, sont alimentés par le sang de l'artère hépatique et la veine porte. Les hépatocytes participent également à la formation d'un réseau biliaire. Les cholangiocytes tapissent les conduits biliaires et jouent un rôle important dans la modification de la bile. Les cellules étoilées stockent la vitamine A et elles sont impliquées dans le processus de fibrose hépatique. Les cellules de Kupffer sont des macrophages résidents du foie. D'après (Trefts, Gannon, and Wasserman 2017).

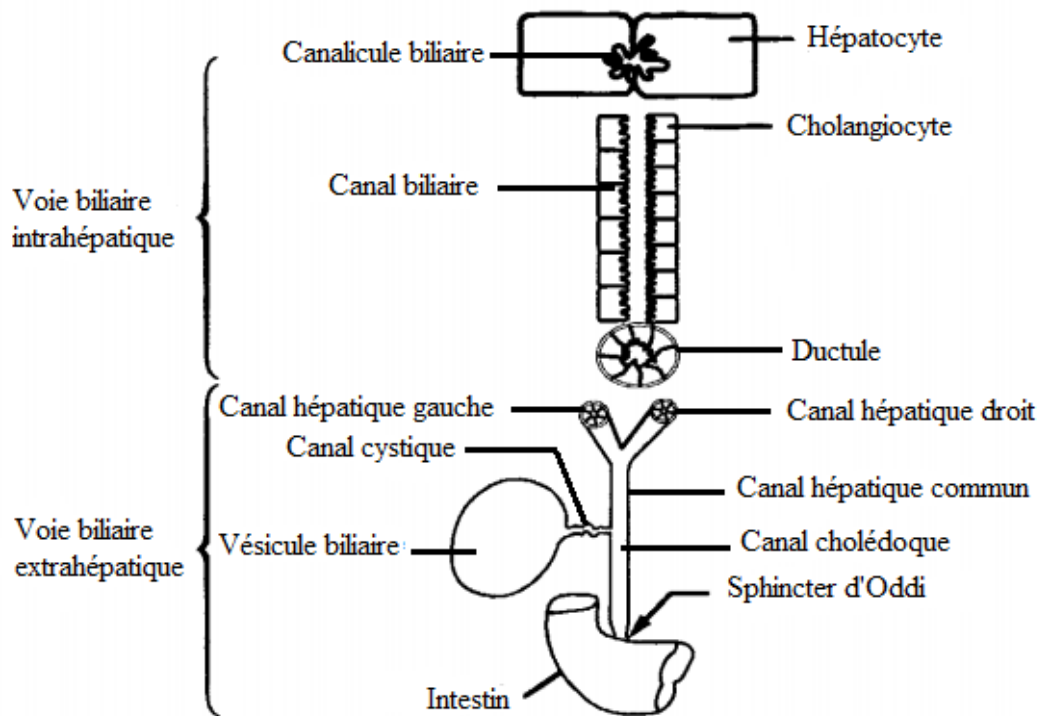
Les hépatocytes sont les principales cellules du foie, elles constituent 85% du volume hépatique. Ce sont des cellules épithéliales polarisées formées d'un pôle basolatéral (sinusoïdal) et d'un pôle apical (canaliculaire) (Figure 2). Les membranes basolatérales occupent 37% de la surface hépatocytaire. Elles sont en contact avec les sinusoides hépatiques et permettent les échanges bidirectionnels avec le sang. Les membranes apicales des hépatocytes adjacents forment des canalicules biliaires. Les canalicules biliaires sont des structures intercellulaires closes de petite taille (avec un diamètre d'environ 1  $\mu\text{m}$ ), délimités par des jonctions serrées spécifiques (constituées notamment des claudines, des zonula-occludens ZO-1, ZO-2). Ces canalicules sont le lieu de la sécrétion de la bile (Boyer 2013).



**Figure 2 : Hépatocytes et canalicule biliaire.** Les hépatocytes sont des cellules polarisées : le pôle basolatéral (sinusoïdal) est en contact avec le sang et le pôle apical (canaliculaire) forme les canalicules biliaires. Les jonctions serrées jouent un rôle important dans la formation des canalicules biliaires. Source : The Histology Guide/University of Leeds, modifié.

Le canalicule biliaire constitue la plus petite branche de l'arbre biliaire qui converge en un réseau plus complexe. Ce réseau est constitué de plusieurs canaux biliaires qui véhiculent la bile des hépatocytes jusqu'à l'intestin (duodénum). On distingue des voies biliaires intrahépatiques et des voies extrahépatiques (Figure 3). Les canalicules biliaires, les ductules et les canaux hépatiques droit et gauche constituent les voies biliaires intrahépatiques. Ces canaux émergent ensuite du foie pour former les voies biliaires extrahépatiques, ils se réunissent en un canal hépatique commun qui rejoint le canal cystique menant à la vésicule biliaire et le canal cholédoque relié à l'intestin par le sphincter d'Oddi (Hundt, Basit, and John 2020). Les canaux biliaires sont bordés par des cellules épithéliales, les cholangiocytes. Ces derniers participent également à la modification de la composition de la bile (Esteller 2008). Le canal cystique et la vésicule biliaire constituent les voies biliaires accessoires, ils ne sont pas indispensables pour l'écoulement de la bile (en cas d'ablation, la bile continue de s'écouler directement dans le canal cholédoque puis dans l'intestin). Les

principales fonctions de la vésicule biliaire sont de stocker, de concentrer et de la libérer la bile en phase post-prandiale (Housset et al. 2016).



**Figure 3 : Arbre biliaire.** L'arbre biliaire se divise en voie biliaire intra- et extra-hépatiques, il est constitué d'un réseau de canaux biliaires qui véhiculent la bile des hépatocytes jusqu'à l'intestin. D'après (LaRusso 1996).

## I-2. Rôles physiologiques de la bile

La sécrétion biliaire est une fonction essentielle du foie, elle assure deux rôles majeurs dans l'organisme : la digestion des lipides et l'élimination de divers métabolites toxiques.

Dans la lumière intestinale, la bile facilite l'absorption intestinale des graisses alimentaires et des vitamines liposolubles (vitamines A, D, E, K). Elle agit comme un détergent qui permet l'émulsion des lipides. Les lipides émulsionnés sont ensuite lysés et digérés par les lipases pancréatiques et intestinales en gouttelettes absorbables par l'intestin (Maldonado-Valderrama et al. 2011).

La bile assure également une fonction de détoxification. Par l'intermédiaire de la sécrétion biliaire, le foie élimine une grande variété de métabolites endogènes et exogènes, potentiellement toxiques pour l'organisme. Les principaux métabolites excrétés à travers la bile sont la bilirubine (produit de dégradation de l'hémoglobine), l'excès de cholestérol, les ions inorganiques (fer, cuivre) ainsi que plusieurs médicaments et xénobiotiques (Coleman 1987). Ces déchets métaboliques sont éliminés par la suite dans les fèces.

### **I-3. Formation de la bile**

La bile est initialement élaborée dans les canalicules biliaires par les hépatocytes puis modifiée tout au long des canaux biliaires par les cholangiocytes et enfin stockée et concentrée par la vésicule biliaire avant d'être libérée dans l'intestin.

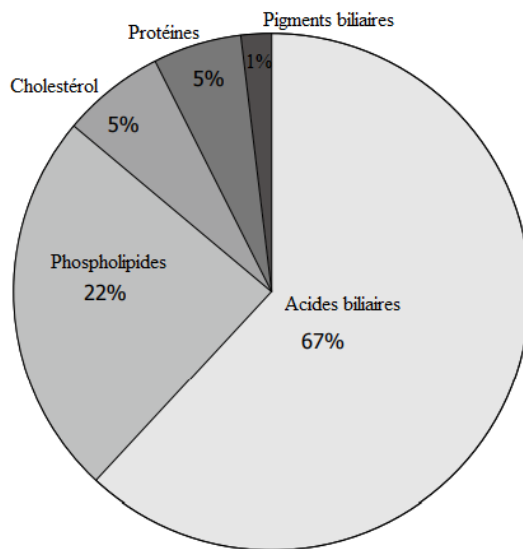
La bile hépatocytaire (nommée aussi canaliculaire) représente 75% du flux biliaire total, elle est formée par un mécanisme osmotique qui résulte d'une sécrétion active (par des transporteurs ATP-dépendants) des acides biliaires et d'autres composés (bilirubine et glutathion, qui forment une fraction biliaire dite indépendante des acides biliaires) dans les canalicules biliaires. Cette sécrétion crée un gradient osmotique et entraîne une entrée massive d'eau dans la lumière canaliculaire à travers les aquaporines et les jonctions serrées (Paumgartner et al. 1975). Une fraction hydrique importante s'ajoute aux autres constituants biliaires et un courant biliaire primaire est généré.

En progressant dans les canaux biliaires, la bile primaire est modifiée par les cholangiocytes. Ces cellules jouent un rôle important dans la dilution et l'alcalinisation de la bile, elles sécrètent principalement de l'eau, des ions chlore et bicarbonate et réabsorbent le glucose, une partie des acides biliaires et des acides aminés. Ces processus de sécrétion et réabsorption sont régulés par plusieurs stimuli (hormonal, nerveux). Un exemple de régulation hormonale bien illustré est celui de la sécrétine, une hormone digestive qui régule l'expression membranaire de plusieurs transporteurs cholangiocytaires. La nouvelle fraction de bile formée est alors dite bile ductulaire (Tabibian et al. 2013).

Enfin, une partie importante de la bile (soit 75% de la bile formée, le reste est sécrété directement dans l'intestin) est stockée dans la vésicule biliaire où elle subit ses dernières modifications. Les cellules épithéliales de la vésicule sécrètent des ions bicarbonate et des mucines (des glycoprotéines qui jouent un rôle majeur dans la protection de l'épithélium) et réabsorbent l'eau (jusqu'à 90% de l'eau biliaire est absorbée) (Housset et al. 2016). Il en résulte la production d'une bile vésiculaire plus visqueuse et plus concentrée en acides biliaires. La libération de la bile vésiculaire dans l'intestin est dépendante de la prise alimentaire. En effet, la prise alimentaire stimule la sécrétion de plusieurs hormones intestinales (comme la cholecystokinine et le FGF15/19 (Fibroblast Growth Factor) qui entraînent la contraction de la vésicule biliaire, le relâchement du sphincter d'Oddi (Figure 3) et donc l'écoulement de la bile dans l'intestin. Chez l'Homme, la sécrétion moyenne de bile dans l'intestin est environ 620 mL par jour (Esteller 2008).

## I-4. Composition de la bile

La bile est une sécrétion complexe, constituée principalement d'eau (environ 85% de sa composition), d'électrolytes (sodium, potassium, calcium, chlore...) et de composés organiques. Les principaux composés organiques retrouvés dans la bile sont les acides biliaires, les phospholipides (sous forme de phosphatidylcholine), le cholestérol, des protéines et des pigments biliaires (la bilirubine) (Figure 4). D'autres composés minoritaires comme des vitamines, des xénobiotiques, des métaux et des hormones sont également détectés dans la bile (Boyer 2013).



**Figure 4 : Principaux composés organiques présents dans la bile.** Les acides biliaires sont les constituants organiques majeurs (67%), les phospholipides représentent 22% et le cholestérol 5%. Plusieurs protéines sont également détectées dans la bile comme l'albumine, des anticorps et quelques enzymes. Les pigments biliaires constituent environ 1%. D'après (Esteller 2008).

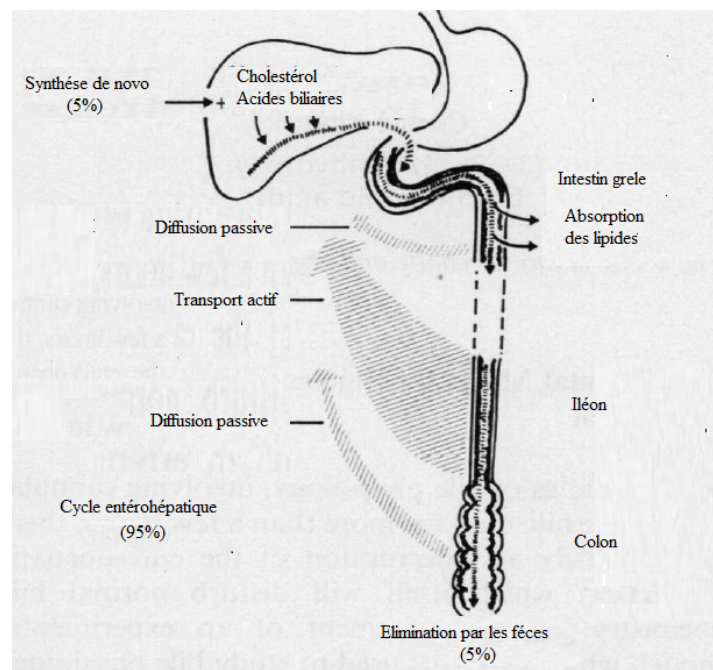
### I-4-1. Les acides biliaires

Les acides biliaires sont les constituants les plus abondants dans la bile, ils représentent 67% des constituants organiques (Figure 4). Leur concentration biliaire varie entre 2 et 45 mM (Esteller 2008). Ils jouent un rôle primordial dans la digestion des lipides grâce à leur caractère détergent. Les acides biliaires sécrétés dans la bile proviennent de leur synthèse *de novo* à partir du cholestérol (5%) et de leur recyclage *via* le cycle entérohépatique (95%).

Les acides biliaires sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol (chez l'homme, environ 500 mg de cholestérol sont transformés en acides biliaires par jour) (Russell 2003). La conversion du cholestérol en acides biliaires est assurée par une cascade de réactions enzymatiques (initiée par deux enzymes clés CYP7A1 et CYP27A1) qui aboutit à la formation de deux acides biliaires primaires : l'acide cholique et l'acide

chénodésoxycholique. Ces deux acides biliaires sont ensuite conjugués à la glycine ou à la taurine pour faciliter leur solubilisation dans la bile (Russell 2009).

Après avoir participé à l'absorption intestinale des graisses alimentaires, une partie importante des acides biliaires est recyclée par la circulation entérohépatique (Dowling 1973). En effet, 90% des acides biliaires primaires sont réabsorbés dans l'intestin au niveau de l'iléon par un mécanisme de transport actif, transportés jusqu'au foie et sécrétés à nouveau dans la bile. Les 10% restant des acides biliaires arrivent au colon, ils sont déconjugués par les bactéries intestinales en deux acides biliaires secondaires (l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique). Une petite fraction des acides biliaires secondaires est réabsorbée par le colon, ensuite reconjuguée par le foie en acide biliaire tertiaire et l'autre partie est éliminée par les fèces. La fraction éliminée constitue 5% des acides biliaires totaux et elle est compensée par la synthèse *de novo* dans le foie (Fickert and Wagner 2017) (Figure 5).



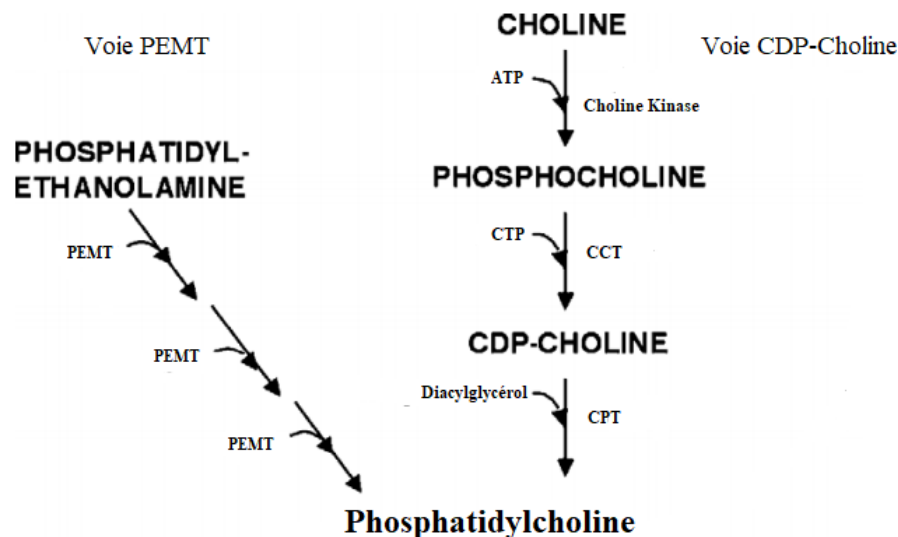
**Figure 5 : Cycle des acides biliaires dans l'organisme.** Les acides biliaires sont sécrétés dans le foie à partir du cholestérol. 95% de ces acides biliaires sont recyclés dans la bile *via* le cycle entérohépatique et seulement 5% sont éliminés dans les fèces. D'après (Dowling 1973).

Le pool des acides biliaires est maintenu constant dans l'organisme grâce au recyclage entérohépatique et la régulation de la biosynthèse *de novo* des acides biliaires. La néosynthèse des acides biliaires est un processus finement régulé par le cholestérol et les acides biliaires présents dans le foie. Ces derniers modulent l'expression de certaines enzymes limitantes comme CYP7A1 et CYP27A1 par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires FXR (Farnesoid X Receptor) et LXR (Liver X Receptor) (Russell 2003).

## I-4-2. Les phospholipides

La bile est très riche en lipides, elle contient environ 140 à 810 mg/100 mL de phospholipides (Esteller 2008). Le principal phospholipide présent dans la bile est la phosphatidylcholine (PC), un constituant majeur de la membrane cellulaire et des lipoprotéines. Dans la bile, la PC joue un rôle important dans la solubilisation du cholestérol et la neutralisation des acides biliaires.

Elle peut être apportée par l'alimentation mais la majeure partie de la PC biliaire est synthétisée *de novo* dans le foie. Deux principales voies de synthèse de PC ont été décrites, une voie CDP-choline (Cytidine-diphosphate-choline), ubiquitaire et responsable de la production de 70% de PC, et une deuxième voie dite PEMT (Phosphatidylmonométhylethanolamine N-méthyltransferase) (Figure 6) (Cole, Vance, and Vance 2012).



**Figure 6 : Synthèse de la phosphatidylcholine.** Il existe deux voies de synthèse de PC ; une voie dite CDP-choline qui convertit la choline en PC et la deuxième voie nommée PEMT qui synthétise la PC à partir de la phosphatidyléthanolamine par une cascade de méthylations. Plusieurs enzymes sont impliquées dans ce processus de biosynthèse ; la choline kinase, CCT (CTP-phosphocholine cytidyltransferase), CPT (sn-1,2diacylglycerol : CDP-choline phosphotransférase) et la PEMT. D'après (Kent 2005).

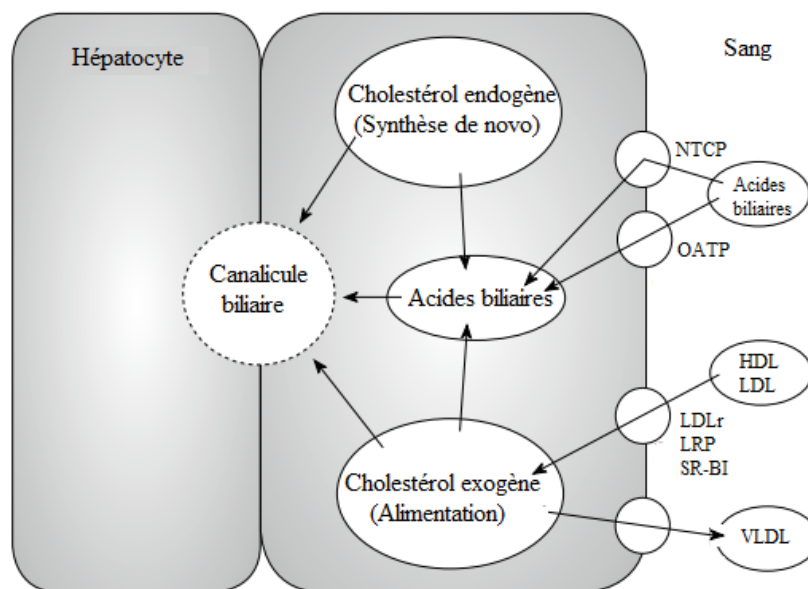
La voie PEMT est une voie spécifique aux hépatocytes, elle est absente dans les autres types cellulaires. L'importance de cette voie a été démontrée par des études réalisées sur des souris *Pemt*<sup>-/-</sup>, invalidées pour l'enzyme *Pemt* (Walkey et al. 1998). En coordination avec la voie CDP-choline, la voie PEMT assure la production de PC nécessaire au fonctionnement du foie (Agellon et al. 1999).



### I-4-3. Le cholestérol

Le cholestérol est un lipide essentiel dans l'organisme. Il joue un rôle clé dans le maintien des membranes cellulaires et la synthèse de différents composés (hormones stéroïdiennes, vitamines, et acides biliaires). Il a deux origines : endogène, il est synthétisé à partir de l'acétyl coenzyme A dans plusieurs organes (principalement le foie et l'intestin), et exogène provenant de l'alimentation et transporté dans la circulation grâce à des lipoprotéines (Zanlungo and Rigotti 2009).

Le foie joue un rôle déterminant dans l'homéostasie du cholestérol. Il le synthétise *de novo*, et aussi capte la fraction exogène sous forme de HDL (High Density Lipoprotein) et de LDL (Low Density Lipoprotein) par l'intermédiaire des récepteurs membranaires aux lipoprotéines telles que le LDLR (Low-Density Lipoprotein Receptor), le LRP (LDLR-Related Protein) et le SR-BI (Scavenger Receptor class B type I). Le foie élimine également le cholestérol. Il le sécrète d'une part dans la circulation sous forme des VLDL (Very Low Density Lipoproteins) pour être redistribué aux tissus périphériques et d'autre part dans la bile. L'excrétion du cholestérol dans la bile et sa conversion en acides biliaires constituent les voies majeures d'élimination de l'excès du cholestérol de l'organisme (Figure 7) (Dikkers and Tietge 2010).



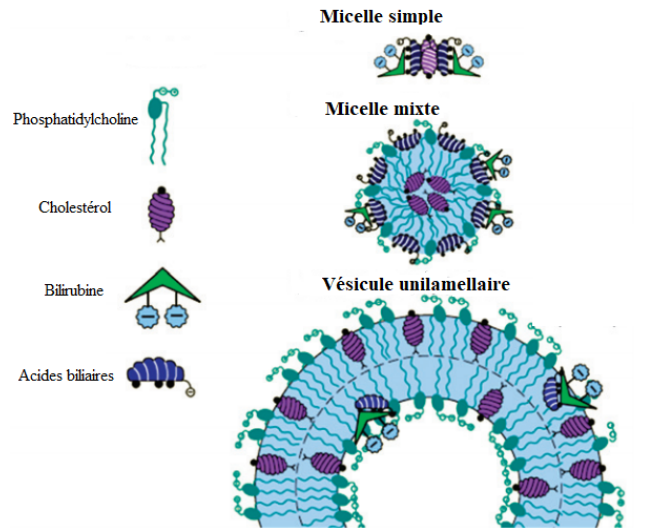
**Figure 7 : Homéostasie du cholestérol dans le foie.** Le cholestérol sécrété dans la bile provient de sa synthèse *de novo* et de l'alimentation. Le foie exprime plusieurs récepteurs aux lipoprotéines LDLR (Low – density lipoprotein receptor), LRP (LDLR-related protein) et le SR-BI (Scavenger receptor class B type 1) qui captent le cholestérol circulant sous forme de HDL et LDL. L'excès de cholestérol dans le foie est éliminé dans la bile, sous forme d'acides biliaires ou sous forme de VLDL. D'après (Dikkers and Tietge 2010).

#### **I-4-4. Autres composants de la bile**

De nombreuses protéines et pigments biliaires ont également été retrouvés dans la bile. Les protéines représentent 5% des constituants organiques biliaires et comprennent des IgA circulants, l'albumine, l'hémoglobine et le FGF19. Ces protéines sont sécrétées dans la bile par exocytose au niveau de la membrane canaliculaire ou par diffusion passive à travers les jonctions serrées (Boyer 2013). Le rôle des protéines sécrétées dans la bile n'est pour le moment pas caractérisé. Le principal pigment biliaire sécrété dans la bile est la bilirubine, un pigment toxique qui provient de la dégradation de l'hémoglobine. C'est un pigment jaune à l'origine de la coloration jaune verdâtre de la bile. La bilirubine circule dans le sang sous forme non conjuguée associée à l'albumine et rejoint les hépatocytes par le pôle sinusoidal. Une fois dans les hépatocytes, la bilirubine est conjuguée à l'acide glucuronique puis activement sécrétée dans la bile (Hamoud et al. 2018). A travers la bile, le foie se débarrasse de ce pigment dans les fèces. L'accumulation de la bilirubine dans l'organisme peut être associée à une atteinte hépatique.

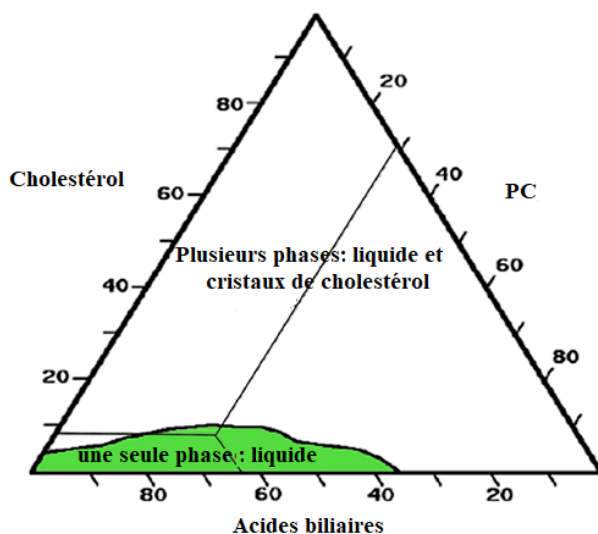
#### **I-5. La bile : un équilibre entre acides biliaires, cholestérol et phospholipides**

La bile est une solution aqueuse riche en acides biliaires, en PC et en cholestérol. Le cholestérol est un lipide insoluble dans l'eau. Pour être maintenu en solution, il s'associe en micelles et en vésicules unilamellaires avec les acides biliaires et la PC (Figure 8). Les acides biliaires sont des composés amphiphiles, solubles en solution. Au-delà de leur « concentration micellaire critique » (seuil de concentration à partir de laquelle ils s'associent à des micelles), les acides biliaires s'assemblent avec le cholestérol et la bilirubine pour former des agrégats de petite taille appelés micelles simples (Figure 8). L'addition de PC aux micelles simples aboutit à la formation de structures de taille plus importante, les micelles mixtes et les vésicules unilamellaires qui permettent d'intégrer et de solubiliser une grande fraction du cholestérol biliaire. Dans les micelles mixtes, la PC s'intercale entre les acides biliaires et le cholestérol s'accumule dans la partie centrale hydrophobe. Les vésicules unilamellaires sont plus larges, composées principalement de PC, de cholestérol et très peu d'acides biliaires (Di Ciaula et al. 2013). Ces structures jouent un rôle clé dans la solubilisation du cholestérol dans la bile ainsi que la protection des cellules bordant l'arbre biliaire de l'action détergente des acides biliaires libres.



**Figure 8 : Les différentes micelles et vésicules présentes dans la bile.** Pour être maintenus en solution, les principaux constituants biliaires forment plusieurs structures, des micelles simples, des micelles mixtes et des vésicules unilamellaires. D'après (Wang, Cohen, and Carey 2009).

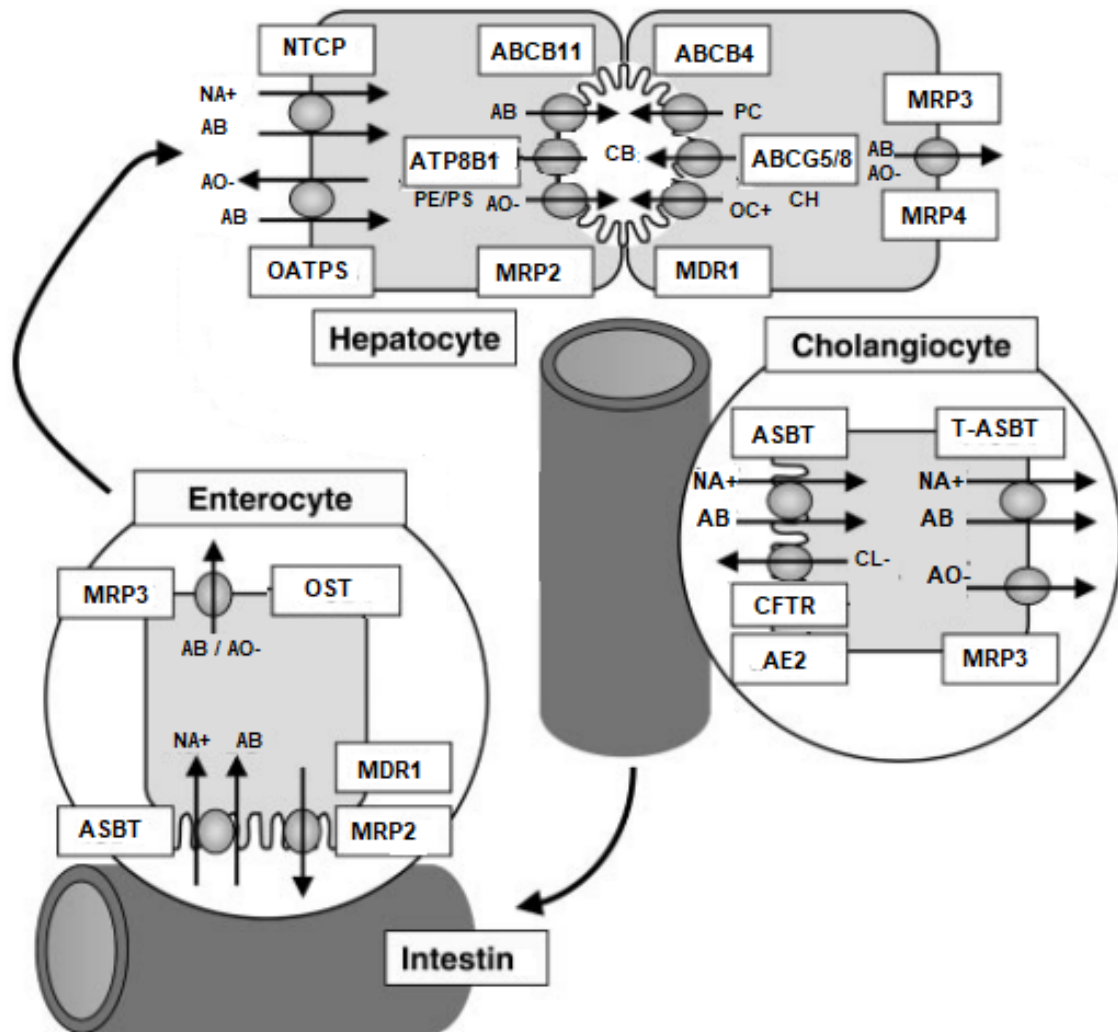
La formation de micelles mixtes et de vésicules unilamellaires dépend des proportions respectives de PC, de cholestérol et d'acides biliaires présents dans la bile. Ces proportions ont été décrites par Admirand et Small dans les années 1960. En étudiant l'aspect de la bile chez des patients atteints de pathologies biliaires et des sujets sains, ils ont défini les proportions limitantes pour la solubilisation du cholestérol. Selon leur modèle (Figure 9), la formation d'une bile liquide homogène avec une solubilisation maximale du cholestérol nécessite 70% des acides biliaires, 25% de PC et 5% du cholestérol (zone verte sur le diagramme). Au-delà de ces proportions, une bile déséquilibrée, riche en cristaux et calculs cholestéroliques est générée (Admirand and Small 1968).



**Figure 9 : Diagramme ternaire d'Admirand et Small.** Ce diagramme décrit les différents aspects de la bile en fonction des proportions de cholestérol, de PC et d'acides biliaires. D'après (Di Ciaula et al. 2013).

## I-6. Les principaux transporteurs impliqués dans la sécrétion biliaire

Les principaux transporteurs impliqués dans la formation et la sécrétion de la bile sont aujourd'hui bien caractérisés. Ces transporteurs assurent le transfert de différents constituants biliaires à travers les membranes cellulaires. Ils sont principalement exprimés au niveau des hépatocytes, des cholangiocytes et des entérocytes (Boyer 2013) (Figure 10).



**Figure 10 : Les principaux transporteurs biliaires.** Les acides biliaires (AB) sont captés au pôle basal des hépatocytes par les transporteurs NTCP (Na<sup>+</sup> Taurocholate Co-transporting Polypeptide) et OATP (Organic Anion Transporter polypeptides). Au pôle canaliculaire, ils sont sécrétés dans la bile par l'intermédiaire d'ABCB11. ABCB4 sécrète la phosphatidylcholine (PC) et l'hétérodimère ABCG5/8 transporte le cholestérol (CH). Le transporteur MRP2 (Multidrug Resistance associated Protein 2) assure la sécrétion des anions organiques (AO<sup>-</sup>) comme la bilirubine et MDR1 (MultiDrug Resistance 1) exporte les cations organiques (OC<sup>+</sup>). Les hépatocytes expriment aussi ATP8B1, une flippase de phosphatidylsérine (PS) et de phosphatidyléthanolamine (PE). MRP3 et MRP4 sont exprimés au niveau basolatéral, ils constituent une autre voie d'élimination des composés toxiques dans la circulation. Les cholangiocytes participent à la modification de la bile. Ils expriment au niveau apical, le canal CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), le transporteur AE2 (Anion Exchanger isoform 2) et la protéine ASBT (Apical Sodium-dependent Bile salt Transporter) qui absorbe une partie des AB. Ces AB ressortent au pôle basal par MRP3 et T-ASBT. Dans la lumière intestinale, 95% des AB sont absorbés par le transporteur ASBT puis rejoignent le sang *via* MRP3 et OST $\alpha/\beta$  (Organic Solute Transporter). CB, canalicule biliaire. D'après (Trauner and Boyer 2003).

### **I-6-1. Les transporteurs hépatocytaires**

Les hépatocytes sont dotés d'un réseau de transporteurs qui facilitent le transport de différents composés biliaires. Ces transporteurs sont situés à la fois au niveau des membranes basolatérales et des membranes canaliculaires (Jetter and Kullak-Ublick 2020) (Figure 10).

Au pôle sinusoidal, les hépatocytes expriment principalement des systèmes d'import qui assurent le transport de plusieurs composés du sang portal vers le cytoplasme hépatocytaire. Parmi ces systèmes, on retrouve le transporteur NTCP (Na<sup>+</sup> Taurocholate Co-transporting Polypeptide) et la famille des OATPs (Organic Anion Transporting Polypeptides). NTCP est le principal transporteur des acides biliaires. C'est un transporteur dépendant du sodium, qui utilise l'énergie produite par le gradient de Na<sup>+</sup> pour capter les acides biliaires provenant de la circulation entérohépatique (Lu et al. 2019). Les OATPs, quant à eux, transportent une grande variété des composés, notamment la bilirubine non conjuguée, les acides biliaires non conjugués et plusieurs xénobiotiques (Wolkoff 2014). D'autres transporteurs impliqués dans l'export sont détectés à la membrane sinusoidale des hépatocytes tels que MRP3 et MRP4. Ils appartiennent à la famille MRP (Multidrug Resistance Associated Proteins) et permettent l'élimination de plusieurs composés dans la circulation. Ils jouent un rôle important dans la protection des hépatocytes face à l'accumulation de certains composés toxiques.

Une fois dans le cytoplasme des hépatocytes, les différents constituants biliaires subissent plusieurs modifications (conjugaison, modifications chimiques), puis ils sont transportés jusqu'au pôle canaliculaire par diffusion passive, par l'intermédiaire de protéines cytosoliques ou par des vésicules golgiennes (Boyer 2013).

Au niveau apical, les hépatocytes disposent d'autres transporteurs qui assurent l'export des acides biliaires ainsi que les autres composés vers la lumière des canalicules biliaires. Ces transporteurs appartiennent notamment à la famille ABC (ATP Binding Cassette), ils utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter activement leurs substrats. Les principaux transporteurs ABC canaliculaires sont ABCB11 (nommé aussi BSEP, Bile Salt Export Pump) principal transporteur des acides biliaires (Stieger, Meier, and Meier 2007), ABCB4 (ou MDR3, MultiDrug Resistance 3) qui assure l'excrétion de la PC (Falguières et al. 2014), l'hétérodimère ABCG5/G8 responsable du transport de cholestérol (Zein et al. 2019) et les transporteurs MRP2 (ABCC2) et MDR1 (ABCB1) qui jouent un rôle important de détoxification, ils secrètent respectivement des anions organiques (en particulier la bilirubine) et des cations organiques (médicaments, xénobiotiques...) (Mottino and Catania 2008). Les

hépatocytes expriment également à leur membrane canaliculaire la flippase ATP8B1. De type P-ATPase, elle transloque les phospholipides (phosphatidylsérine (PS) et phosphatidyléthanolamine (PE)) du feuillet externe vers le feuillet interne des membranes canaliculaires. Elle joue un rôle dans le maintien de l'intégrité membranaire (Groen et al. 2011).

### **I-6-2. Les transporteurs cholangiocytaires**

Les cholangiocytes sont également impliqués dans la genèse de la bile, ils expriment à leur surface plusieurs transporteurs. Parmi ces transporteurs, on retrouve le canal chlorure CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, ou ABCC7) et l'échangeur chlore-bicarbonate AE2 (SLC4A2). Tous deux sont situés à la membrane apicale et ont pour fonction d'assurer l'alcalinisation et la dilution de la bile (Boyer 2013). Outre ces transporteurs, les cholangiocytes expriment des transporteurs des acides biliaries et des anions organiques comme le transporteur apical ASBT (Apical Sodium dependant Bile salt Transporter) qui permet la réabsorption d'une fraction des acides biliaries et les protéines basolatérales MRP3 et t-ASBT (truncated-Apical Sodium dependant Bile salt Transporter) qui assurent l'excrétion de leurs substrats dans la circulation sanguine (Xia et al. 2006).

### **I-6-3. Les transporteurs entérocytaires**

Environ 95% des acides biliaries sécrétés dans la bile font l'objet d'un cycle entérohépatique, ils sont réabsorbés au niveau de l'intestin puis retournés aux hépatocytes. La réabsorption intestinale des acides biliaries est assurée principalement par le transporteur ASBT (appelé également ISBT, Ileal Sodium dependant Bile salt Transporter) exprimé au niveau des membranes apicales des entérocytes iléaux. Le retour à la circulation sanguine des acides biliaries absorbés est médié par MRP3 et l'hétérodimère OST $\alpha/\beta$  (Organic Solute Transporter), localisés au niveau du pôle basolatéral des entérocytes (Dawson and Karpen 2015).

### **I-6-4. Autres transporteurs**

D'autres transporteurs comme les aquaporines, les pompes ATPases Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> et les échangeurs sodium-proton (NHE) sont présents sur les membranes des hépatocytes, des cholangiocytes et la vésicule biliaire, ils jouent un rôle crucial dans la régulation des mouvements d'eau et dans le maintien d'un équilibre ionique dans la bile (Erlinger 1982 ; Marinelli et al. 2011).

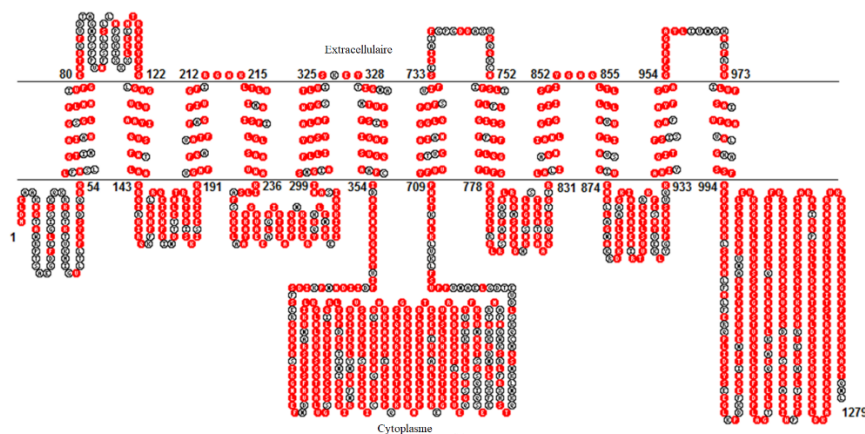
## Chapitre II : Le transporteur ABCB4 : un acteur majeur de la sécrétion biliaire

ABCB4 (ATP Binding Cassette sub-family B member 4), nommé aussi MDR3 (MultiDrug Resistance 3) est l'un des principaux transporteurs biliaires. Il est exprimé à la membrane canaliculaire des hépatocytes où il assure la sécrétion de PC dans la bile.

### II-1. Expression et fonction d'ABCB4

#### II-1-1. Découverte du gène

Le gène *ABCB4* ou *MDR3* (nommé encore *Mdr2* chez la souris) a été découvert en 1987 (Van der Bliek et al. 1987) puis cloné et séquencé en 1988 par le groupe de Brost (van der Bliek et al. 1988). Il a été identifié grâce à l'étude de son homologue *MDR1/ABCB1*, qui code pour le transporteur de drogues (ABCB1). En utilisant des sondes dérivées d'*ABCB1/MDR1*, un nouveau gène a été détecté et nommé *MDR3*. Le gène *ABCB4/MDR3* est très proche d'*ABCB1/MDR1*, ils sont tous les deux localisés à proximité (séparés de 34 kbases) sur le chromosome 7q21.1 et possèdent le même nombre d'exons et d'introns (28 exons et 27 introns). Certaines études suggèrent qu'*ABCB4* est issu de la duplication d'*ABCB1* au cours de l'évolution (Lincke et al. 1991). Au niveau protéique, ils partagent plus de 76% d'identité de séquence et 86 % de similarité (Figure 11).



**Figure 11 : Les résidus conservés entre ABCB4 et ABCB1.** Les résidus identiques aux deux transporteurs sont présentés en rouge et les résidus différents sont indiqués en gris. Les résidus différents sont principalement localisés au niveau du domaine N-terminal, les boucles extracellulaires et la partie 'Linker'. D'après (Gautherot 2012).

## II-1-2. Expression et distribution tissulaire

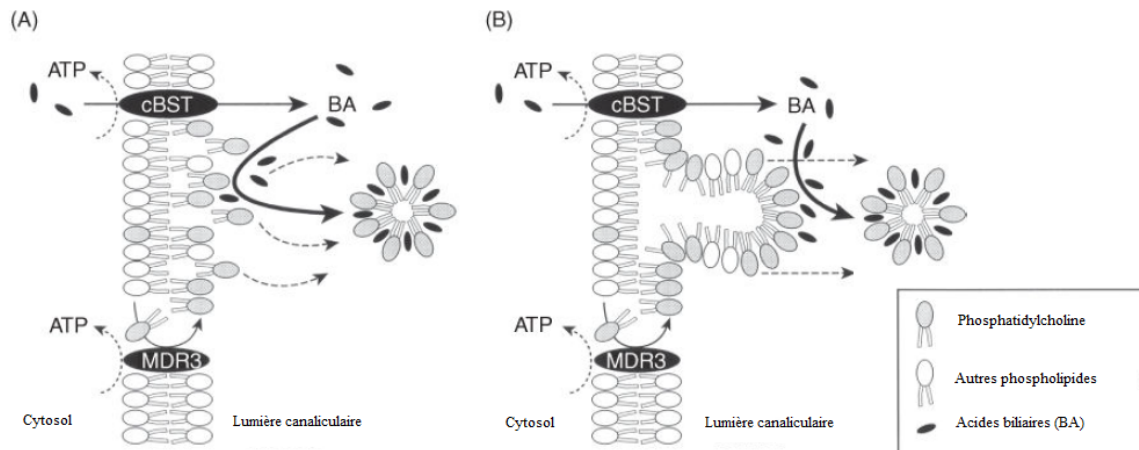
Le gène *ABCB4* est très conservé chez les mammifères. Chez l'Homme, il fait 34 kbases et son transcrit 4100 nucléotides. Il code pour une protéine transmembranaire de 1279 acides aminés et d'une masse moléculaire de 160 kDa (OMIM 171060). Son ARN pré-messager subit un épissage alternatif ; 3 variants d'*ABCB4* ont été détectés dans une banque d'ADNc hépatique, ils codent pour 3 isoformes différentes nommées A, B et C. Seule l'isoforme A a été détectée au niveau protéique et considérée comme la séquence de référence dans toutes les bases de données (van der Blik et al. 1988). *ABCB4* a une distribution hépato-spécifique, des expériences d'immuno-marquage ont montré qu'il est exclusivement exprimé au niveau des membranes canaliculaires des hépatocytes. Néanmoins, de faibles quantités de ses transcrits ont été détectées dans d'autres organes comme les glandes surrénales, le cœur, le cerveau et le placenta (Smit et al. 1994).

## II-1-3. Rôle physiologique

A sa découverte, *ABCB4* a été considéré comme un transporteur de drogues en référence à son homologue *ABCB1*. C'est en 1993 que sa fonction de floppase de PC a été décrite. La génération des souris *Abcb4<sup>-/-</sup>* a permis de caractériser son substrat (Smit et al. 1993). En effet, ces souris présentaient plusieurs atteintes hépatiques, une absence totale de PC dans leur bile (Smit et al. 1993) ainsi qu'une diminution importante des vésicules unilamellaires dans leur lumière canaliculaire (Crawford et al. 1997). Toutes ces observations ont donc défini *ABCB4* comme un transporteur de PC. Les expériences réalisées *in vitro* dans des vésicules sécrétoires de levures exprimant *ABCB4* ont également confirmé cette fonction (Ruetz and Gros 1994).

Plusieurs termes sont utilisés pour décrire la fonction d'*ABCB4* : transporteur, translocase ou encore floppase de PC. Cependant, le mécanisme exact de sécrétion de PC par *ABCB4* reste mal connu. Deux modèles de sécrétion de PC dans la bile ont été proposés (Boyer 2013) : i) *ABCB4* permet la translocation de PC du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane, puis elle est extraite par l'activité détergente des acides biliaires (Figure 12A) ; ou ii) en floppant la PC, *ABCB4* déstabilise la membrane plasmique, des structures vésiculaires riches en PC sont créées auxquelles s'associent les acides biliaires (Figure 12B). En plus d'être dépendante de l'hydrolyse d'ATP, l'activité de sécrétion de PC par *ABCB4* est stimulée par les acides biliaires (Nies, Gatmaitan, and Arias 1996).





**Figure 12 : Mécanismes de sécrétion de PC par ABCB4.** Deux modèles ont été décrits. (A) La PC est transloquée par ABCB4 puis extraite par les acides biliaires ou (B) sous l'action floppase d'ABCB4, des vésicules de PC sont créées auxquelles s'ajoutent les acides biliaires. D'après (Boyer 2013).

Outre sa fonction de sécrétion de PC, certaines études *in vitro* suggèrent qu'ABCB4 est capable de lier et de transporter plusieurs substrats d'ABCB1, notamment des drogues (Smith et al. 2000 ; Morita et al. 2013). La capacité d'ABCB4 à transporter les drogues reste cependant discutable et des investigations supplémentaires seraient nécessaires pour éclaircir ce point.

## II-2. Structure et trafic d'ABCB4

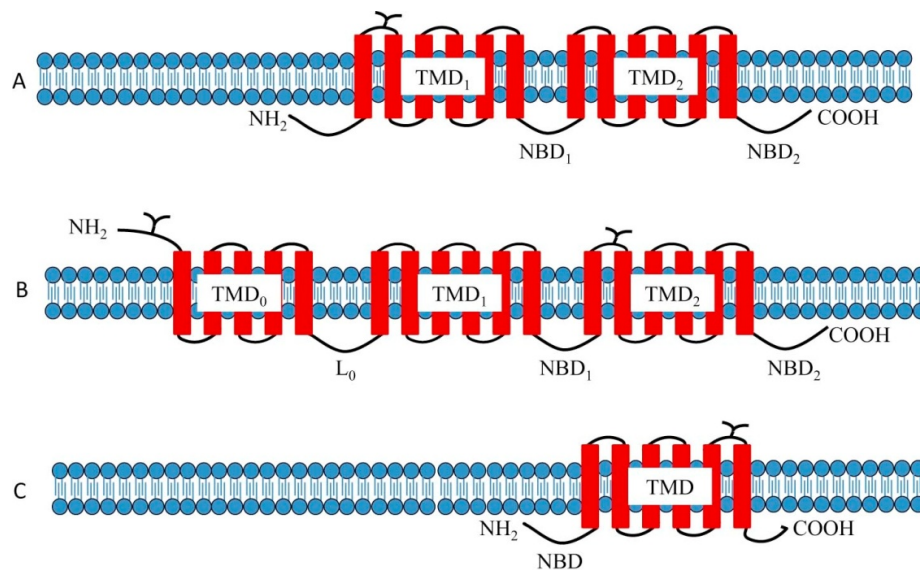
### II-2-1. ABCB4, un membre de la famille ABC

ABCB4 fait partie de la superfamille des transporteurs ABC (ATP Binding Cassette), l'une des plus grandes familles de protéines transmembranaires. Ces transporteurs sont exprimés dans tout l'organisme (intestin, cerveau, reins...) et jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus cellulaires. En utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP, les transporteurs ABC assurent le transport de leurs substrats (peptides, hormones, ions, lipides...) à travers les membranes cellulaires. On compte 48 membres chez l'Homme, classés en 7 sous familles de A jusqu'à G selon leurs séquences (Tableau 1) (Liu 2019 ; Ford and Beis 2019).

<b>Familles</b>	<b>Membres et caractéristiques</b>	<b>Fonctions</b>
<b>ABCA</b>	Comporte 12 membres (de 1 jusqu'à 12). Cinq de ces membres sont situés en cluster sur le chromosome 17. ABCA1 et ABCA4 sont les plus étudiés, des mutations sur ces deux transporteurs sont responsables de la maladie de Tangier et de Stargardt respectivement.	Responsable du transport du cholestérol, des lipides ainsi que d'autres substrats
<b>ABCB</b>	Se compose de 4 transporteurs 'entiers' et 7 'hémi-transporteurs' Regroupe deux familles de transporteurs MDR (MultiDrug Resistance) et TAP (Transporter associated with Antigen Processing) Rôle clé dans la sécrétion biliaire (ABCB4, ABCB11) Exprimée au niveau de la barrière hémato-encéphalique, foie, RE, mitochondries et lysosomes	Transporte des peptides, des drogues, des acides biliaires et des phospholipides
<b>ABCC</b>	Se compose de 12 transporteurs complets Le plus connu ABCC7/CFTR responsable de la mucoviscidose ABCC2, ABCC3 et ABCC4 sont importants pour la sécrétion biliaire Présente dans différents tissus (pancréas, muscles, foie...)	Transporte des ions, des toxines, la bilirubine et des drogues
<b>ABCD</b>	Formée de 4 hémi-transporteurs Exprimée au niveau des peroxysomes et RE	Sécrétion des acides gras et synthèse des acides biliaires et des lipides
<b>ABCE</b>	Comporte un seul transporteur ABCE1 Structure particulière avec deux NBDs et aucun TMD Exprimée dans le cytoplasme	Régulation de la synthèse ou expression protéique
<b>ABCF</b>	3 membres cytosoliques sans TMD	Fonction inconnue
<b>ABCG</b>	Comporte 5 hémi-transporteurs qui homo- ou hétéro-dimérisent pour assurer leur fonction Exprimée dans le foie, cerveau et macrophages ABCG5/G8 est impliqué dans la sécrétion biliaire	Transporte des lipides, diverses drogues, le cholestérol et d'autres stéroïdes

**Tableau 1 : Sous-familles de transporteurs ABC humains.** Chez l'homme, 48 transporteurs ABC ont été identifiés, qui sont classés en 7 sous-familles (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF et ABCG) (Dean, Rzhetsky, and Allikmets 2001).

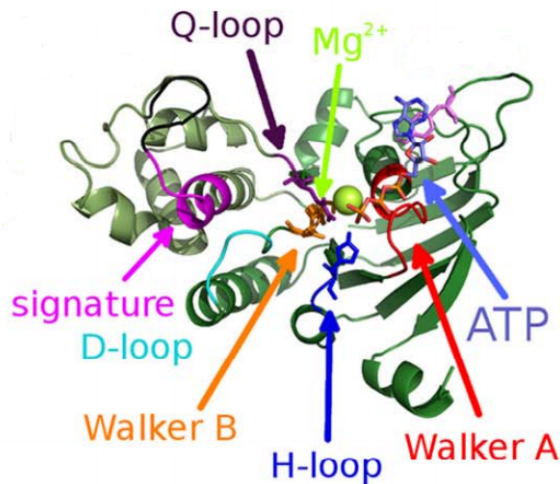
Ces transporteurs ont une topologie typique adaptée à leur fonction. La majorité des transporteurs ABC sont organisés en quatre domaines : deux domaines transmembranaires TMDs (TransMembrane Domain) et deux domaines de liaison à l'ATP nommés NBDs (Nucleotide Binding Domain) (Ford and Beis 2019) (Figure 13A). Il existe cependant des exceptions : certains membres des transporteurs ABC (notamment la famille des ABCC) possèdent des domaines supplémentaires comme le domaine TMD0 pour ABCC1 (Figure 13B) et le domaine R (régulateur) pour ABCC7/CFTR (Biemans-Oldehinkel, Doeven, and Poolman 2006), d'autres dont la famille des transporteurs ABCG s'organisent en hémis-transporteurs qui s'homo- ou hétéro-dimérisent pour assurer leur fonction (Figure 13C) et les transporteurs de familles ABCE et ABCF solubles qui sont constitués seulement des domaines NBDs. Ces transporteurs peuvent également subir de nombreuses modifications post-traductionnelles comme la glycosylation, la phosphorylation ou l'ubiquitination. Ces modifications jouent un rôle important dans la stabilisation, le trafic et l'activité de ces transporteurs (Czuba, Hillgren, and Swaan 2018).



**Figure 13 : Topologie des transporteurs ABC.** (A) Structure basique des transporteurs ABC avec 2 domaines transmembranaires (TMD1 et 2) et deux domaines cytoplasmiques (NBD1 et 2). (B) Transporteur ABC avec un domaine supplémentaire (TMD0). (C) Représentation d'un hémis-transporteur ABC. Ces transporteurs présentent également des groupements glycanes sur leurs boucles extracellulaires. D'après (Chen et al. 2016).

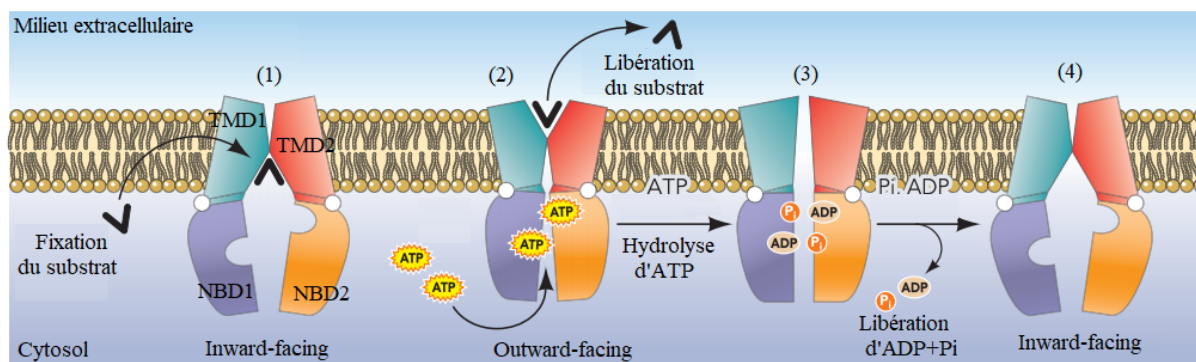
Les TMDs des transporteurs ABC sont hydrophobes et très variables. Ils sont composés de plusieurs hélices transmembranaires et jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance et la fixation du substrat. Les NBDs, quant à eux, constituent la partie cytoplasmique qui lie et hydrolyse l'ATP. Ces derniers comportent plusieurs motifs hautement conservés : le Walker A, aussi appelé P-loop (pour Phosphate-binding loop), et le

Walker B (tous deux communs à toutes les protéines liant l'ATP), la signature ABC contenant les acides aminés 'LSGGQ' (spécifique à la famille des transporteurs ABC, elle est indispensable pour la fixation de l'ATP) ainsi que d'autres domaines consensus H-loop, Q-loop et D-loop, respectivement riches en résidus histidine, glutamine et aspartate. Ces derniers sont impliqués dans le changement conformationnel du transporteur et la formation du site catalytique (Figure 14) (Linton 2007).



**Figure 14 : Motifs caractéristiques des domaines NBDs.** Les NBDs des transporteurs ABC sont hautement conservés, ils sont constitués de plusieurs motifs ; Walker A, Walker B, signature « LSGGQ », D-loop, Q-loop et H-loop. Tous ces motifs sont essentiels pour lier et hydrolyser l'ATP. D'après (Szöllösi et al. 2018).

Le mécanisme de fonctionnement précis des transporteurs ABC n'a pas été complètement élucidé mais il y a de nombreuses études qui soutiennent un cycle de transport couplé à plusieurs changements conformationnels (Szöllösi et al. 2018). Pour les transporteurs ABC de type exporteurs, un modèle dit 'alternating access' a été proposé. Dans ce modèle, le transporteur alterne entre deux conformations ouvertes soit vers l'intérieur (dite 'inward-facing') soit vers l'extérieur (dite 'outward-facing') avec des intermédiaires conformationnels fermés ('occluded') (Srikant and Gaudet, 2019). Selon ce modèle, les affinités aux substrats sont différentes pour chaque conformation prise par le transporteur. Comme présenté dans la figure 15, ce modèle peut être synthétisé en 4 étapes : (1) Fixation du substrat au niveau des TMDs induisant ainsi la dimérisation des NBDs et l'augmentation de leur affinité à l'ATP. (2) Fixation d'ATP, le transporteur subit des réarrangements conformationnels et adopte une conformation 'outward-facing' qui entraîne la diminution de l'affinité du substrat et donc sa libération dans le milieu extracellulaire. (3) L'ATP est hydrolysé avec la libération d'ADP et Pi. (4) Le transporteur retourne à sa conformation initiale 'inward-facing' (Figure 15) (Linton 2007). ABCB1 et ABCB4 semblent suivre globalement ce modèle d'alternative access (van Wonderen et al. 2014).



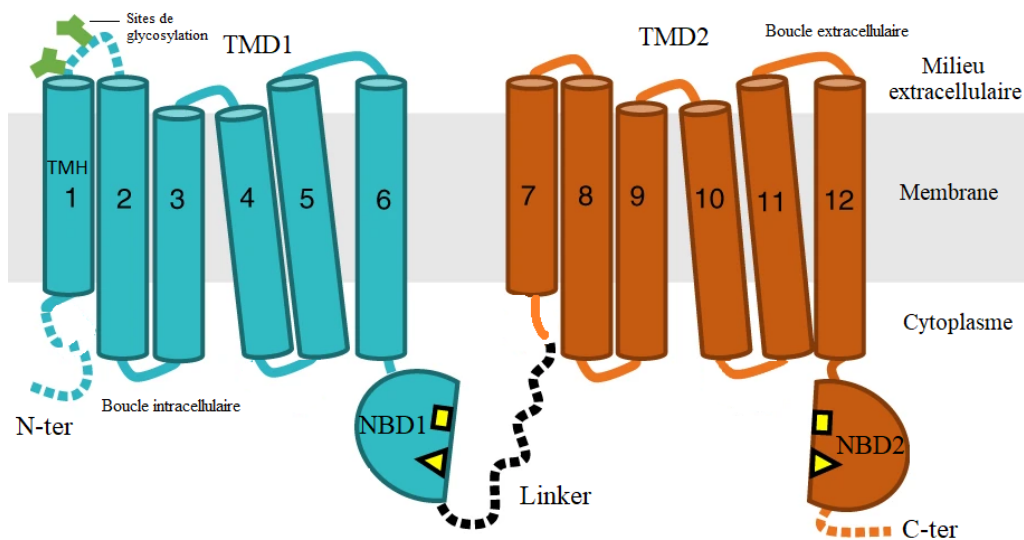
**Figure 15 : Modèle illustrant le fonctionnement des transporteurs ABC.** (1) Fixation du substrat au niveau des domaines TMDs. (2) Liaison d'ATP aux sites NBDs et changement conformationnel, le substrat est libéré dans le milieu extracellulaire. (3) Hydrolyse d'ATP et libération d'ADP et Pi. (4) Retour du transporteur à la conformation 'inward-facing'. D'après (Linton 2007).

Durant ces dernières années, les avancés spectaculaires en cristallographie mais surtout en cryo-microscopie électronique (cryo-EM) ont permis l'explosion de la résolution structurale de nombreuses protéines transmembranaires dont les transporteurs ABC (Srikant and Gaudet 2019). Fait intéressant, les structures des trois principaux transporteurs hépatobiliaires (ABCG5/G8, ABCB4 et ABCB11) sont aujourd'hui résolues (Lee et al. 2016 ; Olsen et al. 2020 ; Wang et al. 2020). Ces structures ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de ces transporteurs au niveau moléculaire mais également l'impact des variations génétiques identifiées chez des patients atteints de pathologies impliquant des déficits fonctionnels de ces transporteurs.

## II-2-2. Structure d'ABCB4

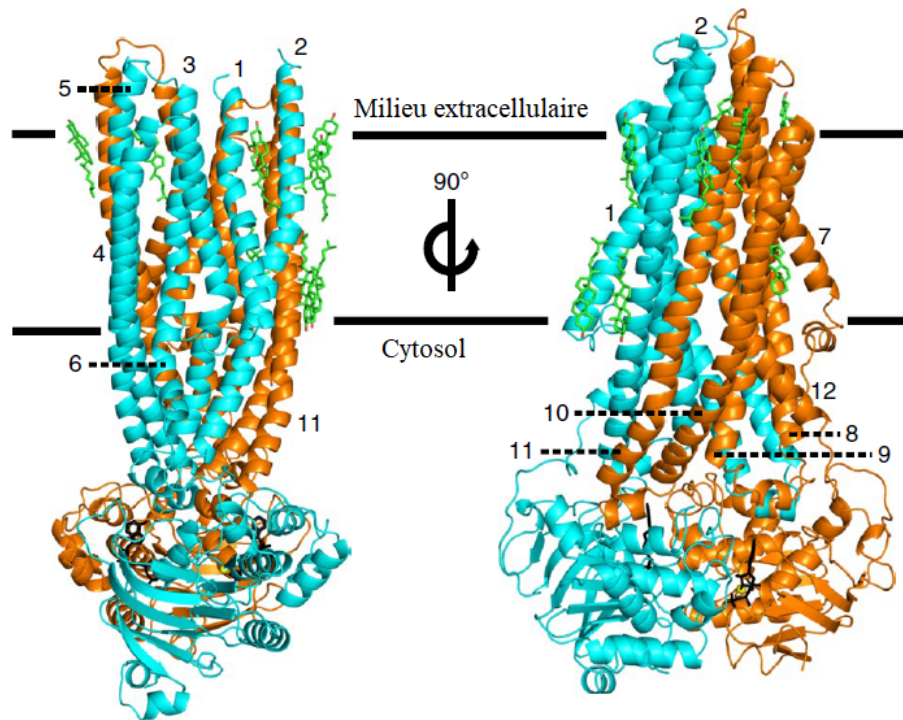
ABCB4 est un transporteur ABC entier, constitué de quatre domaines (TMD1, TMD2, NBD1 et NBD2) (Figure 16) (van der Blik et al. 1988). Les TMDs comportent chacun six hélices alpha transmembranaires (TMH1 jusqu'à TMH6) reliées entre elles par des boucles extra- et intracellulaires. On compte 4 boucles intracellulaires (nommées également coupling helices, CP) et 6 boucles extracellulaires. La première boucle extracellulaire qui relie le TMH1 et le TMH2 contient deux sites de glycosylation sur les Asp 91 et 97. En plus de ces boucles, ABCB4 possède un domaine intra-cytoplasmique central nommé 'linker', qui connecte les deux 'moitiés' du transporteur ensemble (TMD1-NBD1 avec TMD2-NBD2). Ce domaine comporte 80 acides aminés (allant de la Phe 620 à la Val 700) et constitue une zone d'interaction avec plusieurs protéines partenaires (Chan et al. 2005 ; Ikebuchi et al. 2009 ; Ortiz et al. 2004) (Voir partie II-2-6-1). Les deux NBDs sont cytoplasmiques et se dimérisent

pour former 2 sites de fixation d'ATP. Les extrémités N et C-terminales d'ABCB4 sont également intra-cytoplasmiques. Le domaine N-terminal est peu conservé et contient plusieurs sites de phosphorylation (notamment sur les résidus Ser 49 et Thr 34 et 44) (Gautherot et al. 2014). Le domaine C-terminal, quant à lui, est très conservé : sa séquence est identique à celle d'ABCB1 à l'exception des 3 derniers résidus. ABCB4 présente en effet un motif QNL (Glu/Asp/Leu) terminal, montré comme étant essentiel à l'interaction avec EBP50 (Ezrin-radixin-moesin (ERM)-Binding Phosphoprotein 50), une protéine à domaine PDZ nécessaire à sa stabilité membranaire (Venot et al. 2016).



**Figure 16 : Topologie d'ABCB4.** ABCB4 est constitué de deux domaines transmembranaires TMD1 et TMD2, deux domaines NBDs (NBD1 et NBD2), plusieurs boucles intra- et extra- cellulaires, le linker et deux extrémités N- et C- terminales. D'après (Olsen et al. 2020).

Durant plusieurs années, les études structurales d'ABCB4 se sont basées sur les structures d'ABCB1 (Alam et al. 2019 ; Kim and Chen 2018) grâce à la forte homologie de séquence entre les deux transporteurs. Et plus récemment la structure d'ABCB4 a été résolue par cryo-EM avec une résolution de 3.2 Å (Olsen et al. 2020). La structure résolue adopte une conformation fermée 'closed conformation' liée à l'ATP (Figure 17).



**Figure 17 : Structure d'ABCB4 humain.** Cette structure est résolue par cryo-microscopie électronique avec une résolution de 3.2 Å. La première moitié du transporteur (constituée par TMD1 et NBD1) est représentée en bleu tandis que la deuxième moitié (TMD2 et NBD2) est indiquée en orange. Les chiffres de 1 jusqu'au 12 indiquent les hélices du transporteur. D'après (Olsen et al. 2020).

La résolution structurale d'ABCB4 a permis de clarifier et d'apporter des nouvelles connaissances quant au fonctionnement de ce transporteur. En effet, Olsen et ses collègues ont révélé qu'ABCB4 possède deux sites de fixation d'ATP asymétriques. Néanmoins, un ion magnésium ( $Mg^{2+}$ ) n'est retrouvé qu'au niveau du premier site de fixation d'ATP mais pas du deuxième. Ils ont également souligné l'importance des boucles extracellulaires et de trois résidus transmembranaires clés (Val 989, His 990 et Ala 985) pour la fonction floppase de PC d'ABCB4 (Olsen et al. 2020).

### II-2-3. Régulation transcriptionnelle

ABCB4 est régulée à différents niveaux. Au niveau transcriptionnel, son expression est contrôlée par plusieurs récepteurs nucléaires, hormonaux ainsi que d'autres facteurs. L'implication des récepteurs nucléaires FXR et PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha) dans la régulation d'ABCB4 a été bien élucidée. En effet, il a été montré que le traitement des cellules par des agonistes de FXR (GW4064) ou de PPAR $\alpha$  (fibrates) augmentait l'expression d'ABCB4 (Huang et al. 2003; Shoda et al. 2007).

En plus de ces récepteurs, l'hormone thyroïdienne T3 a été décrite comme régulatrice d'ABCB4. Les études réalisées par Gautherot et ses collègues ont montré que T3 stimule l'expression d'ABCB4 et que cet effet est médié par le récepteur THR $\beta$ 1 (Gautherot et al. 2018). Les statines, utilisées en clinique pour les patients atteints de pathologies cardiovasculaires, régulent également l'expression d'ABCB4. Chez des rats traités par ces médicaments, une augmentation des transcrits d'ABCB4 a été observée (Hooiveld et al. 1999). D'autres études suggèrent la contribution des hormones féminines (œstrogènes et la progestérone) dans la régulation d'ABCB4. En effet, lors d'une grossesse, certaines femmes développent une pathologie cholestatique nommée ICP (Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy) (Pillarisetty and Sharma 2020), une pathologie similaire ayant été observée sous traitement hormonal contraceptif (Ganne-Carrié et al. 2003).

#### **II-2-4. Biosynthèse et repliement**

Comme toutes les protéines, la biosynthèse d'ABCB4 s'initie dans le réticulum endoplasmique (RE). Selon plusieurs modèles décrits, la translocation des protéines transmembranaires dans le RE et leur glycosylation se font de manière co-translationnelle. ABCB4 est N-glycosylé au niveau de sa première boucle extracellulaire, des groupements complexes d'oligosaccharides (constitués par deux N-acetylglucosamines, neuf mannoses et trois glucoses) sont transférés sur les Asn des motifs Asn-X-Thr/Ser. La N-glycosylation est l'une des modifications les plus communément observées des protéines. Elle joue un rôle essentiel dans leur repliement, leur transport intracellulaire ainsi que leur expression membranaire (Czuba, Hillgren, and Swaan 2018). Le repliement et l'assemblage des protéines sont assurés par l'interaction avec plusieurs chaperonnes. Ces dernières s'associent avec la protéine naissante, assistent son repliement et augmentent sa stabilité. Deux classes de chaperonnes ont été décrites dans le RE : (1) la famille des chaperonnes de type lectines (comme la calnexine et la calréticuline) qui interagissent spécifiquement avec les glycoprotéines et (2) la famille des protéines de choc thermique Hsp (Heat shock proteins) (Díaz-Villanueva, Díaz-Molina, and García-González 2015).

L'interaction de la calnexine et de la Hsc70 avec ABCB1 a été rapportée (Loo and Clarke 1995 ; Gautherot et al. 2012). La plupart des chaperonnes ne sont pas spécifiques et interviennent aussi probablement dans le repliement d'ABCB4. Outre leur fonction de repliement, les chaperonnes jouent également un rôle important dans le contrôle qualité des protéines. En effet, elles sont capables de reconnaître les protéines mal repliées et de les séquestrer dans le RE avant d'être dégradées par le système ERAD (Endoplasmic Reticulum-



Associated Degradation) (Díaz-Villanueva, Díaz-Molina, and García-González 2015). Ce système assure que seules les protéines correctement repliées sortent du RE en poursuivant la voie de biosynthèse/sécrétion.

Au-delà du RE, ABCB4 rejoint l'appareil de Golgi où il subit de nouvelles modifications de ses chaînes oligosaccharidiques. Selon son état de glycosylation, ABCB4 peut être détecté sous deux formes, une forme immature de 140 kDa partiellement glycosylée, détectée généralement au niveau du RE et une forme mature de 160 kDa entièrement glycosylée, adressée à la membrane plasmique (Delaunay et al. 2009).

### **II-2-5. Trafic intracellulaire**

Généralement, les protéines apicales hépatocytaires adoptent une voie indirecte de trafic. En effet, elles sont tout d'abord transportées vers les membranes basolatérales puis rejoignent les membranes apicales par transcytose. Contrairement à ce modèle, les expériences de pulse chase réalisées chez le rat ont montré que les transporteurs ABC canaliculaires, dont ABCB4, sont directement adressés de l'appareil de Golgi vers la membrane canaliculaire ou vers des compartiments sous-membranaires (Kipp and Arias 2000; Kipp and Arias 2002).

Pour répondre au besoin accru de sécrétion biliaire, la délivrance membranaire des transporteurs ABC est contrôlée par plusieurs facteurs. L'implication de l'AMPc et du taurocholate dans la régulation du trafic intracellulaire de ces transporteurs a été bien documentée. En effet, l'administration de ces deux composés chez le rat a permis d'augmenter l'expression membranaire de différents transporteurs biliaires, notamment ABCB4 (Gatmaitan, Nies, and Arias 1997). Misra et ses collègues ont également montré l'implication de la PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase) dans ce processus. En effet, l'inhibition pharmacologique de la PI3K avec de la wortmannine a entraîné une diminution de l'expression membranaire d'ABCB1, ABCB11 et ABCB4 ainsi que la diminution de la sécrétion biliaire (Misra et al. 1998).

### **II-2-6. Partenaires moléculaires d'ABCB4**

L'expression, le trafic, la stabilité et la fonction d'ABCB4 sont modulés par de multiples protéines intracellulaires. L'identification et la caractérisation de ces protéines jouent un rôle fondamental dans la compréhension de la biologie et la patho-biologie d'ABCB4.

### **II-2-6-1. Les partenaires connus**

Des expériences de criblage en double hybride ont permis d'identifier HAX-1 (HS1-Associated protein X-1) (Ortiz et al. 2004), RACK-1 (Receptor for Activated C-Kinase 1) (Ikebuchi et al. 2009) et la chaîne légère de la myosine (MLC2a) comme partenaires d'ABCB4 (Chan et al. 2005). Ces protéines interagissent avec le domaine 'Linker' d'ABCB4. RACK-1 est une protéine cytosolique impliquée dans plusieurs processus cellulaires, nécessaire à la localisation apicale d'ABCB4. En effet, l'extinction de son expression par des ARN interférents (RNAi) est associée à une rétention intracellulaire d'ABCB4 (Ikebuchi et al. 2009). HAX-1 est impliquée dans l'endocytose de plusieurs protéines notamment d'ABCB11 (Ortiz et al. 2004), néanmoins son implication dans la régulation du trafic et/ou de l'activité d'ABCB4 n'a pas été décrite. MLC2 est quant à elle une protéine motrice, son rôle régulateur sur ABCB4 a fait l'objet d'une thèse dans notre équipe dont les résultats seront bientôt publiés (Bruneau 2019). La protéine EBP50 a également été montrée comme partenaire d'ABCB4 (Venot et al. 2016). Elle fait partie de la famille des protéines à domaine PDZ et interagit avec le domaine C-terminal d'ABCB4. EBP50 joue un rôle important dans la stabilisation d'ABCB4 à la membrane.

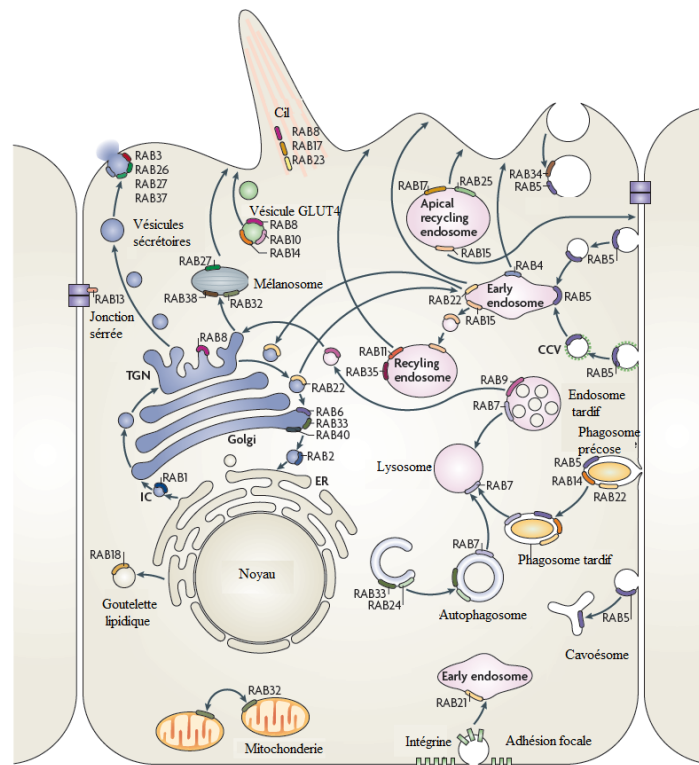
La majorité des partenaires d'ABCB4, interagissent également avec les autres transporteurs canaliculaires comme ABCB1, ABCB11, ABCC2 et ABCG5/G8. Cela témoigne vraisemblablement de mécanismes de régulation communs pour ces transporteurs. Avec deux doctorantes de mon laboratoire, j'ai écrit une revue pour décrire les différentes protéines interagissant avec les transporteurs biliaires durant toutes les étapes de leur biosynthèse, trafic, activité et stabilité (Ben Saad, Bruneau et Mareux, 2020 en préparation).

### **II-2-6-2. RAB10, un nouveau partenaire potentiel d'ABCB4**

Malgré les partenaires décrits précédemment, très peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes de régulation d'ABCB4. Afin de clarifier certains de ces mécanismes, une partie de ma thèse a eu pour objectif d'identifier de nouveaux partenaires d'ABCB4. Par une approche d'immunoprécipitation combinée à une analyse par spectrométrie de masse, nous avons identifié RAB10 comme partenaire potentiel d'ABCB4 (Voir Résultats – Deuxième partie - section 2-1).

### II-2-6-2-1. RAB10, un membre de la famille RAB

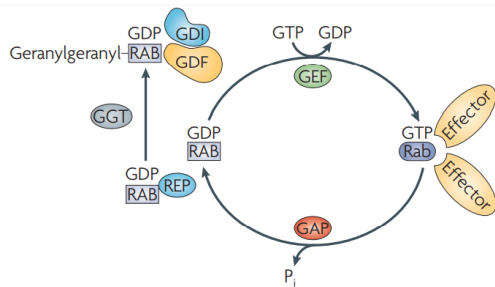
RAB10, fait partie de la famille des protéines RAB (Ras-related in brain). Les protéines RABs sont des petites GTPases ayant un rôle capital dans la régulation du trafic intracellulaire. Plus de soixante protéines RAB ont été identifiées chez l'Homme. Ces dernières sont exprimées de façon ubiquitaire et adaptent plusieurs localisations intracellulaires (Figure 18) (Stenmark 2009).



**Figure 18 : Localisation de différentes protéines RABs.** Les RABs sont localisés au niveau de différents compartiments intracellulaires (Golgi, RE, mitochondrie et endosomes) et assurent de nombreuses fonctions, principalement liées au trafic intracellulaire. D'après (Stenmark 2009).

Les RABs alternent entre deux formes : une forme inactive cytosolique liée au GDP (Guanosine DiPhosphate) et une forme active membranaire liée au GTP (Guanosine TriPhosphate). Plusieurs facteurs sont impliqués dans leur activation/inactivation. Les facteurs d'échange GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor) activent les RABs en catalysant l'échange de GDP en GTP, favorisant ainsi leur intégration à la membrane et les GAPs (GTPase Activating Protein), quant à elles, catalysent la conversion de GTP en GDP et donc inactivent les protéines RABs (Figure 19). Pour mieux caractériser les fonctions des protéines RABs, des mutants dominants actifs et inactifs de ces protéines ont été générés. Les mutants inactifs possèdent généralement une mutation dans leur site de fixation de GTP qui provoque leur blocage sous forme inactive liée au GDP. Les mutants actives sont constitutivement

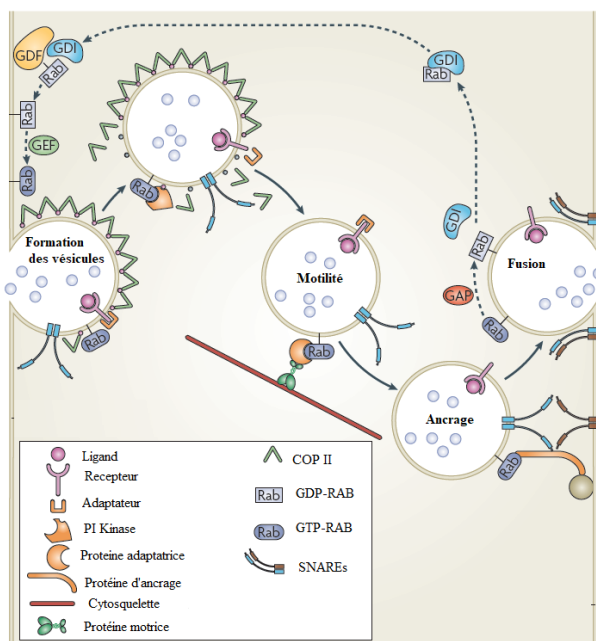
activées et lient de façon permanente le GTP. D'autres facteurs essentiels pour le fonctionnement des RABs ont également été décrits comme les protéines GDI (GDP Dissociation Inhibiteur) qui séquestrent les RABs inactives dans le cytosol et les facteurs GDF (GDI Dissociation Factor) qui favorisent l'interaction entre RABs et GEF (Figure 19). Les protéines RABs s'associent aux membranes grâce au groupement géranylgeranyl lié à leur domaine C-terminal (Müller and Goody 2018).



**Figure 19 : Activation des protéines RABs.**

Après leur synthèse, les RABs sont prises en charge par la protéine REP (Rab Escort Protein), cette dernière les met en contact avec la GGT (GéranylGéranyl Transférase) qui transfère des groupements géranylgeranyl au niveau de C-terminal des RABs. La GDI maintient les RABs à l'état inactif dans le cytosol. Au niveau de la membrane, la GDF déplace le GDI et favorise l'interaction de GEF aux RABs. Les protéines RABs sont alors activées par GEF, s'insèrent à la membrane et recrutent plusieurs effecteurs. La GAP catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP et inactive les RABs. D'après (Stenmark 2009).

Une fois activées, les RABs sont capables de recruter plusieurs effecteurs impliqués dans la formation, l'adressage, la motilité ou la fusion des vésicules de transport. Parmi les protéines effectrices des RABs, on trouve les SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachement protein REceptor), des protéines d'ancrage, des protéines adaptatrices, des protéines du cytosquelette ainsi que des moteurs moléculaires (Figure 20).



**Figure 20 : Les différentes protéines effectrices des RABs.**

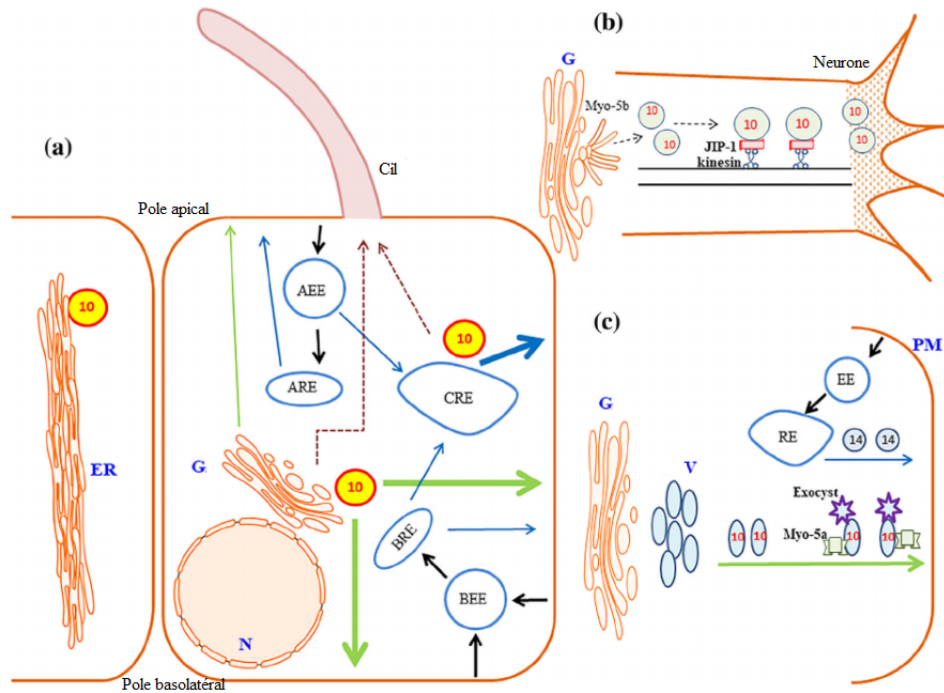
Les RABs interagissent avec un grand nombre des protéines effectrices impliquées dans la formation, la motilité, l'adressage, l'ancrage et la fusion des vésicules de transport. D'après (Stenmark 2009).

### **II-2-6-2-2. Expression et localisation de RAB10**

RAB10 est une petite protéine de 23 kDa. Elle a été initialement isolée et caractérisée à partir de cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) (Chavrier et al. 1990). C'est une protéine très conservée, elle a été détectée chez plusieurs espèces comme la levure, *C-elegans* et la drosophile. Elle présente une forte homologie avec la *sec4p*, son orthologue chez la levure et avec RAB8 et RAB13. RAB10 est localisée au niveau du RE, de l'appareil de Golgi et des endosomes (Chua and Tang 2018). Elle est exprimée dans plusieurs organes dont le foie (He et al. 2002). En 2016, RAB10 a été cristallisée en association avec son effecteur Mical-1 (Molecule interacting with CasL), un composant du cytosquelette (Rai et al. 2016).

### **II-2-6-2-3. RAB10, une protéine multifonctionnelle**

RAB10 est une protéine multifonctionnelle, elle est impliquée dans plusieurs processus de tri et dynamique intracellulaire (Figure 21). Des études réalisées dans les cellules MDCK ont montré qu'elle favorise l'adressage de plusieurs protéines de l'appareil de Golgi vers les membranes basolatérales et apicales (Babbey et al. 2006). D'autres études ont rapporté son implication dans l'endocytose et le recyclage (Liu and Grant 2015). RAB10 est également impliquée dans la ciliogenèse (Babbey, Bacallao, and Dunn 2010). Outre son implication dans le trafic intracellulaire, RAB10 régule la formation et l'assemblage du RE. La dérégulation de son expression par des siRNAs a été associée à l'altération de la morphologie et de la dynamique du RE (English and Voeltz 2013). Dans le système nerveux, RAB10 joue un rôle important dans le développement neuronal et le transport axonal (Wang et al. 2011). En association avec la protéine adaptatrice JIP1 (c-Jun N-terminal kinase-interacting protein1) et la protéine motrice Kinésine 1, elle stimule le transport vésiculaire de l'appareil de Golgi vers la membrane. L'implication de RAB10 dans l'exocytose du transporteur du glucose GLUT4 a été aussi documentée (Sano et al. 2008). De manière dépendante de l'insuline et en association avec la myosine 5A, RAB10 stimule l'adressage de GLUT4 vers la membrane (Chen and Lippincott-Schwartz 2013). D'autres fonctions de RAB10 ont également été décrites comme son implication dans le trafic du récepteur TLR4 (Toll-Like Receptor 4), son rôle dans l'autophagie et dans certaines infections bactériennes (pour revue voir (Chua and Tang 2018)).



**Figure 23 : Les principales localisations et fonctions de RAB10.** RAB10 possède plusieurs localisations, elle a été détectée au niveau du RE, de l'appareil de Golgi (G) et des endosomes. (a) Elle est impliquée dans la formation et l'assemblage du RE. Elle participe également à l'exocytose, l'endocytose et le recyclage de plusieurs protéines et dans la ciliogenèse. (b) RAB10 a été rapportée comme essentielle au développement neuronal et au transport axonal. (c) RAB10 assure également l'exocytose du transporteur de glucose GLUT4. ER, Réticulum Endoplasmique ; N, Noyau ; PM, Membrane Plasmique ; V, Vésicules ; AEE, Apical Early Endosome ; ARE, Apical Recycling Endosome ; CRE, Common Recycling Endosome ; BRE, Basolateral Recycling Endosome ; BEE, Basolateral Early Endosome. D'après (Chua and Tang 2018).

#### II-2-6-2-4. Physiopathologie de RAB10

RAB10 semble avoir un rôle essentiel dans l'organisme. En effet, toutes les tentatives d'établissement des souris KO pour *RAB10* sont mises en échec. Son invalidation entraîne une létalité embryonnaire (Lv et al. 2015). De plus, la dérégulation de son expression est associée à plusieurs pathologies comme la maladie d'Alzheimer (Tavana et al. 2019). Sa surexpression a également été notée dans plusieurs cancers, notamment l'hépatocarcinome (Wang et al. 2017).

## **Chapitre III : Pathologies associées à des défauts d'ABCB4 et approches thérapeutiques**

L'altération de l'expression, de la localisation ou de la fonction d'ABCB4 est associée à plusieurs pathologies biliaires rares. Pour la majorité des patients atteints de formes graves de ces pathologies, la transplantation hépatique reste le seul traitement curatif. L'un des principaux défis est de proposer des nouvelles thérapies pour ces patients.

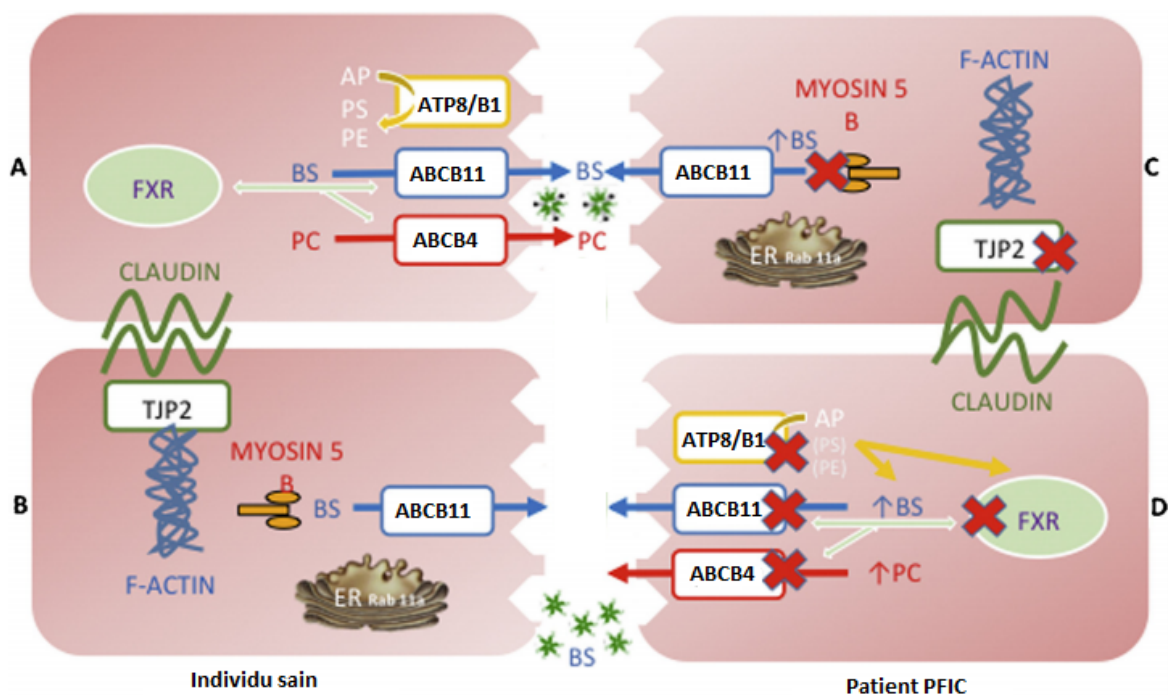
### **III-1. Pathologies associées à un dysfonctionnement d'ABCB4**

Trois principaux phénotypes pathologiques associés à des mutations d'*ABCB4* ont été décrits : la cholestase intrahépatique familiale progressive de type 3 (PFIC3, Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type 3), une forme particulière de lithiase de l'adulte nommée syndrome de lithiase intra-hépatique cholestérolique (LPAC, Low Phospholipid Associated Cholelithiasis) et la cholestase gravidique (ICP, Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy) (Reichert and Lammert 2018).

#### **III-1-1. La cholestase intrahépatique familiale progressive de type 3 (PFIC3)**

La PFIC3 est la forme la plus sévère des pathologies liées à des déficits fonctionnels d'ABCB4. Elle a été décrite pour la première fois en 1996 (Deleuze et al. 1996). C'est une pathologie rare, sa prévalence à la naissance est estimée entre 1/50 000 et 1/100 000 (OMIM 602347). Elle a un mode de transmission autosomique récessif, les patients sont le plus souvent homozygotes ou hétérozygotes composites. La PFIC3 se manifeste dès la petite enfance et se caractérise par un prurit, un ictère (jaunisse) et des atteintes hépatiques, elle évolue généralement vers une cirrhose et une insuffisance hépatique avant l'âge de 10 ans (Davit-Spraul et al. 2009). L'histologie hépatique des patients atteints de PFIC3 révèle souvent une fibrose avec une inflammation portale et une prolifération ductulaire (Jacquemin 2012). Ces patients présentent également une activité sérique élevée de l'enzyme hépatique la gamma-glutamyltransférase (GGT) et une concentration effondrée de PC dans la bile. La faible concentration de PC dans la bile déstabilise les micelles, favorise la formation de cristaux de cholestérol et augmente la lithogénécité des acides biliaires libres (Lipiński and Jankowska 2018).

D'autres formes de PFIC ont également été décrites comme la PFIC1, associée à un défaut de la flippase ATP8B1 ; la PFIC2 causée par un défaut du transporteur des acides biliaires ABCB11/BSEP ; la PFIC3 liée à un défaut du gène *ABCB4* qui code pour la protéine de jonction TJP2 (Tight Junction Protein 2) et PFIC5 associée à des mutations du gène *NR1H4*, codant pour le récepteur nucléaire FXR (Vitale et al. 2019). En plus de ces 5 formes de cholestases rares et sévères, Gonzales et ses collègues ont décrit une nouvelle forme associée à des mutations du gène *MYO5B* codant pour la protéine motrice la myosine 5B (Gonzales et al. 2017). Cette forme de cholestase a été récemment proposée comme PFIC6 (Overeem et al. 2020) (Figure 24).



**Figure 24 : Les différentes formes de cholestases intrahépatiques familiales progressives (PFIC).** 5 formes de cholestases ont été décrites ; la PFIC1 associée à des mutations d'*ATP8B1*, la PFIC2 causée par un défaut d'*ABCB11*, la PFIC3 liée à *ABCB4*, la PFIC4 associée à la TJP2 et la PFIC5 causée par un déficit de FXR. Des mutations du gène *MYO5B* sont aussi associées à une forme de cholestase récemment proposée comme PFIC6. PC, phosphatidylcholine ; BS, sels biliaires ; PS, phosphatidylsérine ; PE, phosphatidyléthanolamine et ER, réticulum endoplasmique. D'après (Vitale et al. 2019).



### **III-1-2. Le syndrome de lithiase intrahépatique cholestérolique (LPAC)**

Le syndrome LPAC est une forme particulière de lithiase biliaire associée à des mutations hétérozygotes d'ABCB4. Il a été décrit en 2001 (Rosmorduc, Hermelin, and Poupon 2001). Ce syndrome se manifeste chez l'adulte jeune, les premiers symptômes apparaissent généralement avant l'âge de 40 ans. Les patients atteints de syndrome LPAC souffrent le plus souvent d'un ictère, de douleurs abdominales, d'une pancréatite aiguë et présentent une faible concentration de PC dans la bile. L'échographie du foie montre également la présence des microcristaux et des calculs de cholestérol intrahépatiques en 'queue de comètes' (Rosmorduc and Poupon 2007). La prévalence exacte du syndrome LPAC n'est pas connue mais une prédominance féminine a été observée (avec un ratio homme/femme de 1/3). Contrairement aux autres formes de lithiases, le syndrome LPAC récidive souvent après une cholécystectomie (Goubault et al. 2019).

### **III-1-3. La cholestase gravidique (ICP)**

Il s'agit d'une forme réversible de cholestase qui apparaît au cours du troisième trimestre de la grossesse (Williamson and Geenes 2014). Les principales manifestations cliniques de l'ICP sont le prurit, l'ictère et l'augmentation de concentration sérique des acides biliaires. Tous ces symptômes régressent rapidement après l'accouchement. Cependant plusieurs complications ont été observées chez les patientes atteints d'ICP comme le risque d'accouchement prématuré ou la mort *in utero* du fœtus (Pillarisetty and Sharma 2020). La fréquence de cette pathologie diffère selon les pays et les ethnies. Il a été montré que les femmes ayant souffert d'ICP sont susceptibles de développer une cholestase lors de l'utilisation de contraceptifs oraux (Pillarisetty and Sharma 2020). Le mécanisme à l'origine de cette pathologie reste inconnu mais plusieurs études suggèrent une implication hormonale

### **III-1-4. Autres pathologies liées à des défauts d'ABCB4**

Des mutations d'ABCB4 ont également été retrouvées chez des patients atteints d'autres pathologies comme la cholangite biliaire primitive (CBP) (Lucena et al. 2003), la ductopénie idiopathique de l'adulte (Gotthardt et al. 2008), la cholangite sclérosante primitive (CSP) (Ziol et al. 2008) et les maladies cholestatiques fibrosantes (Ziol et al. 2008). En plus des mutations génétiques, le fonctionnement d'ABCB4 peut être altéré par divers médicaments causant ainsi plusieurs atteintes hépatiques, on parle alors de DILI (Drug-Induced Liver Injury) (Yoshikado et al. 2011).

## **III-2. Approches thérapeutiques existantes**

Actuellement, le seul traitement médicamenteux proposé pour les patients atteints des pathologies liées à un défaut d'ABCB4 est l'acide ursodeoxycholique (UDCA). En cas de réponse insuffisante à l'UDCA, la transplantation hépatique reste la seule solution.

### **III-2-1. L'acide ursodeoxycholique (UDCA)**

L'UDCA est le traitement de référence pour les maladies biliaires. C'est un acide biliaire relativement hydrophile, abondant chez l'ours (d'où le préfixe 'urso'), il était utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise pour plusieurs atteintes hépatiques (Hagey et al. 1993). L'UDCA se trouve également dans la bile humaine mais à faible concentration (moins de 3% des acides biliaires totaux). Son autorisation de mise sur le marché (AMM) a été obtenue en France en 1994 et il est utilisé à une posologie de 10 à 20 mg/kg/jour. Les patients atteints de syndrome LPAC et d'ICP répondent bien à l'UDCA, une diminution de leurs symptômes et l'amélioration de l'histologie hépatique ont été observées (Rosmorduc and Poupon 2007). Cependant, ce traitement est peu efficace pour les patients atteints de PFIC3, une activité résiduelle d'ABCB4 étant vraisemblablement nécessaire pour observer un effet bénéfique de cet acide biliaire exogène (Jacquemin 2012).

Le mode d'action de l'UDCA est complexe, il agit certainement à différents niveaux. En effet, il possède un effet cytoprotecteur en protégeant les membranes cellulaires de l'action toxique des acides biliaires libres, entraîne un enrichissement du pool biliaire endogène par des acides biliaires plus hydrophiles, stimule la sécrétion biliaire en augmentant l'expression membranaire de différents transporteurs dont ABCB4, permet une interruption partielle du cycle entérohépatique en diminuant la réabsorption iléale des acides biliaires et en favorisant leur élimination et présente également des propriétés anti-apoptotiques et anti-inflammatoires (Poupon 2012 ; Cabrera, Arab, and Arrese 2019).

### **III-2-2. La transplantation hépatique**

La transplantation hépatique est le seul traitement efficace pour un grand nombre de pathologies hépatiques sévères dont la PFIC3. En effet, la majorité des patients atteints de PFIC3 ne répondent pas (ou pas suffisamment) à l'UDCA et nécessitent une transplantation avant l'âge de 10 ans (Davit-Spraul et al. 2009). Il est important de noter que certains patients transplantés atteints de PFIC2 montrent une récurrence de la pathologie due à une allo-immunisation contre la protéine ABCB11 du donneur reconnue comme du « non-soi »

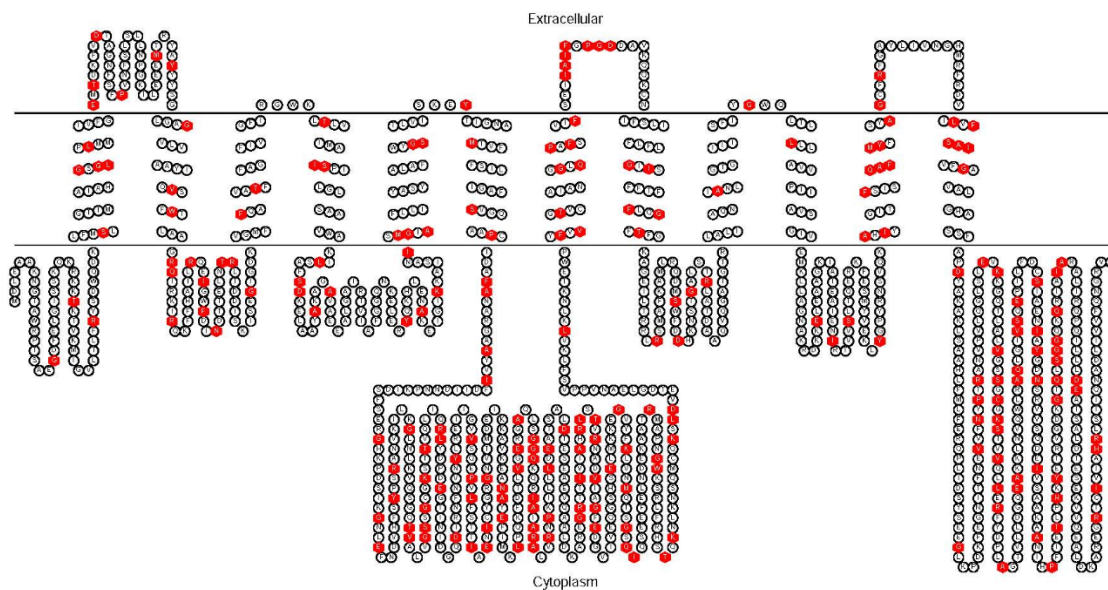
(Maggiore et al. 2010). Pour la PFIC3 et ABCB4, ce phénomène immunitaire n'a pas été observé.

### III-3. Développement de nouvelles thérapies

Durant ces dernières années, l'étude des variations génétiques d'*ABCB4* et la caractérisation de leurs effets au niveau moléculaire ont permis d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques.

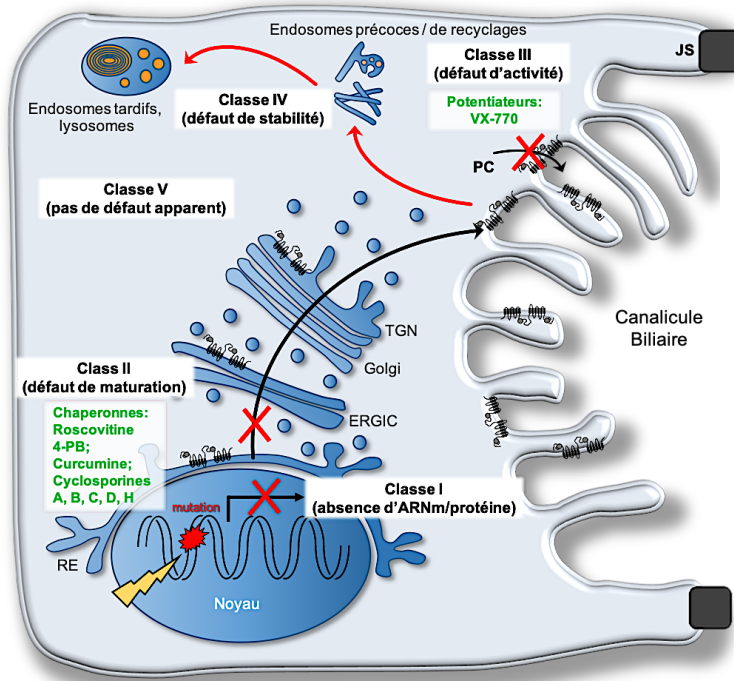
#### III-3-1. Les variations génétiques d'*ABCB4*

A ce jour, plus de 200 variations d'*ABCB4*, réparties sur tout le locus, ont été identifiées chez les patients souffrant de pathologies cholestatiques dont la PFIC3 (<https://evs.gs.washington.edu/EVS/> et <http://abcmutations.hegelab.org/>). La majorité des variations détectées sont des variations faux-sens (70%) (Figure 25).



**Figure 25 : Les différentes variations faux-sens d'*ABCB4*.** Ces variations sont représentées en rouge. La figure a été faite par le logiciel TOPO2 (<http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py>).

Ces variations affectent ABCB4 à différents niveaux : expression, trafic, activité ou stabilité. Récemment une classification de différents variants d'ABCB4 en fonction de leurs défauts moléculaires a été proposée (Delaunay et al. 2016 ; Vauthier, Housset, and Falguières 2017) (Figure 26).



**Figure 26 : Les différentes classes de variants d'ABCB4 proposées.** Cinq classes de variants ont été décrites. RE, Réticulum Endoplasmique ; TGN, Trans Golgi Network ; ERGIC, ER-Golgi Intermediate Compartment ; JS, Jonctions Serrées ; PC, Phosphatidylcholine. D'après (Vauthier, Housset, and Falguières 2017).

Cinq classes des variants ont été rapportées : Classe I, regroupe les variations qui altèrent la biosynthèse d'ABCB4, l'insertion d'un codon stop prématuré induit une absence de production de la protéine ; Classe II, les variants présentent un défaut de repliement et de trafic, le transporteur reste bloqué dans le RE sous forme immature ; Classe III, le transporteur est correctement adressé à la membrane plasmique mais son activité est réduite ; Classe IV, les variations affectent la stabilité d'ABCB4 ; Classe V, regroupe les variants qui ne présentent aucun défaut apparent (Delaunay et al. 2016 ; Vauthier, Housset, and Falguières 2017).

Il est intéressant de noter que chez certains patients atteints de PFIC3, LPAC et ICP, aucune variation d'ABCB4 n'a été détectée (Jacquemin 2012). Des gènes ou des protéines régulatrices, des facteurs environnementaux ou hormonaux pourraient être responsables des phénotypes pathologiques. D'où l'importance d'étudier les mécanismes moléculaires qui régulent l'expression, le trafic et la fonction d'ABCB4.

### **III-3-2. Thérapie ciblée pour ABCB4**

Le développement de thérapies ciblant spécifiquement chaque classe de variations constitue une voie prometteuse pour traiter les patients atteints des pathologies liées à un défaut d'ABCB4 (Vauthier, Housset, and Falguières 2017). La faisabilité de cette approche a déjà été démontrée avec les variants d'ABCC7/CFTR, responsables de la mucoviscidose. Durant ces dernières années, plusieurs molécules ont été développées pour corriger les variants déficients de CFTR. Fait intéressant, certaines de ces molécules ont obtenu leur AMM et sont aujourd'hui utilisées en clinique (Almughem et al. 2020 ; Lopes-Pacheco 2019). Depuis peu de temps la même stratégie est adoptée pour les pathologies cholestatiques et particulièrement pour la PFIC3, des moyens ayant été déployés pour le développement de traitements ciblant spécifiquement ABCB4.

#### **III-3-2-1. Translecture des codons stop prématurés pour les variants de classe I**

Les patients ayant des variations de classe I présentent généralement le phénotype le plus sévère dû à l'absence totale d'expression d'ABCB4. Pour ce groupe de variations, une approche de 'translecture' a été proposée. En effet, plusieurs molécules dites 'inducteurs de translecture' ont été décrites. Ces molécules ont pour fonction d'interférer avec le processus de la traduction. En se fixant sur la petite sous unité ribosomale, elles perturbent la fidélité de la traduction et assurent l'insertion d'un acide aminé autre que le codon stop et donc la réexpression de la protéine (Morais, Adachi, and Yu 2020).

L'efficacité de cette approche est directement liée à la nature du codon stop, son environnement nucléotidique ainsi que l'acide aminé incorporé. Les antibiotiques de la famille des aminoglycosides sont les plus utilisés dans cette stratégie notamment la gentamicine et la G418 (Howard, Frizzell, and Bedwell 1996). Cependant, leur utilisation en clinique semble limitée à cause de leur toxicité. Différents cribles ont permis d'isoler d'autres composés comme le PTC124, connu sous le nom 'Ataluren', un translecteur mis en évidence sur des modèles cellulaires (Du et al. 2008). Cette molécule a fait l'objet de plusieurs études cliniques chez les patients atteints de mucoviscidose. Néanmoins elles n'ont pas dépassé la phase III puisqu'aucun bénéfice thérapeutique n'a été observé (Kerem et al. 2014). Actuellement, des dérivés et des analogues structuraux des aminoglycosides et du PTC124 sont en cours d'investigation (Pibiri et al. 2015 ; Leubitz et al. 2019). Récemment, Amzal et ses collègues ont montré la possibilité de restaurer l'expression de certains variants de classe I du transporteur biliaire ABCB11 par la gentamicine, la G418 et le PTC124 (Amzal et al.

2020). Concernant ABCB4, des études évaluant l'effet des différents inducteurs de translecture sur ses variants de classe I sont en cours dans notre équipe.

### **III-3-2-2. Des correcteurs pour les variants de classe II**

Les variants de classe II présentent un défaut de repliement et de trafic intracellulaire, ils restent retenus dans le RE avant leur dégradation. Un exemple très étudié de ce groupe de variants est  $\Delta F508$  du transporteur CFTR/ABCC7. Cette variation, consistant en une délétion de la phénylalanine en position 508, est détectée chez 70% des patients atteints de mucoviscidose et responsable de la rétention intracellulaire et de la dégradation prématurée de la protéine mutée (Cheng et al. 1990). Par criblage à haut débit, plusieurs molécules correctrices ont été développées pour ce variant (Pedemonte and Galiotta 2012 ; Spanò et al. 2019). Le premier crible réalisé par Pedemonte et ses collègues a permis d'identifier le composé Corr-4a (C4) comme correcteur potentiel pour CFTR- $\Delta F508$  (Pedemonte et al. 2005). Des formes membranaires de ce variant ont été détectées suite au traitement avec ce composé. Un autre crible utilisant comme chimiothèque des médicaments déjà commercialisés a détecté le Sildénafil et ses analogues (C9 et C10) comme correcteurs potentiels (Robert et al. 2008). Les composés VRT-325 (C3) et VRT-534 (C18) quant à eux ont été développés par Vertex Pharmaceuticals (Van Goor et al. 2006). Certains de ces correcteurs (la série « C » pour correcteurs, de C1 à C18) ont été mis à disposition de la communauté scientifique par la Cystic Fibrosis Foundation (CFF, Chicago, Illinois). L'optimisation structurale de C18 a abouti à la génération du composé VX-809 (nommée aussi Lumacaftor). En combinaison avec une molécule potentiatrice nommée Ivacaftor/VX-770 (pour plus de détail sur cette molécule, voir section II-3-2-3), le VX-809 était le premier correcteur mis sur le marché sous le nom ORKAMBI® (Deeks 2016).

Et depuis, d'autres combinaisons ont été approuvées comme le Tezacaftor (VX-661, une forme modifiée du VX-809) avec l'Ivacaftor/VX-770 (Taylor-Cousar et al. 2017) et la trithérapie TRIKAFTA® combinant Tezacaftor, Ivacaftor/VX-770 et Elexacaftor (VX-455) (Hoy 2019). Le mécanisme d'action de ces correcteurs reste mal connu mais plusieurs études ont montré qu'ils agissent comme des 'chaperonnes pharmacologiques' *via* une interaction directe avec la protéine mal repliée, lui permettant d'adopter une conformation plus proche de la conformation native, d'échapper du RE et ainsi de rejoindre la membrane plasmique (Molinski et al. 2018).

D'autres composés qualifiés de 'régulateurs de la protéostasie' ont également été décrits pour les variants de classe II de CFTR. Ces molécules agissent indirectement en modulant l'expression et l'activité de la machinerie du contrôle qualité des cellules. Parmi ces composés, on trouve le 4-phénylbutyrate de sodium (4-PBA) qui agit à différents niveaux, en inhibant les protéines HDAC (Histone Désacétylase) ou en ciblant les chaperonnes de RE (Rubenstein and Lyons 2001), la thapsigargine et la curcumine qui inhibent les pompes à calcium du RE (SERCA/Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase) (Song et al. 2004), l'inhibiteur de la glucosyltransférase le NB-DNJ (N-butyl-deoxynojirimycin ou Miglustat) (Norez et al. 2006) et la Roscovitine, une molécule inhibitrice des protéines kinases dépendante des cyclines (Norez et al. 2014).

Concernant les variants de classe II d'ABCB4, la possibilité de corriger leur défaut de trafic a également été démontrée. En effet, des études antérieures réalisées au sein de notre équipe ont permis de montrer que la rétention intracellulaire du variant retenu I541F peut être partiellement levée en abaissant la température de culture à 27°C ou en traitant les cellules avec la cyclosporine A (CsA) (Gautherot et al. 2012 ; Delaunay et al. 2009). Néanmoins, l'intérêt thérapeutique de la CsA était limité à cause de son effet inhibiteur sur la fonction d'ABCB4 (Andress et al. 2014). Gordo-Gilart et ses collègues ont aussi rapporté que le 4-PBA et la curcumine permettent la correction de la maturation d'autres mutants de classe II d'ABCB4 comme G228R et A934T (Gordo-Gilart et al. 2016).

### **III-3-2-3. Développement de potentiateurs pour les variants de classe III**

Les mutations de classe III affectent la fonction du transporteur. En effet, la protéine est correctement localisée à la membrane mais sa fonction est réduite ou complètement abolie. Pour ce groupe des variants, des molécules dites 'potentiateurs' ont été développées. L'Ivacaftor/VX-770 est l'un des premiers potentiateurs développés. Il a été identifié par un criblage à haut débit pour le variant non fonctionnel de CFTR, G551D (Hadida et al. 2014). Ce composé a fait l'objet de plusieurs essais cliniques et depuis 2012, il est approuvé et prescrit pour les patients atteints de mucoviscidose ayant des variations de classe III (Ramsey et al. 2011 ; De Boeck et al. 2014). Selon plusieurs études, le VX-770 agit directement sur CFTR en augmentant la durée de son ouverture (Van Goor et al. 2009). Plus récemment, son site de fixation sur CFTR a été déterminé : il interagit à l'interface des domaines transmembranaires (Liu et al. 2019). Ce composé a également montré un effet potentiateur sur d'autres transporteurs ABC, notamment ABCB11 (Mareux et al. 2020) et ABCB4 (Delaunay et al. 2017). L'amélioration de la sécrétion de PC de cinq variants non fonctionnels d'ABCB4

(G535D, G536R, G1178S, S1176L, et S1076C) a été notée suite à un traitement avec l'Ivacaftor/VX-770 (Delaunay et al. 2017). Néanmoins, le mécanisme d'action de ce potentiateur sur ABCB11 et ABCB4 n'est pas encore connu.

Dernièrement, d'autres potentiateurs ont été élaborés comme les SBC (Structure Based Compounds), conçues par une approche de modélisation *in silico* afin de cibler directement les sites de fixation d'ATP, ces molécules ont montré *in vitro* des effets potentiateurs sur CFTR (Froux et al. 2020). D'autres potentiateurs développés par la compagnie Galapagos<sup>TM</sup> sont actuellement en essais cliniques (Davies et al. 2019).

#### **III-3-2-4. Cibler les récepteurs nucléaires régulant l'expression d'ABCB4**

Comme précédemment mentionné, les récepteurs nucléaires FXR et PPAR $\alpha$  régulent l'expression d'ABCB4. Le ciblage de ces récepteurs a donc été proposé pour améliorer l'expression d'ABCB4 et augmenter la sécrétion de PC. Plusieurs études ont montré que l'administration des agonistes de ces récepteurs permet d'augmenter l'expression d'ABCB4 au niveau des canalicules biliaires (Huang et al. 2003 ; Shoda et al. 2004). Il est intéressant de noter que récemment l'agoniste de FXR, l'acide obéticholique (commercialisé sous le nom Ocalivia<sup>®</sup>), a obtenu son AMM pour traiter les patients atteints de la cholangite biliaire primitive (CBP), une autre maladie biliaire (Nevens et al. 2016). Après validation préclinique, il serait intéressant d'envisager son utilisation dans le cadre de pathologies liées à des déficits d'ABCB4.

#### **III-3-2-5. Autres thérapies**

D'autres thérapies ont également été proposées comme les thérapies géniques et les thérapies cellulaires. Depuis plus de vingt ans, la thérapie génique a été proposée comme une solution pour les maladies monogéniques. Cette approche consiste à introduire, grâce à un vecteur (viral ou lipidique), un gène fonctionnel dans des cellules à la place du gène défectueux. Actuellement, plusieurs essais cliniques de thérapies géniques sont en cours chez l'Homme pour le traitement de différentes maladies dont la mucoviscidose (Alton et al. 2015 ; Sainz-Ramos et al. 2020). Dans le cadre des maladies cholestatiques, plusieurs essais réalisés chez des souris *Abcb4*<sup>-/-</sup> ont montré des résultats prometteurs. En effet, l'administration du gène *Abcb4* sauvage chez ces souris par des vecteurs viraux a permis le rétablissement de la sécrétion de PC ainsi que l'amélioration de la fonction hépatique (Weber et al. 2019 ; Siew et al. 2019).



Concernant les thérapies cellulaires, les premières expériences de transplantation d'hépatocytes chez des souris *Abcb4<sup>-/-</sup>* ont été menées en 2000 par De Vree et ses collègues. En effet, ils ont montré que les hépatocytes introduits chez ces souris permettent de repeupler le foie et de restaurer la sécrétion de PC dans la bile. Néanmoins, des tumeurs hépatiques sévères ont été détectées chez ces souris un an après leur transplantation (De Vree et al. 2000). Des investigations supplémentaires seraient nécessaires avant d'envisager la transplantation d'hépatocytes chez l'Homme.

## **-OBJECTIFS-**

Une des thématiques développées par l'équipe d'accueil est l'étude de la biologie et de la physiopathologie d'ABCB4. Plus spécifiquement, l'équipe étudie les mécanismes moléculaires régulant le trafic et l'activité d'ABCB4, caractérise l'effet des variations génétiques identifiées chez les patients et cherche à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour corriger les défauts moléculaires engendrés par ces variations.

Dans ce contexte, la première partie de mon projet a été consacrée à l'identification de molécules d'intérêt thérapeutique permettant de restaurer le trafic intracellulaire et la localisation membranaire de variants de classe II d'ABCB4 retenus dans le RE. Dans une stratégie de repositionnement pharmacologique, j'ai évalué l'effet de plusieurs correcteurs de CFTR sur des variants retenus d'ABCB4.

Dans la seconde partie de cette étude, j'ai abordé une question plus fondamentale visant à comprendre les mécanismes de régulation du trafic et de l'activité d'ABCB4. Par une approche protéomique visant à identifier de nouveaux partenaires moléculaires d'ABCB4, j'ai mis en évidence la petite GTPase RAB10 comme partenaire potentiel d'ABCB4. Le rôle de RAB10 dans la régulation du trafic intracellulaire et la fonction d'ABCB4 a alors été exploré.

## **-RESULTATS-**

Mes travaux de thèse sont divisés en deux parties. La première partie présente l'effet de correcteurs de CFTR sur les variants de classe II d'ABCB4, les résultats obtenus sont présentés sous forme de deux articles. La deuxième partie décrit les résultats préliminaires concernant l'identification de RAB10 comme partenaire moléculaire potentiel d'ABCB4 ainsi que le rôle de RAB10 dans la régulation du trafic et de l'activité d'ABCB4.

### **Première partie : Identification de correcteurs pour les variants d'ABCB4 de classe II**

Certaines variations d'ABCB4 affectent son trafic intracellulaire, provoquant sa rétention dans le RE et son incapacité à rejoindre la membrane canaliculaire. La variation I541F d'ABCB4, identifiée chez une jeune patiente atteinte de PFIC3, est l'une des premières variations caractérisées au niveau cellulaire (Delaunay et al. 2009). Localisée dans le premier NBD d'ABCB4, cette variation provoque une rétention intracellulaire du transporteur (Delaunay et al. 2009). Des études antérieures réalisées au sein de notre équipe ont permis de montrer que la rétention intracellulaire du variant I541F peut être partiellement levée en abaissant la température de culture à 27°C ou en traitant les cellules avec la cyclosporine A (CsA) (Delaunay et al. 2009; Gautherot et al. 2012). L'intérêt thérapeutique de la CsA était cependant limité à cause de son effet inhibiteur de la fonction d'ABCB4 (Andress et al. 2014). Dans le but d'identifier d'autres molécules correctrices et dans une stratégie de repositionnement pharmacologique, nous avons évalué l'effet de plusieurs correcteurs de CFTR sur quatre variants de classe II d'ABCB4 (I541F, I490T, R545H et L556R), précédemment identifiés chez des patients atteints de pathologies hépatiques.

Les composés testés comprennent essentiellement la roscovitine et ses analogues structuraux ainsi que d'autres composés identifiés principalement par criblage à haut débit pour le variant  $\Delta$ F508 de CFTR et obtenus auprès de la CFF (Cystic Fibrosis Foundation, Chicago, Illinois). L'efficacité de ces correcteurs candidats à corriger les déficits de trafic et de fonction des variants d'ABCB4 a été analysée par des approches biochimiques. La maturation des variants a été analysée par une approche d'immunoblot, leur localisation a été étudiée par immunofluorescence dans des modèles cellulaires polarisés d'origine hépatique

(HepG2) et leur capacité à sécréter de la PC par un test fluoro-enzymatique. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de deux articles.

Le premier article que je signe en deuxième auteur présente l'effet de la roscovitine et plusieurs analogues structuraux de cette molécule sur les variants de classe II d'ABCB4. La roscovitine, une molécule inhibitrice des protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK), a été montrée comme correctrice du trafic du variant CFTR- $\Delta$ F508 (Norez et al. 2014). Dans notre étude, cette molécule a également montré un effet correcteur significatif pour les variants retenus d'ABCB4. Elle a permis de corriger leur maturation et leur localisation. Néanmoins, dans nos modèles cellulaires, la roscovitine a montré une forte cytotoxicité ainsi qu'un effet inhibiteur sur la fonction d'ABCB4. En collaboration avec le Dr Laurent Meijer et les chimistes de ManRos Therapeutics (Roscoff, France), des analogues structuraux de la roscovitine, moins toxiques et moins inhibiteurs de l'activité d'ABCB4, ont été élaborés. De manière intéressante, trois analogues développés par ManRos Therapeutics, nommés MRT2-235, MRT2-237 et MRT2-243, ont permis de restaurer partiellement le trafic et la fonction de trois variants retenus d'ABCB4 (I541F, I490T et L556R).

Les travaux du deuxième article, que je signe en premier auteur, explorent l'effet d'autres correcteurs de CFTR sur les variants d'ABCB4. Ces correcteurs ont été majoritairement identifiés par des criblages à haut débit dans le cadre d'autres études et regroupés sous la terminologie « C » (pour correcteurs) (Spanò et al. 2019). Dans cette étude, nous avons montré que les trois composés C10, C13 et C17 ainsi que les combinaisons de C3 avec C18 ou de C4 avec C18 permettent la restauration de la maturation ainsi que la relocalisation à la membrane plasmique de quatre variants retenus d'ABCB4 (I541F, I490T, R545H et L556R). En parallèle à leur effet correcteur, un effet inhibiteur de ces molécules sur la fonction de transport de PC d'ABCB4 a été observé. Une explication possible des effets observés est l'interaction directe de ces correcteurs avec ABCB4. Par une approche de docking moléculaire *in silico*, nous avons pu déterminer trois sites potentiels de fixation de ces composés sur ABCB4.

## Articles

**Article I:** "Structural analogues of roscovitine rescue the intracellular traffic and the function of ER-retained ABCB4 variants in cell models". Vauthier *et al.* (Scientific Reports, 2019, 9(1):6653)

Page 53-69

**Article II:** "Effect of CFTR correctors on the traffic and the function of intracellularly retained ABCB4 variants". Ben Saad *et al.* (Liver International, 2020, en révision)

Page 70-118

# SCIENTIFIC REPORTS

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

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

Virginie Vauthier<sup>1</sup>, Amel Ben Saad<sup>1</sup>, Jonathan Elie<sup>2</sup>, Nassima Oumata<sup>2</sup>, Anne-Marie Durand-Schneider<sup>1</sup>, Alix Bruneau<sup>1</sup>, Jean-Louis Delaunay<sup>1</sup>, Chantal Housset<sup>1,3</sup>, Tounsia Aït-Slimane<sup>1</sup>, Laurent Meijer<sup>1</sup> & Thomas Falguières<sup>1</sup>

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

ABCB4, also called MDR3, is a member of the ATP Binding Cassette (ABC) superfamily. Its expression is mainly restricted to the canalicular membrane of hepatocytes where its function is to flop phosphatidylcholine (PC) from the inner leaflet to the outer leaflet of the plasma membrane, thus allowing its secretion into bile (for reviews, see<sup>1,2</sup>). At the molecular level, secreted PC has an essential role since it forms mixed micelles with the other co-secreted hydrophobic bile components, such as bile salts and cholesterol, as first proposed by Admirand and Small<sup>3</sup>. Indeed, impairment of PC secretion into bile leads to the formation of cholesterol crystals and gallstones, as well as loss of protection from the detergent effects of free bile salts on biological membranes of the biliary tree<sup>4,5</sup>. These clinical characteristics have been largely reported for patients with rare biliary diseases such as progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3), low-phospholipid associated cholelithiasis syndrome or intrahepatic cholestasis of pregnancy<sup>6–8</sup>. These diseases are correlated with genetic variations of the *ABCB4* gene, most of them being missense variations (see<sup>2,9,10</sup> and references therein, as well as <http://abcmutations.hegelab.org/proteinDetails?pid=63>). For patients with ABCB4-related biliary diseases, the only pharmacological treatment is the administration of ursodeoxycholic acid (UDCA), a bile acid with low hydrophobicity<sup>11</sup>. Although this therapy is efficient in the milder forms of the diseases<sup>12,13</sup>, UDCA is not – or poorly – efficient in the majority of

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

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

The effect of *ABCB4* genetic variations can be classified in five categories, as we recently proposed<sup>10</sup>: no expression of the protein (class I); intracellular retention (class II); impairment of PC secretion activity (class III); defect of protein stability at the canalicular membrane (class IV); no apparent defect (class V). The goal of this classification was to identify targeted pharmacotherapies for the different classes of ABCB4 variants in the frame of personalized medicine<sup>10</sup>. We showed that impaired PC secretion activity of class III ABCB4 variants was corrected by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/ABCC7 potentiator VX-770/Ivacaftor<sup>8,16</sup>. Concerning class II variants, cyclosporins have been shown to correct the maturation and the intracellular localisation of endoplasmic reticulum (ER)-retained variants in cell models<sup>9,17–19</sup>. However, cyclosporin A (CsA) inhibits the PC secretion activity of ABCB4<sup>19</sup>, as this is also the case for its close homologue ABCB1/MDR1<sup>20,21</sup>. This clearly indicated that new potential correctors of class II ABCB4 variants had to be sought.

In the present study, we investigated (R)-roscovitine and some newly synthesized analogues as potential correctors for ER-retained ABCB4 variants in Human Embryonic Kidney (HEK) and HepG2 cell models. (R)-roscovitine, also known as Seliciclib or CYC202 and hereafter referred to as roscovitine, is a 2,6,9-trisubstituted purine that was identified as a relatively potent and selective Cyclin-Dependent Kinase (CDK) inhibitor<sup>22–24</sup>. Roscovitine has undergone numerous studies in many indications up to clinical phase trials in various cancers, rheumatoid arthritis, glaucoma and cystic fibrosis (for a review, see<sup>24</sup>). Interestingly, roscovitine has been shown to correct the intracellular localisation and the channel activity of the F508del ER-retained variant of CFTR/ABCC7<sup>25</sup>. Here, we showed that newly synthesized roscovitine analogues correct the maturation, the canalicular expression and more importantly the function of three distinct ER-sequestered ABCB4 variants.

## Results

### Roscovitine rescues the maturation and the canalicular localisation of the I541F ER-retained ABCB4 variant.

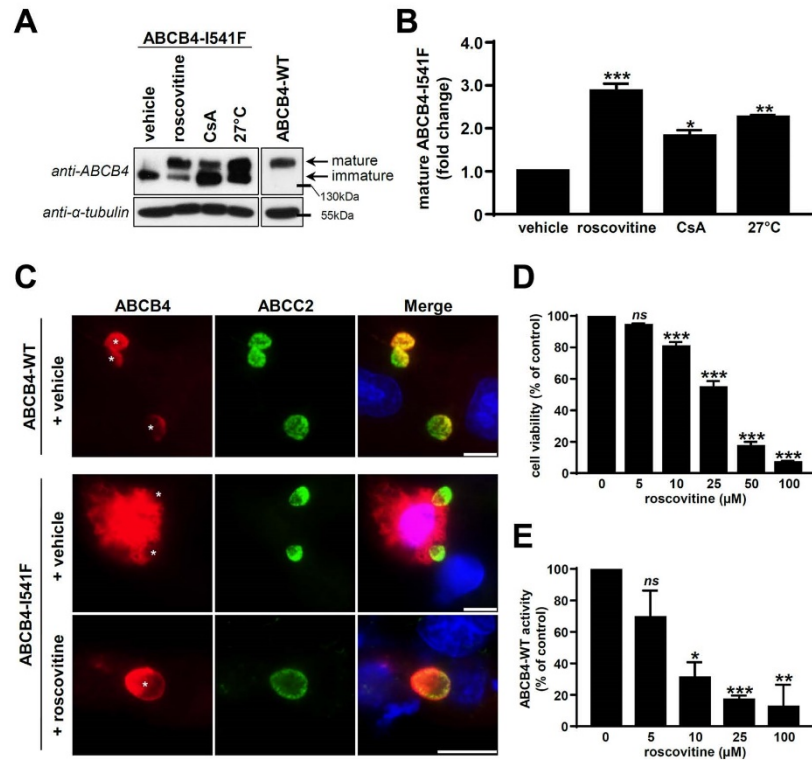
In this study, we used ABCB4-I541F, a prototypical ER-retained variant of ABCB4, first identified in a homozygous PFIC3 patient<sup>7</sup>, and further characterized in our laboratory<sup>17,26</sup>. Indeed, ABCB4-I541F has been shown to be retained in the ER as an immature and high-mannose glycosylated protein<sup>26</sup>, characterized by the absence or low abundance of a mature protein band on immunoblot, compared to the WT protein (Fig. 1A). We have previously demonstrated that the maturation and the localisation at the canalicular membrane of ABCB4-I541F could be partially rescued upon temperature shift of cell culture at 27 °C or treatment with the ABCB1/MDR1 substrate CsA<sup>17,26</sup>. Since roscovitine at 100 μM was described to correct the function of the F508del ER-retained CFTR/ABCC7 variant<sup>25</sup>, we investigated the potential correction of ABCB4-I541F by this molecule. Such treatment led to the correction of the maturation of ABCB4-I541F in HEK cells (Fig. 1A), as shown by the quantification of immunoblots (Fig. 1B). These results were confirmed by indirect immunofluorescence analyses in HepG2 cells, a hepatocellular carcinoma derived cell line forming pseudo-bile canaliculi in cell culture<sup>27</sup>. Indeed, the increased maturation of ABCB4-I541F was associated with its relocalisation at the canalicular membrane after treatment with 100 μM roscovitine in HepG2 cells (Fig. 1C). However, roscovitine displayed important dose-dependent cytotoxicity (Fig. 1D) and inhibition of ABCB4-WT-mediated PC secretion activity in HEK cells (Fig. 1E), which compromises its relevance for further investigations.

### Structural analogues of roscovitine rescue the maturation and the canalicular localisation of ABCB4-I541F.

The cytotoxic effect induced by roscovitine might be explained by its CDK inhibition activity<sup>22</sup>. We thus synthesized structural analogues (Fig. 2A) potentially devoid of this feature. Aftin-4 is a methyl-roscovitine with reduced kinase inhibition activity<sup>28,29</sup>, and M3 is the main hepatic metabolite of roscovitine. All other products are carboxylated analogues displaying much reduced kinase inhibition compared to the parent compound, roscovitine (Table 1). This indicates that carboxylation at the hydroxyl level and/or methylation at position N6 (Fig. 2A and Supplementary Fig. S1) strongly reduce CDK inhibition activity of these molecules. As expected, all roscovitine analogues with decreased CDK inhibition activity were less cytotoxic (Table 1 and Supplementary Fig. S1). Interestingly, in HEK cells, some of these analogues (MRT2-235, -237, -239, -241, -243, -245 and -249) were able to significantly increase the expression of a mature form of ABCB4-I541F while other analogues (Aftin-4, M3, MRT2-163 and MRT2-164) were not (Fig. 2B). The quantification of these results indicated a ~2.5 fold increase of expression of the mature form of ABCB4-I541F after treatment with 100 μM of the most potent roscovitine analogues (Fig. 2C). We then analysed the efficacy of the most potent analogues to correct the canalicular targeting of ABCB4-I541F in HepG2 cells. After 16 hours of treatment with 100 μM of these compounds, we observed partial relocalisation of ABCB4-I541F at bile canaliculi, as shown by its partial co-localisation with ABCC2 (Fig. 3). Altogether, these results demonstrate that the maturation and the canalicular localisation of ABCB4-I541F can be rescued by new structural analogues of roscovitine.

### Structural analogues of roscovitine are less cytotoxic and less inhibitory of ABCB4 activity than roscovitine.

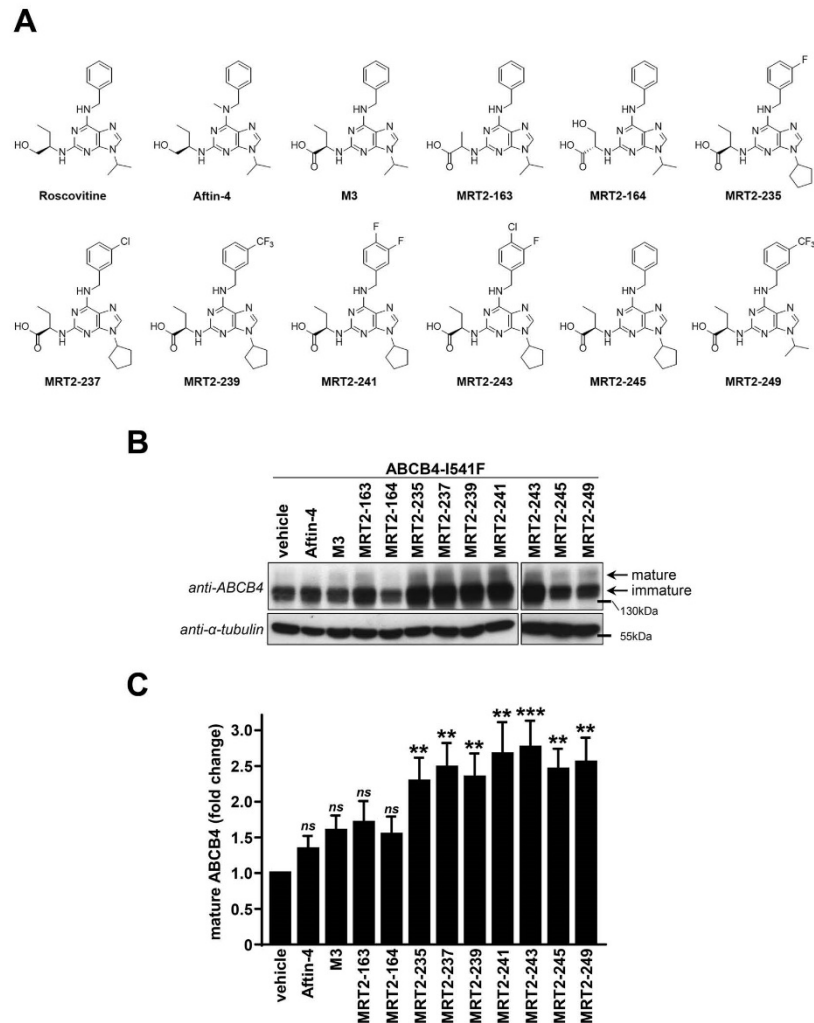
To pursue this study, we decided to focus on three roscovitine analogues (MRT2-235, MRT2-237 and MRT2-243) which displayed significant rescue of the maturation and partial relocalisation of ABCB4-I541F at bile canaliculi (Figs 2B,C and 3). At concentrations lower than 100 μM, these analogues were much less cytotoxic than roscovitine in HEK cells (Fig. 4A). Indeed, the cell viability was still higher than 80% at 25 μM of the analogues while it was reduced to less than 60% at the same concentration for roscovitine (Fig. 4A). Furthermore, measurement of ABCB4-WT-mediated PC secretion in HEK cells indicated that the three roscovitine analogues were less inhibitory than the original molecule when used at 10 μM and 25 μM (Fig. 4B). The IC<sub>50</sub> on ABCB4-WT activity was 7.5 μM for roscovitine while it was 2.5 to 4.0 fold higher for its analogues (Fig. 4C and Table 2). It is also important to notice that treatment with roscovitine and these three analogues at 10, 25 and 100 μM do not



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

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





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

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

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

**Table 1.** IC<sub>50</sub> of roscovitine and its analogues towards various protein kinases (μM). Abbreviations: CDK, cyclin-dependent kinase; CK1, casein kinase 1; CLK1, Cdc2-like kinase 1 (CLK1); DYRK1A, dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A; GSK3, glycogen synthase kinase 3B. <sup>a</sup>The activators/regulators of CDKs are indicated after the slashes: A, cyclin A; p25, T, cyclin T.

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

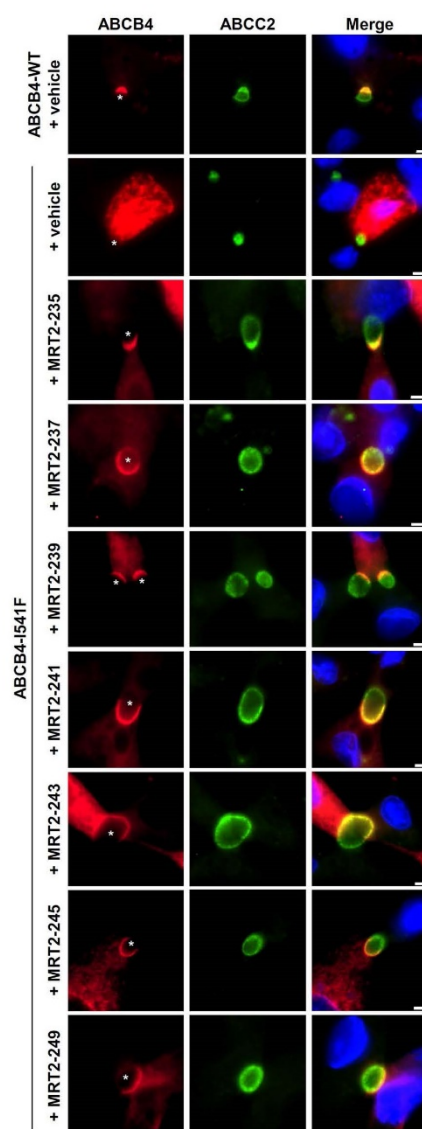
**Roscovitine analogues rescue the function of two other ER-retained ABCB4 variants.** To extend this study, we analysed the effect of roscovitine analogues on two other ER-retained missense ABCB4 variants, I490T and L556R, identified in patients with liver cancer<sup>30</sup> or PFIC3<sup>7</sup>. Without treatment, these variants were mainly detected as immature proteins by immunoblot in HEK cells (Fig. 6A,B). However, after treatment with 5 to 25 μM of the three roscovitine analogues, we observed a dose-dependent rescue of the maturation of these two variants (Fig. 6A,B), as confirmed by the quantification of these experiments (Fig. 6C,D). These results were further validated by indirect immunofluorescence assays in HepG2 cells: both I490T and L556R variants were partially relocalised at bile canaliculi upon treatment with 25 μM of MRT2-235, MRT2-237 or MRT2-243 (Fig. 6E,F). As expected, the PC secretion activity of these two ER-retained variants in HEK cells was strongly impaired in vehicle-treated cells (Fig. 6G,H). However, after treatment with 25 μM of the three roscovitine analogues, we observed a significant increase of the residual activity of these variants (Fig. 6G,H). These results provide evidence that roscovitine analogues are able to rescue the localisation, the maturation and the PC secretion activity of several ER-retained ABCB4 variants.

## Discussion

PFICs and hereditary cholestatic diseases in general represent a considerable fraction of indications for liver transplantation<sup>31,32</sup>. In the absence of surgery and efficient pharmacological treatment able to cure patients, or at least to delay liver transplantation, the life expectancy is low<sup>33</sup>. Roscovitine has been shown to partially rescue intracellular traffic and chloride channel activity of CFTR-F508del<sup>25</sup>. Thus, in this work, we investigated the possibility to repurpose this molecule in the frame of ABCB4-related diseases. While we observed that roscovitine was able to correct maturation and localisation of the ER-retained ABCB4-I541F variant in cell models, its important cytotoxicity and inhibition of ABCB4-WT function ruled out its use for further analyses. We then synthesized structural analogues of roscovitine, devoid of intrinsic CDK inhibition capacity (Table 1). Interestingly, three of these analogues (MRT2-235, MRT2-237 and MRT2-243) were less cytotoxic and less inhibitory of ABCB4-WT activity than the original molecule, and allowed partial rescue of the maturation and the localisation of distinct ER-retained ABCB4 variants. More importantly, these corrections were associated with a significant rescue of PC secretion for these variants. Thus, roscovitine analogues may be considered as good candidates in preclinical studies.

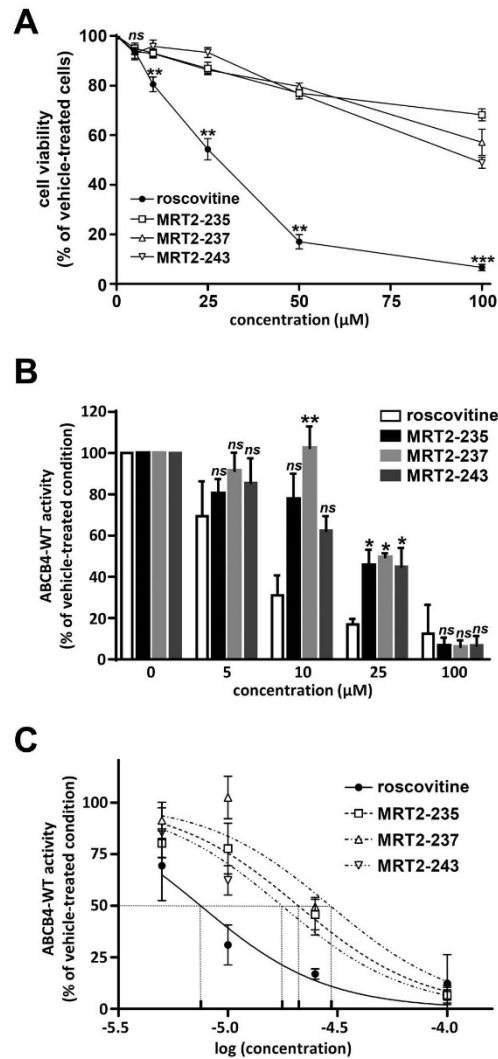
We and others have previously shown that cyclosporins, essentially CsA, are able to rescue the maturation and the cell surface localisation of ABCB4 defective variants<sup>8,17-19</sup>. However, until now, attempts to rescue functional ABCB4 variants using substrates and/or inhibitors of ABCB1 such as CsA, FK506/Tacrolimus or Tariquidar were not successful (<sup>18</sup>; our unpublished data), strengthening the requirement for developing new targeted pharmacotherapies. Here, we provide evidence that roscovitine analogues are efficient correctors of the intracellular traffic as well as the function of ER-retained ABCB4 variants. The chemical chaperone 4-phenylbutyrate, already used in clinics<sup>34,35</sup>, has been shown to rescue other ER-retained ABCB4 variants<sup>36</sup>, as well as defective variants of different ABC transporters (<sup>10</sup> and references therein). However, for patients who do not respond or comply to this therapy, or develop major side effects<sup>37,38</sup>, roscovitine analogues may constitute good alternatives in the frame of personalized medicine.

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



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

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

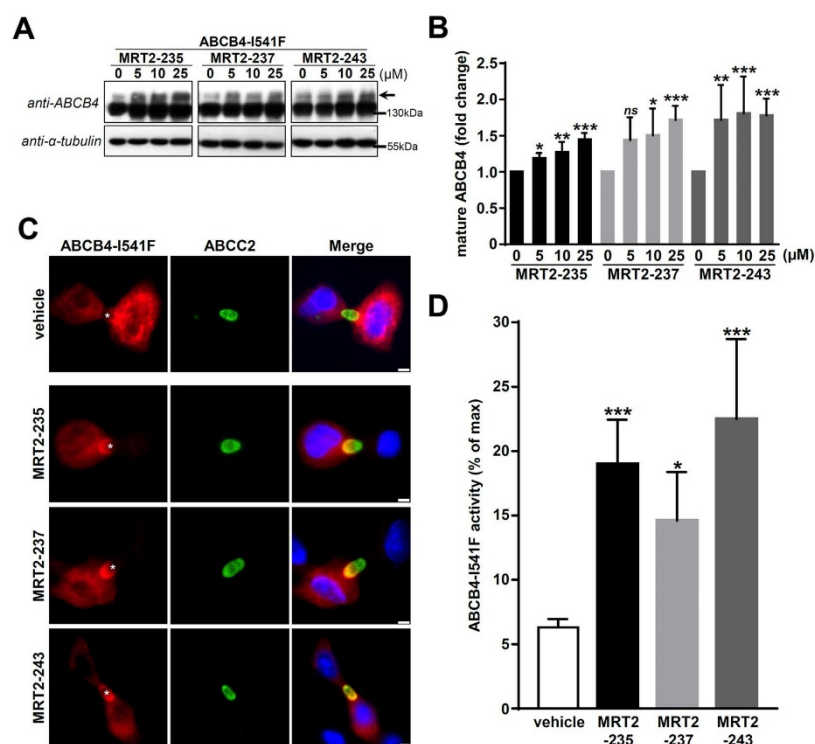


**Figure 4.** Roscovitine analogues are less cytotoxic and less inhibitory of ABCB4 activity than roscovitine. **(A)** After treatment with increasing concentrations of the indicated compounds during three days, cell viability was determined and expressed as in Fig. 1D. Means ( $\pm$ SEM) of at least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

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

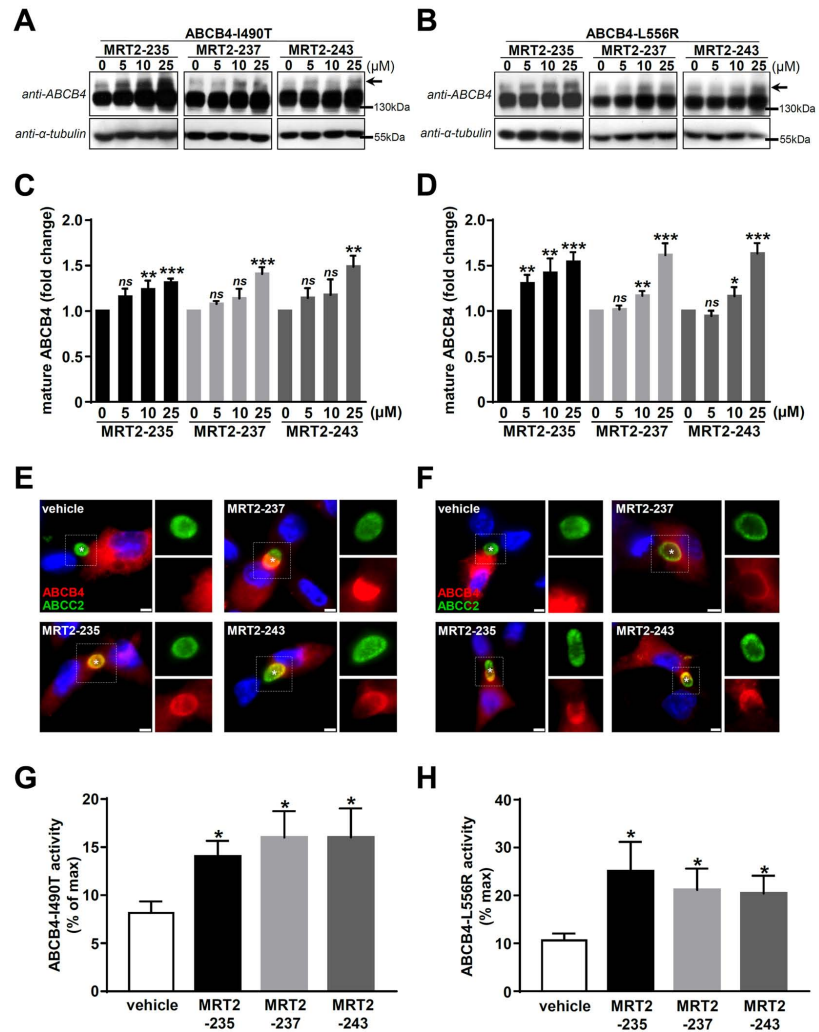
Compounds	Roscovitine	MRT2-235	MRT2-237	MRT2-243
log IC <sub>50</sub>	-5.124 ± 0.078	-4.678 ± 0.086	-4.533 ± 0.092	-4.754 ± 0.084
IC <sub>50</sub> (μM) (min max)	7.51 (5.49-10.28)	20.97 (14.87-29.62)	29.31 (20.30-42.32)	17.63 (12.60-24.64)

**Table 2.** IC<sub>50</sub> of roscovitine and its analogues on the PC secretion activity of ABCB4-WT. IC<sub>50</sub> were calculated from dose-response curves shown in Fig. 4C.



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

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



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

does not prevent rescue of ER-retained ABCB4 variants. Moreover, the presence of a cyclopentyl at position 9 and substitutions (F, Cl, CF3) seem to contribute to the ABCB4 rescuing efficacy of the analogues. Although roscovitine has been reported to partially correct CFTR-F508del function<sup>25</sup>, we did not observe such effect on ABCB4-I541F. These results may illustrate the difference of molecular mechanisms between the floppase activity of ABCB4 and the chloride channel function of CFTR. However, here, we provide evidence that roscovitine analogues are able to partially correct the function of ER-retained ABCB4 variants even if the mechanisms of their cell entry, passive diffusion or active uptake are not yet characterized. This opens the perspective to the use of these and related compounds as targeted pharmacotherapies for patients with ABCB4-related diseases.

The research of pharmacological therapies for ABCB4-related diseases as alternatives to liver transplantation is mainly focused on PFIC3, the most severe form of these diseases, for which the majority of homozygous or compound heterozygous patients have defects in both *ABCB4* alleles (for a review, see<sup>43</sup>). PC concentrations in bile of PFIC3 patients are very low due to a strongly impaired ABCB4 activity<sup>7</sup>. Thus, targeting patients harbouring this category of genetic variations using roscovitine analogues could be a promising therapeutic strategy in order to improve PC secretion into bile. Indeed, it has been proposed that patients with enough residual ABCB4 activity ( $\geq 7\%$ ), are better responders to UDCA therapy<sup>42</sup>, as this is the case for patients with milder forms of ABCB4-related diseases such as low-phospholipid associated cholelithiasis syndrome and intrahepatic cholestasis of pregnancy<sup>41–44</sup>. It is thus tempting to speculate that the partial rescue of ABCB4 function using roscovitine analogues would be sufficient for patients to positively respond to UDCA therapy. It is also interesting to note that UDCA treatment may contribute to the relocalisation of ABCB4 at the canalicular membrane of hepatocytes in *in vivo* systems, as proposed for ABCB11 and ABCB2 in cholestatic rat models<sup>45,46</sup> and ABCB11 in PFIC2 patients<sup>47</sup>.

The effect of roscovitine are currently evaluated in preclinical and clinical trials in the frame of several pathologies<sup>48</sup>, including a recent phase 2 clinical trial in patients with cystic fibrosis (ROSCO-CF; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02649751>). The results obtained from these studies would allow to consider the repositioning of roscovitine, and more especially its more potent structural analogues, to treat ABCB4-related rare biliary diseases.

## Materials and Methods

**DNA constructs and mutagenesis.** The subcloning of wild type (WT) ABCB4, isoform A (NM\_000443.3), into pCDNA3 vector has been described<sup>26</sup>. The I541F, I490T and L556R missense ABCB4 variants were previously reported and described<sup>9,26,49</sup>. Site directed mutagenesis were performed using the QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies, Les Ulis, France), following manufacturer's instructions, and using the primers (Eurogentec, Angers, France) described in Supplementary Table S1. The sequences of all constructs were systematically verified by automated sequencing.

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

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

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

Protein kinases and their activators or regulators (see Table 1) were expressed and purified, and their catalytic activity was assayed in the presence of a range of concentrations of each roscovitine analogue, as previously described<sup>28,29,40</sup>. IC<sub>50</sub> values were calculated from the dose-response curves.

**Immunoanalyses.** Western blots and indirect immunofluorescence were performed as previously described<sup>9,50</sup>. For immunoblot analyses, total cell lysates were prepared in denaturing and reducing sample buffer<sup>51</sup>, separated on 7.5% SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes using Trans-Blot system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Saturated membranes were incubated with mouse monoclonal anti-ABCB4 (clone P<sub>3</sub>II-26; Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France) or anti- $\alpha$ -tubulin (clone 1E4C11; ProteinTech, Manchester, United Kingdom) antibodies and then with peroxidase conjugated anti-mouse secondary antibodies (Sigma). Signals were detected with ECL prime western blotting detection reagent (GE Healthcare,

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

For indirect immunofluorescence, HepG2 cells were grown on glass coverslips and after transfection and treatments, they were fixed and permeabilized during 1 min at  $-20^{\circ}\text{C}$  in ice-cold methanol. Then ABCB4 and ABCB2 were immunolabelled using the mouse monoclonal P<sub>2</sub>II-26 (IgG2b) and M<sub>2</sub>I-4 (IgG1) antibodies (Enzo Life Sciences), respectively. AlexaFluor<sup>®</sup> 555 and AlexaFluor<sup>®</sup> 488 conjugated isotype-specific secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific) and Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) were used to label ABCB4, ABCB2 and nuclei, respectively. Images were acquired using an IX83 inverted fluorescence microscope from Olympus (Rungis, France), equipped with a UPLSAPO 60XS2 silicone immersion objective and a Hamamatsu ORCA Flash4.0 digital CMOS camera, and analysed using Olympus CellSens Dimension Desktop version 1.16 and Adobe Photoshop version 8.0.1. For each experiment, all images were acquired with constant settings (acquisition time and correction of signal intensities).

**Cell viability assays.** Cell viability was assessed by the conversion of MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) into formazan crystals by living cells, as described<sup>52</sup>. In brief, HEK cells were seeded in 96-well plates in triplicate for each tested condition, including controls (no cells, no treatment, treatment with vehicle). After transient expression of ABCB4-WT as described above (to mimic the experimental conditions of the other experiments) and drug treatment during 72 hours, 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  MTT (final concentration) was added in each well and cells were re-incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  during 2 hours. These conditions were optimized in order to maintain the absorbance at 540 nm of the blanks below 0.1 OD unit (negative controls) and the absorbance at 540 nm for untreated cells between 1.0 and 1.3 OD units (positive controls). Then culture media were gently washed out, cells were lysed in 100  $\mu\text{L}$  of pure DMSO and absorbance at 540 nm was measured using a multiplate cytofluorimeter SpectraFluor from Tecan (Männedorf, Switzerland). Cell viability was calculated for each triplicate after background subtraction and expressed as percentage of the mean for cells treated with vehicle only.

**Measurement of ABCB4-mediated phosphatidylcholine secretion.** HEK cells were seeded in 0.01% poly-L-lysine (Sigma) pre-coated 6-well plates of 10  $\text{cm}^2$  area per well ( $1.3 \times 10^6$  cells per well). After transient transfection of the empty vector (control), plasmids encoding ABCB4-WT or its variants, cells were incubated during 24 hours at  $37^{\circ}\text{C}$  in serum-free medium supplemented with 0.5 mM sodium taurocholate (Sigma) and 0.02% fatty acid-free bovine serum albumin (Sigma). Then, the secreted PC was quantified from the collected media using a fluoro-enzymatic assay previously described<sup>50</sup>. Each condition was analysed in triplicate, after background subtraction, and results were normalized to the expression levels of ABCB4 determined by immunoblots of the corresponding cell lysates.

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

#### Data Availability

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

#### References

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



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

## Acknowledgements

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

### Author Contributions

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

### Additional Information

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

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

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



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

© The Author(s) 2019

# SUPPLEMENTARY INFORMATION

-----

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

Virginie Vauthier<sup>1</sup>, Amel Ben Saad<sup>1</sup>, Jonathan Elie<sup>2</sup>, Nassima Oumata<sup>2</sup>, Anne-Marie  
Durand-Schneider<sup>1</sup>, Alix Bruneau<sup>1</sup>, Jean-Louis Delaunay<sup>1</sup>, Chantal Housset<sup>1,3</sup>, Tounsia  
Aït-Slimane<sup>1</sup>, Laurent Meijer<sup>2</sup>, Thomas Falguières<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm, Sorbonne Université, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), UMR\_S 938,  
Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), F-75012 Paris, France.

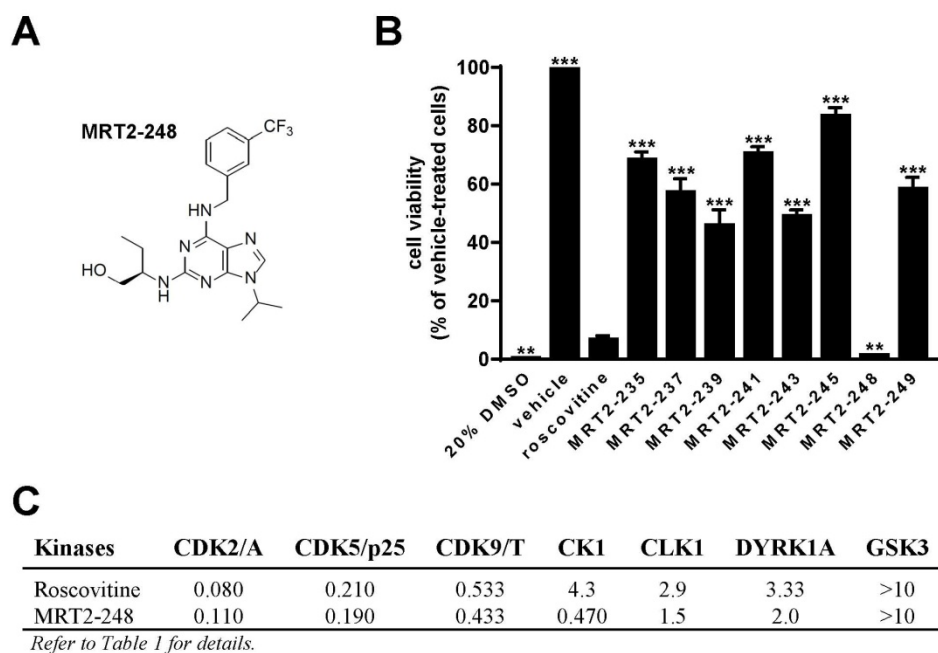
<sup>2</sup> ManRos Therapeutics, Hôtel de Recherche, Centre de Perharidy, F-29680 Roscoff, France.

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

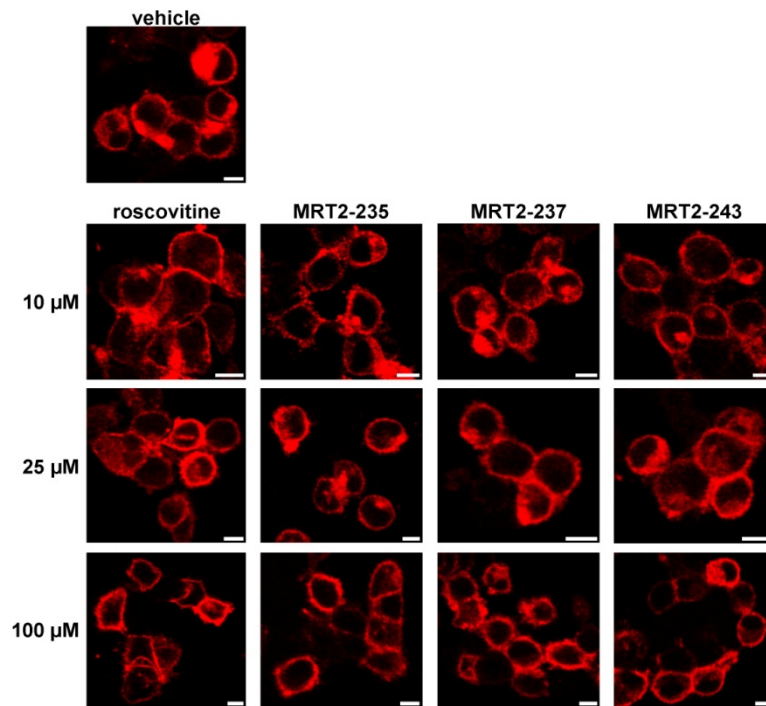
\* **Corresponding author:** Thomas Falguières, PhD – Saint-Antoine Research Center, UMR\_S 938  
Inserm / Sorbonne Université – 27, rue Chaligny – F-75571 Paris cedex 12, France. Phone : +33-  
(0)1-40-01-13-69. Fax: +33-(0)1-40-01-14-32. e-mail: [thomas.falguieres@inserm.fr](mailto:thomas.falguieres@inserm.fr)

**Supporting Table S1.** Primers used for *ABCB4* mutagenesis

Variants		Sequence(5'>3')
I490T	Sense	GTTTCCACCACAATTGCTGAAAATACTTGTTATGGCCGTG
	antisense	CACGGCCATAACAAGTATTTTCAGCAATTGTGGTGGAAAAC
I541F	sense	GGTGGGCAGAAGCAGAGGTCGCCATTGCACGTGCC
	antisense	GGCACGTGCAATGGCGAACCTCTGCTTCTGCCACC
L556R	sense	CAAGATCCTTCTGCGGGATGAGGCCAC
	antisense	GTGGCCTCATCCCGCAGAAGGATCTG



**Fig. S1. Cell viability assays after treatment with roscovitine analogues.** **A.** Structure of MRT2-248. Note that this analogue is the non-carboxylated version of MRT2-249 (see Fig. 2A). **B.** After transient expression of ABCB4-WT, HEK cells were treated with 100 $\mu$ M of the indicated molecules, the vehicle (DMSO) or 20% DMSO (positive control of cell death) during three days. Then, cell viability was assessed by MTT assay and expressed as a percentage of the mean for vehicle-treated cells. Means ( $\pm$  SEM) of four independent experiments performed in triplicate are shown. Statistics indicate the comparison between the roscovitine treatment and the other conditions: \*\* $P$  < 0.01; \*\*\* $P$  < 0.001. **C.** IC<sub>50</sub> of protein kinases after treatment with MRT2-248, as shown in Table 1 for other roscovitine analogues. Values for roscovitine are shown for comparison. Note that treatment with non-carboxylated molecules, *i.e.* roscovitine and MRT2-248, are strong CDK inhibitors and lead to massive cell death.



**Fig. S2. Roscovitine and its analogues do not modify plasma membrane localisation of ABCB4-WT in HEK cells.** After transient expression of ABCB4-WT, HEK cells were treated with the indicated concentrations of roscovitine, MRT2-235, MRT2-237 or MRT-243 as in Fig. 4B. After fixation and permeabilization of the cells, localization of ABCB4-WT (red) was assessed by indirect immunofluorescence and confocal microscopy. This figure is representative of three independent experiments. Bars: 5 μm.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

## Effect of CFTR correctors on the traffic and the function of intracellularly retained ABCB4 variants

Amel Ben Saad<sup>1,2</sup>, Virginie Vauthier<sup>2,3</sup>, Ágota Tóth<sup>4</sup>, Angelika Janaszekiewicz<sup>4</sup>,

Anne-Marie Durand-Schneider<sup>2</sup>, Alix Bruneau<sup>2,5</sup>, Jean-Louis Delaunay<sup>2</sup>,

Martine Lapalus<sup>1</sup>, Elodie Mareux<sup>1</sup>, Isabelle Garcin<sup>1</sup>, Emmanuel Gonzales<sup>1,6</sup>,

Chantal Housset<sup>2,7</sup>, Tounsia Aït-Slimane<sup>2</sup>, Emmanuel Jacquemin<sup>1,6</sup>, Florent Di Meo<sup>4</sup>,

Thomas Falguières<sup>1,\*</sup>

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

<sup>1</sup> Inserm, Université Paris-Saclay, Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie, UMR\_S 1193, Hepatinov, 91400 Orsay, France.

<sup>2</sup> Inserm, Sorbonne Université, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), UMR\_S 938, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), 75012 Paris, France.

<sup>3</sup> Current address: Université de Paris, Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, 75014 Paris, France.

<sup>4</sup> Inserm, Université de Limoges, Faculté de Médecine et de Pharmacie, UMR 1248, Campus Marcland, 87000 Limoges, France.

<sup>5</sup> Current address: Department of Hepatology & Gastroenterology, Charité Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany.

<sup>6</sup> Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paediatric Hepatology & Paediatric Liver Transplant Department, Reference Center for Rare Paediatric Liver Diseases, FILFOIE, ERN Rare-Liver, Faculté de Médecine Paris-Saclay, CHU Bicêtre, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France.

<sup>7</sup> Assistance Publique - Hôpitaux de Paris. Hôpital Saint-Antoine, Reference Center for inflammatory biliary diseases and autoimmune hepatitis, FILFOIE, ERN Rare-Liver, 75012 Paris, France.

<sup>54</sup>  
<sup>55</sup>  
<sup>56</sup>  
<sup>57</sup>  
<sup>58</sup>  
<sup>59</sup>  
<sup>60</sup>

\* **Corresponding author:** Thomas Falguières, PhD – UMR\_S 1193 Inserm / Université Paris Saclay – Rue des Adèles – Bâtiment 440 – F-91405 Orsay cedex, France. Phone : +33-(0)1-69-15-62-94. e-mail: [thomas.falguieres@inserm.fr](mailto:thomas.falguieres@inserm.fr)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Text electronic word count:** 4936 words.

**Figures:** 5

**Supplementary information:** Supplementary Materials and Methods, 6 tables, 3 figures and Supplementary references.

**Authorship statement:** A.B.S., V.V. and T.F. designed the study. A.B.S., V.V., Á.T., A.J., A.M.D.S. and T.F. performed the experiments. A.B.S., V.V., Á.T., A.J., A.M.D.S., A.B., J.L.D., M.L., E.M., I.G., E.G., C.H., T.A.S., E.J., F.D.M. and T.F. analysed the data and provided intellectual contribution. A.B.S., F.D.M. and T.F. wrote the manuscript, which was reviewed and approved by all authors.

**Abbreviations:** ABC, ATP-binding cassette; ABCB4<sup>cc</sup>, ABCB4-closed conformation; ABCB4<sup>if</sup>, ABCB4-inward facing conformation; ATP, adenosine triphosphate; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; Cp, coupling helix; ER, endoplasmic reticulum; HEK, human embryonic kidney; NBD, nucleotide binding domain; PC, phosphatidylcholine; PFIC3, progressive familial intrahepatic cholestasis type 3; TM, transmembrane helix; UDCA, ursodeoxycholic acid; WT, wild type.

**Conflict of interest:** None to declare.

**Financial support:** A.B.S. and E.M. were supported by the « Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ». T.F. was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE14-0008-01) and the French Association for the Study of the Liver (AFEF). Á.T., A.J. and F.D.M. were supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE17-0020-01 IMOTEP), Région Nouvelle Aquitaine and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (AAP NA 2019 VICTOR).



1  
2  
3 **Acknowledgements:** We are grateful to the Cystic Fibrosis Foundation (<https://www.cff.org/>)  
4  
5 and the CFTR Chemical Compound Program (<https://www.cff.org/Research/Researcher-Resources/Tools-and-Resources/CFTR-Chemical-Compound-Program/>) for providing CFTR  
6  
7 correctors. We thank AMFE (Association Maladie Foie Enfants, Malakoff, France), MLD  
8  
9 (Monaco Liver disorder, Monaco), Association “Pour Louis 1000 Foie Merci” (Fournet-  
10  
11 Luisans, France), Association “Il était un foie” (Plouescat, France) and Fondation Rumsey-  
12  
13 Cartier (Genève, Switzerland) for their support. We also thank Wadih Ghattas and Charles  
14  
15 Skarbek (Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d’Orsay, Université Paris-Saclay,  
16  
17 Orsay, France) for their help with multiplate fluorescence reading. We are grateful to regional  
18  
19 supercomputer CALI (“CALcul en Limousin”) and Xavier Montagutelli for technical support.  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## ABSTRACT

**Background & aim:** ABCB4 is expressed at the canalicular membrane of hepatocytes. This ATP-binding cassette (ABC) transporter is responsible for the secretion of phosphatidylcholine into bile canaliculi. Missense genetic variations of ABCB4 are correlated with several rare cholestatic liver diseases, the most severe being progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3). In a repurposing strategy to correct intracellularly retained ABCB4 variants, we tested 16 compounds previously validated as cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) correctors.

**Methods:** The maturation, intracellular localization and activity of intracellularly retained ABCB4 variants were analyzed in cell models after treatment with CFTR correctors. In addition, *in silico* molecular docking calculations were performed to test the potential interaction of CFTR correctors with ABCB4.

**Results:** We observed that the correctors C10, C13 and C17, as well as the combinations of C3+C18 and C4+C18, allowed the rescue of maturation and canalicular localization of four distinct traffic-defective ABCB4 variants. However, such treatments did not permit a rescue of the phosphatidylcholine secretion activity of these defective variants and were also inhibitory of the activity of wild type ABCB4. *In silico* molecular docking analyses suggest that these CFTR correctors might directly interact with transmembrane domains and/or ATP-binding sites of the transporter.

**Conclusion:** Our results illustrate the uncoupling between the traffic and the activity of ABCB4 since the same molecules can rescue the traffic of defective variants while they inhibit the secretion activity of the transporter. We expect that this study will help to design new pharmacological tools with potential clinical interest.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## KEYWORDS

ABC transporters; Bile secretion; Cell models; Cholestatic liver diseases; Molecular docking;  
Targeted pharmacotherapy.

## LAY SUMMARY

- CFTR correctors rescue the maturation and the localization of four distinct ER-retained ABCB4 variants identified in patients.
- CFTR correctors do not rescue the function of these variants even if they are relocalized at the plasma membrane.
- CFTR correctors inhibit the function of wild type ABCB4.
- *In silico* molecular docking analyses suggest direct interactions of CFTR correctors with functional domains of ABCB4.

## INTRODUCTION

Bile secretion is an essential function of the liver for the elimination of xenobiotics and endogenous metabolites. This function mainly depends on transporters localized at the apical (or canalicular) plasma membrane of hepatocytes such as ATP-binding cassette subfamily B member 4 (ABCB4), also known as multidrug resistance protein type 3 (MDR3). ABCB4 belongs to the superfamily of ATP-binding cassette (ABC) transporters which are transmembrane proteins able to bind and hydrolyze ATP in order to fulfil their biological functions<sup>1,2</sup>. The expression of ABCB4 is restricted to the canalicular membrane of hepatocytes<sup>3</sup> and its role is to ensure secretion of phosphatidylcholine (PC) into bile<sup>4</sup>. With the co-secreted cholesterol and bile salts, PC forms mixed micelles in the aqueous environment of bile, thus avoiding the formation of cholesterol gallstones in the biliary tract as well as cell membrane damage by free bile acids on the canalicular membrane of hepatocytes and the apical membrane of cholangiocytes (for reviews, see<sup>1,5</sup>). Until now, more than 220 distinct variations of the ABCB4-encoding gene have been reported, mostly in patients with cholestasis and cholelithiasis (see <https://evs.gs.washington.edu/EVS/> and <http://abcmutations.hegelab.org/>). These genetic variations of ABCB4 can affect the expression, the traffic, the function or the stability of the protein. Indeed, we have already proposed a classification of these variants into five distinct classes: class I with no protein expression, class II with intracellular retention; class III with functional defects, class IV with stability impairment and class V with no apparent defect<sup>6,7</sup>.

The most severe ABCB4-related disease is progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3), which is a rare autosomal recessive disease affecting homozygous or compound heterozygous patients during childhood<sup>8</sup>. PFIC3 appears during the first months of life and is characterized by chronic cholestasis, jaundice and pruritus<sup>9</sup>. The only pharmacological

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

treatment for PFIC3 patients is the administration of ursodeoxycholic acid (UDCA), a bile acid with low hydrophobicity which renders the bile less toxic<sup>10,11</sup>. However, more than half of PFIC3 patients display no or little response to UDCA treatment and worsening of the disease most often requires liver transplantation<sup>9,12</sup>. Therefore, the therapeutic challenge is to identify new targeted pharmacotherapies as an alternative to liver transplantation for patients with severe forms of ABCB4-related diseases.

Looking for correctors of class II endoplasmic reticulum (ER)-retained ABCB4 variants, we have recently shown that structural analogues of roscovitine are able to partially rescue the traffic, localization and function of these variants<sup>13</sup>. In the present study, in order to pursue this repositioning strategy, we were interested in correctors previously shown to rescue the plasma membrane targeting of the F508del variant of ABCC7/CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), the ABC transporter mutated in patients with cystic fibrosis (see Supplementary Table S1, and references therein). While we observed that CFTR correctors are able to rescue the maturation and the localization of several ER-retained ABCB4 variants, we report that they are not able to rescue their PC secretion activity and that they also inhibit the activity of the wild type transporter. These two effects might be due to direct interactions of CFTR correctors with functional domains of ABCB4 such as transmembrane domains and/or nucleotide binding domains, as suggested by *in silico* molecular docking calculations.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmids, cell culture and transfection

Plasmids encoding WT and ER-retained ABCB4 missense variants (I541F, I490T, L556R) have been described<sup>13-15</sup>. The R545H variant was previously reported<sup>16</sup> and site-directed mutagenesis was performed as described<sup>13</sup> using the following primers (Eurogentec, Angers, France): 5'- GATCGCCATTGCACATGCCCTGGTTCGCA-3'(forward) and 5'- TGCGAACCAGGGCATGTGCAATGGCGATC-3' (reverse). Human embryonic kidney (HEK-293, herein referred to as HEK; ATCC®-CRL-1573™) cells and human hepatocellular carcinoma HepG2 (ATCC®- HB-8065™) cells were obtained from ATCC (Manassas, VA). Cells were grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France) containing 4.5 g/L D-glucose and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), 2 mM L-glutamine, 2 mM sodium pyruvate, 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific). Transient transfections were performed using Turbofect (Thermo Fisher Scientific) at a ratio of reagent:DNA of 2:1 for HEK cells, and JetPrime (PolyPlus Transfection, Illkirch, France) at a ratio of reagent:DNA of 2:1 for HepG2 cells, according to manufacturers' instructions.

### Chemicals and cell treatments

CFTR correctors (see details in Supplementary Table S1) were kindly provided by the CFTR Chemical Compound Program of the Cystic Fibrosis Foundation (Chicago, IL). All compounds were solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) as 1000X concentrated stock solutions in order to treat cells with 10 µM final concentration, using DMSO as control vehicle at the same

1  
2  
3 dilution (0.1% DMSO for all conditions). Twenty-four hours post-transfection (except for  
4  
5 cytotoxicity assays), cells were treated during 16 hours with these drugs. After drug treatment,  
6  
7 cells were used for cytotoxicity assays, immunoanalyses, or PC secretion assays.  
8  
9

### 10 11 12 13 14 **Cytotoxicity assays** 15

16  
17 Cytotoxicity of CFTR correctors was assessed by the conversion of MTT (3-[4,5-  
18 dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide; Sigma) into formazan crystals by  
19 living cells, as described<sup>17</sup>. In brief, subconfluent HEK cells were plated in 96-well plates in  
20 triplicate for each tested condition, including controls (no cells, treatment with vehicle only).  
21  
22 Eight hours after cell seeding and 16 hours after drug treatment, 125 µg/mL MTT (final  
23 concentration) was added in each well and cells were re-incubated at 37°C for 2 hours. Then  
24 culture media were gently washed out, cells were lysed in 100 µL of DMSO and absorbance at  
25 540 nm was measured using a multiplate cytofluorimeter SpectraFluor from Tecan (Männedorf,  
26 Switzerland). Cytotoxicities were calculated for each triplicate and after background  
27 subtraction, means were expressed as percentages of the mean for cells treated with vehicle  
28 only.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

### 47 **Immunoblots, immunofluorescence and measurement of ABCB4-mediated** 48 **phosphatidylcholine secretion** 49

50  
51  
52 Immunoblots and indirect fluorescence analyses were performed as previously described<sup>13</sup>,  
53 using the following primary antibodies: mouse monoclonal anti-ABCB4 (clone P<sub>3</sub>II-26) and  
54 anti-ABCC2 (clone M2I-4) from Enzo Life Sciences (Villeurbanne, France); anti- $\alpha$ -tubulin  
55 (clone 1E4C11) from ProteinTech (Manchester, United Kingdom). Peroxidase- and  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 fluorochrome-conjugated secondary antibodies were from Sigma and Thermo Fisher Scientific,  
4  
5 respectively. Immunoblots were quantified in the linear range of detection using ImageJ 1.50i  
6  
7 software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD). Immunofluorescence images were  
8  
9 acquired using a confocal microscope (Eclipse TE-2000-Nikon-C2) equipped with a 60X  
10  
11 objective, serial xy optical sections with a z-step of 0.3  $\mu\text{m}$  were taken using Nikon NIS-  
12  
13 Elements software version AR 4.50 with constant settings (laser powers and correction of signal  
14  
15 intensities) and treated using Adobe Photoshop version 8.0.1. Measurement of ABCB4-  
16  
17 mediated PC secretion using a fluoro-enzymatic assay was performed as described<sup>13</sup>. Each  
18  
19 condition was analysed in triplicate and, after background subtraction, results were normalized  
20  
21 to the expression levels of mature ABCB4 (determined from immunoblots) and expressed as  
22  
23 percentages of wild type ABCB4 (ABCB4-WT) activity.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

### 32 ***In silico* molecular docking and calculations**

33  
34  
35  
36 Two conformations of human ABCB4 (*h*ABCB4) were considered for molecular docking  
37  
38 calculations, namely inward-facing and closed conformations (ABCB4<sup>if</sup> and ABCB4<sup>cc</sup>,  
39  
40 respectively). ABCB4<sup>if</sup> was built by homology modelling using the inward-facing human  
41  
42 ABCB1 (*h*ABCB1) protein data bank structure (PDB ID: 6QEX)<sup>18</sup>, given the high sequence  
43  
44 identity between *h*ABCB1 and *h*ABCB4 (76.8%, see Supplementary Figure S1). ABCB4<sup>cc</sup>  
45  
46 model was built using the recently resolved cryo-EM structure of ABCB4<sup>cc</sup> structure trapped  
47  
48 in ATP-bound state (PDB ID: 6S7P)<sup>19</sup>. The non-resolved extracellular loop (residues 85-104)  
49  
50 of ABCB4<sup>cc</sup> was built based on the resolved *h*ABCB1 structure. For both models, L<sub>1</sub>-linker  
51  
52 connecting nucleotide binding domain (NBD) 1 to transmembrane helix (TM) 7, and the N-  
53  
54 and C-terminal domains were not included in the present study owing to their absence in both  
55  
56 resolved *h*ABCB1 and *h*ABCB4 structures (Supplementary Figure S1). Present models did not  
57  
58  
59  
60



1  
2  
3 include the ATP molecules. Homology modeling were performed using the Modeller software  
4  
5 version 9.23<sup>20-22</sup>. Prior to docking calculations, both models were minimized in solvated  
6  
7 membrane lipid bilayers that were removed for docking calculations (for further details, see  
8  
9 *Supplementary Materials and Methods*).

10  
11  
12  
13 Molecular docking calculations were carried out using the Autodock Vina software<sup>23</sup>. Given  
14  
15 the absence of *a priori* knowledge about the interaction mechanism of CFTR correctors, the  
16  
17 following procedure was performed to extensively sample plausible binding sites of CFTR  
18  
19 correctors to both ABCB4<sup>if</sup> and ABCB4<sup>cc</sup> conformers. First, so-called “blind” docking  
20  
21 calculations were performed with all ligands in which the whole protein was considered as  
22  
23 intentionally too large volume search space centered on the protein center of mass for both  
24  
25 ABCB4<sup>if</sup> and ABCB4<sup>cc</sup> conformations (Supplementary Table S2A). A set of 20 replicas per  
26  
27 CFTR corrector was performed, using different random seeds, providing a total of  
28  
29 approximately 6400 poses per ABCB4 conformation. These molecular poses exhibited clusters  
30  
31 located at different spatial regions (see Supplementary Figure S2). Refined docking calculations  
32  
33 were then performed in which smaller space search volumes were used, which do not exceed  
34  
35 the recommended search volume of 27 000 Å<sup>3</sup> to ensure the reliability of docking calculation  
36  
37 results. Again, 20 replicas of refined molecular docking calculations were performed for each  
38  
39 CFTR corrector. For blind and refined docking calculations, exhaustiveness was set to 40 and  
40  
41 100, respectively, in order to increase the computational effort used during molecular pose  
42  
43 search<sup>24</sup>. The maximum number of poses was set to 100 by replica and the initial affinity cutoff  
44  
45 was defined at 15 kcal.mol<sup>-1</sup> with respect to the top pose of a given replica. The list of flexible  
46  
47 residues allowed for each volume search space is reported in Supplementary Table S2B. Given  
48  
49 the large number of plausible flexible residues, only sidechain C<sub>β</sub>-C<sub>γ</sub> bonds were allowed to  
50  
51 rotate as a compromise within the limit of 32 rotatable bonds allowed by Autodock Vina  
52  
53 software.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Additional information is provided in Supplementary Materials and Methods.

### Statistics

Graphics and one-way ANOVA tests were performed using Prism version 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA). A *P* value of less than 0.05 was considered significant with \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.005$ ; ns: not significant. Symbols always indicate the comparison between the control (vehicle-treated) and the other tested conditions.

For Peer Review

## RESULTS

### *CFTR correctors rescue the traffic of the ER-retained I541F variant of ABCB4*

In order to identify new pharmacological correctors for ER-retained ABCB4 variants, we tested the possibility to repurpose CFTR correctors previously reported to rescue the plasma membrane targeting of F508del-CFTR. We tested the effect of 16 CFTR correctors (Supplementary Table S1). Using MTT assay, we first ascertained that none of these molecules were cytotoxic after 16 hours of treatment at 10  $\mu$ M in HEK cells (Figure 1). As a model of ER-retention of ABCB4, we used the well-characterized I541F variant, for which plasma membrane targeting could be restored at low temperature (27°C) and by pharmacological means<sup>13-15</sup>. On immunoblots from HEK cell lysates, ABCB4-I541F is mainly present at an apparent molecular weight of 140 kDa due to its incomplete glycosylation, by opposition to ABCB4-WT mainly present as a fully glycosylated protein with an apparent molecular weight of 160 kDa (Figure 2A), as previously demonstrated<sup>14</sup>. After 16 hours of cell treatment with 10  $\mu$ M of the different CFTR correctors, we observed that some of them were able to correct ABCB4-I541F maturation, considering the increased amounts of its mature form (Figure 2A). The quantification of these results indicated that C10 (KM11057), C13 (Corr4C) and C17 (15jF) were the best ABCB4 corrector candidates, as well as combinations of C3+C18 (VRT-325+VRT-534) and C4+C18 (Corr4A+VRT-534) (Figure 2B), previously reported to be able to rescue F508del-CFTR as well as defective ABCA4 variants<sup>25,26</sup>. We then investigated the potential of these correcting molecules to restore canalicular targeting of ABCB4-I541F in HepG2 cells, a human hepatoma-derived cell line forming pseudo-bile canaliculi in culture<sup>27</sup>. In these polarized cells, ABCB4-WT colocalized with ABCC2 at bile canaliculi, which was not the case of ABCB4-I541F displaying a diffuse cytoplasmic staining (Figure 2C). However, after 16 hours of treatment with 10  $\mu$ M of C10, C13, C17, or the C3+C18 and C4+C18

1  
2  
3 combinations, canalicular staining of ABCB4-I541F was rescued, as shown by its  
4  
5 colocalization with ABCC2 (Figure 2C). Altogether, these results indicate that C10, C13, C17,  
6  
7 and C3+C18 and C4+C18 combinations are able to partially rescue the maturation and the  
8  
9 canalicular localization of ABCB4-I541F.  
10  
11

12  
13  
14  
15  
16 ***CFTR correctors also rescue the maturation and the localization of three other ER-retained***  
17  
18 ***ABCB4 variants***  
19

20  
21  
22 In order to determine if these CFTR corrector candidates might be envisioned as general  
23  
24 correctors for ER-retained ABCB4 variants, we investigated their effect on three other ABCB4  
25  
26 variants (I490T, R545H, L556R), previously reported in patients with liver diseases<sup>8,16,28</sup>, and  
27  
28 already shown to be class II ER-retained for the I490T and L556R variants<sup>6,13</sup>. Our results give  
29  
30 evidence that C10, C13, C17, and C3+C18 and C4+C18 combinations are also able to rescue  
31  
32 the maturation of these three immature variants (Figure 3A-C). The quantifications of these  
33  
34 experiments indicate that rescuing efficiencies were all statistically significant, even though  
35  
36 efficiencies vary among the three variants (Figure 3D-F). As performed for ABCB4-I541F, we  
37  
38 analysed the intracellular localization of these three variants in HepG2 cells. After vehicle  
39  
40 treatment, ABCB4-I490T, -R545H and -L556R do not colocalize with ABCC2 (Figure 3G-I,  
41  
42 upper panels). But after treatment with C10, C13 or C17, as well as with C3+C18 or C4+C18  
43  
44 combinations, the localization of the three variants at bile canaliculi was rescued (Figure 3G-  
45  
46 I). Thus, these CFTR correctors are able to rescue the maturation and the localization of four  
47  
48 distinct ER-retained ABCB4 variants, suggesting that they trigger common correcting  
49  
50 molecular mechanisms.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 ***CFTR correctors do not restore the function of ER-retained ABCB4 variants and inhibit***  
4  
5 ***ABCB4-WT function***  
6  
7

8  
9 The aim of correcting the intracellular traffic of ER-retained ABCB4 variants is to obtain  
10 sufficient amounts of functional transporters present at the plasma membrane in order to rescue  
11 PC secretion in the extracellular space. Using a previously described fluoro-enzymatic  
12 approach<sup>29</sup>, we measured ABCB4-mediated PC secretion of the four variants transiently  
13 expressed in HEK cells with or without treatment with the different CFTR correcting drugs. As  
14 expected, we observed a strongly reduced activity (less than 10-15% of ABCB4-WT activity)  
15 for the four variants in the absence of treatment by comparison to ABCB4-WT (Figure 4A-D).  
16 Nevertheless, none of the CFTR correctors (used alone or in combination) was able to  
17 significantly rescue the function of any of the four variants (Figure 4A-D), despite their partial  
18 rescue of maturation and canalicular localization (Figures 2 and 3). Instead, we observed a trend  
19 towards less activity in treated cells, even if differences did not reach statistical significance  
20 (Figure 4A-D). We also tested these CFTR correctors in HEK cells expressing ABCB4-WT.  
21 Surprisingly, we observed that 10  $\mu$ M of C10, C13, C17, C3+C18 or C4+C18 dramatically  
22 inhibited ABCB4-WT activity to less than 10% of its maximal activity (Figure 4E). Similar  
23 inhibitory effects of these CFTR correctors were also observed on ABCB4-WT when used at  
24 5  $\mu$ M (data not shown). Thus, our results provide evidence that, despite their capacity to restore  
25 ABCB4 targeting at the canalicular membrane, the CFTR correctors investigated here also  
26 inhibit PC secretion function mediated by the transporter.  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 ***Molecular docking calculations reveal different plausible binding regions of CFTR***  
4  
5 ***correctors within ABCB4***  
6

7  
8  
9 We hypothesized that the inhibition of ABCB4 activity by CFTR correctors could be related to  
10 their direct interaction with functional domains of the transporter. To test this possibility, we  
11 performed *in silico* molecular docking simulations. Blind calculations were first performed  
12 using large box parameters (Supplementary Table S2A) with inward-facing ABCB4 (ABCB4<sup>if</sup>)  
13 and its closed conformation (ABCB4<sup>cc</sup>) wherein no *a priori* plausible structural binding regions  
14 were defined (for details, see *Materials and Methods*). This provided 6398 and 6395 molecular  
15 poses for ABCB4<sup>if</sup> and ABCB4<sup>cc</sup>, respectively. Molecular poses were then spatially clustered,  
16 revealing a single binding site for CFTR correctors within ABCB4<sup>if</sup> while three binding sites  
17 were obtained for ABCB4<sup>cc</sup> (Supplementary Figure S2). In ABCB4<sup>if</sup>, 95% of molecular poses  
18 are located in ABCB4 protein chamber (Supplementary Table S3), expected to be the canonical  
19 phospholipid binding site region<sup>19</sup>. Regarding ABCB4<sup>cc</sup>, 81% of molecular poses can be  
20 divided into three distinct regions, namely an allosteric site at the lipid-protein interface (30%  
21 of molecular poses) and the two known ATP-binding sites at both NBD interfaces (15 and 36%  
22 for ATP-binding sites 1 and 2, respectively – see Supplementary Table S3). Refined molecular  
23 docking calculations were then performed for each binding site to stress out key residues  
24 possibly involved in CFTR corrector binding to ABCB4. Only poses exhibiting binding affinity  
25 difference with respect to top-ranked molecular poses below 2.0 kcal.mol<sup>-1</sup> were considered as  
26 already described<sup>30</sup>. In total, a set of 21524 molecular poses were obtained from refined  
27 molecular docking calculations (Supplementary Table S4).  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52

53 Accounting aforementioned *in cellulo* results, special attention was paid to selected CFTR  
54 correctors, namely C3, C4, C10, C13, C17 and C18 (Figure 5A). Contact analyses using a 4.5 Å  
55 cutoff were performed allowing to decipher key residues to CFTR corrector binding in the four  
56 regions of interest in ABCB4 (Figure 5B). It is worth mentioning that contact analyses  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 performed over the whole set of CFTR correctors exhibit similar profiles with respect to  
4  
5 selected CFTR correctors (Supplementary Figure S3). Ten and thirteen residues are in contact  
6  
7 with the selected CFTR correctors in at least 50% of calculated molecular poses, in ABCB4<sup>if</sup>  
8  
9 protein chamber and ABCB4<sup>cc</sup> allosteric site, respectively (Figure 5B). Most of these residues  
10  
11 are either aromatic (phenylalanine and tyrosine) or aliphatic (alanine, isoleucine, valine,  
12  
13 leucine), and presumably involved in substrate binding (Figure 5C), as proposed recently for  
14  
15 His989 and Ala990<sup>19</sup> in ABCB4<sup>if</sup> protein chamber (underlined residues in Figure 5C).  
16  
17 Molecular docking calculations in ABCB4<sup>cc</sup> allosteric site clearly suggested the key role of  
18  
19 Val192, Phe195, Ile354 and Phe357 for which contacts are higher than 90% (Figure 5B-C).  
20  
21 Contact analyses of ABCB4<sup>cc</sup> ATP-binding sites exhibited more residues per site owing to  
22  
23 smaller volumes as well as more important steric hindrance. Indeed, molecular docking  
24  
25 calculations revealed ten and seven residues for which contact rate is higher than 90% in  
26  
27 ABCB4<sup>cc</sup> ATP-binding sites 1 and 2, respectively (Figure 5B). Residue profile again included  
28  
29 aromatic amino acids (e.g. NBD A-loop residues Tyr403 and Tyr1043) but also polar residues  
30  
31 such as arginine (Arg406 and Arg1046) (Figure 5C). For all ABCB4 binding sites, thorough  
32  
33 analyses of non-covalent interactions (H-bond and van der Waals interactions) were performed,  
34  
35 highlighting the key role of  $\pi$ -stacking interactions between CFTR correctors' aromatic rings  
36  
37 and ABCB4 aromatic residues (Supplementary Table S5). This was clearly shown for ABCB4<sup>cc</sup>  
38  
39 allosteric and ATP-binding sites 1 and 2 for which Phe195, Phe357, Tyr403 or Tyr1043 are  
40  
41 involved in all  $\pi$ -stacked conformations. To a lesser extent, H-bonding were also shown to be  
42  
43 relevant. For instance, H-bonding with Gln725 were involved in 21% of molecular poses in  
44  
45 ABCB4<sup>if</sup> protein chamber. Likewise, H-bonding with Arg904 (ABCB4<sup>cc</sup> ATP-binding site 1)  
46  
47 or Arg1046 and Glu1080 (ABCB4<sup>cc</sup> ATP-binding site 2) are involved in 27, 21 and 21% of  
48  
49 molecular poses, respectively (Supplementary Table S5).  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 Finally, molecular docking calculations and aforementioned atomic-scaled analyses allowed to  
4  
5 define putative binding sites in terms of secondary structure (Supplementary Table S6).  
6  
7 ABCB4<sup>if</sup> protein chamber involved the lipid-embedded regions of eight TMs, namely TM4, 5,  
8  
9 6, 7, 8, 9, 10 and 12 (Figure 5D). ABCB4<sup>cc</sup> allosteric site is defined by TM1 and TM3, as well  
10  
11 as TM4 and TM6 shared with ABCB4<sup>if</sup> protein chamber (Figure 5D). In addition to known  
12  
13 residues involved in ATP binding, ABCB4<sup>cc</sup> ATP-binding site regions were also defined,  
14  
15 including the coupling helices (Cp), namely Cps between TM2 and 3 and TM10 and 11 for  
16  
17 ATP-binding site 1, and Cps between TM4 and 5 and TM8 and 9 for ATP-binding site 2 (Figure  
18  
19 5D). Altogether, these *in silico* molecular docking analyses strongly suggest that CFTR  
20  
21 correctors might directly interact with functional domains of ABCB4, which could explain their  
22  
23 effect on ABCB4 activity.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## DISCUSSION

Genetic variations of the phospholipid floppase ABCB4 are correlated with rare cholestatic liver diseases, the most severe form being PFIC3. Some of these genetic variations can cause ABCB4 misfolding, its retention in the ER and, as a result, the loss of its phospholipid floppase function<sup>6</sup>. In previous studies, we and others have demonstrated that small molecules such as cyclosporins<sup>6,15</sup>, 4-phenylbutyrate (4-PBA), curcumin<sup>31</sup> and structural analogues of roscovitine<sup>13</sup> are able to partially rescue the intracellular traffic and the cell surface localization of ER-retained ABCB4 variants. However, cytotoxicity, inhibitory effect on ABCB4 function<sup>32</sup>, bioavailability or the high used concentration of these molecules are major limitations for their therapeutic use. In the present study, in order to identify new correctors for ER-retained ABCB4 variants, we explored the potential effect of several molecules, developed as CFTR correctors, on four distinct ER-retained ABCB4 variants identified in patients (I490T, I541F, R545H, L556R). CFTR correctors, which were used in this study are small molecules, mostly identified by high-throughput screening strategies to correct the traffic of F508del-CFTR, the most frequent genetic variation detected in patients with cystic fibrosis<sup>33</sup>. The extended use of these correctors is an attractive option for multiple rare diseases associated with protein misfolding and missorting. Interestingly, some of these molecules have been shown to successfully correct the intracellular localization and the function of other defective ABC transporters such as ABCA3<sup>34</sup> and ABCA4<sup>26</sup> and also ER-retained variants of ATP8B1<sup>35</sup> and  $\alpha$ -sarcoglycan<sup>36</sup>, proteins without CFTR similarity. Here, we show that the correctors C10, C13 and C17 as well as the combinations of C3+C18 and C4+C18 can partially rescue the maturation and the plasma membrane targeting of four defective ABCB4 variants. The fact that the floppase activity of the I541F, I490T and L556R variants of ABCB4 can be partially rescued by roscovitine analogues<sup>13</sup> indicates that these missense variants have intrinsic activity once rescued at the plasma membrane. However, the CFTR correctors tested here are not able to

1  
2  
3 restore the function of the ER-retained ABCB4 variants and they also inhibit the floppase  
4  
5 activity of ABCB4-WT.  
6  
7

8  
9 It is noteworthy to mention that this is not the first time that inhibitory effects of correctors on  
10  
11 ABCB4 function are reported. Indeed, cyclosporin A, roscovitine and triazole compounds such  
12  
13 as itraconazole were shown to inhibit ABCB4 floppase activity<sup>13,32,37</sup>. Sildenafil, the C10 parent  
14  
15 molecule, has also been shown to inhibit the transport function of ABCB1<sup>38</sup>, which exhibits  
16  
17 86% sequence-based similarity with ABCB4<sup>39</sup>. The PgpRules prediction tool  
18  
19 (<https://pgprules.cmdm.tw/>)<sup>40</sup> indicates that C3, C4, C10, C13, C17 and C18 might inhibit  
20  
21 ABCB1 (data not shown), suggesting similar inhibitory mechanisms on ABCB4. Even if CFTR  
22  
23 correctors belong to different chemical classes (quinolines, bithiazoles, quinazolines,  
24  
25 pyrimidines)<sup>33</sup>, they share features with pharmacophore models of ABCB1 inhibitors  
26  
27 previously described as hydrophobic, hydrogen bond acceptor, aromatic ring centered with  
28  
29 positive ionizable moieties<sup>41</sup>.  
30  
31  
32  
33

34  
35 To explain how these CFTR correctors could correct missorting of ABCB4 variants and at the  
36  
37 same time inhibit the floppase activity of the transporter, we suggest that these small molecules  
38  
39 may directly interact with ABCB4. Such an interaction has already been reported for C18 with  
40  
41 CFTR<sup>42</sup>. To virtually test this hypothesis, we investigated the putative binding sites of CFTR  
42  
43 correctors in ABCB4 by *in silico* docking simulations. Using two models of human ABCB4 in  
44  
45 inward-facing and closed conformations (ABCB4<sup>if</sup> and ABCB4<sup>cc</sup>, respectively), we identified  
46  
47 four distinct plausible binding regions for CFTR correctors: the protein chamber in the ABCB4<sup>if</sup>  
48  
49 model; and an allosteric region and two ATP-binding sites in ABCB4<sup>cc</sup>. Analysis of contact  
50  
51 residues with a 4.5 Å cutoff around the docked poses of CFTR correctors indicated that several  
52  
53 key residues could be involved in CFTR corrector binding. In ABCB4<sup>if</sup>, we identified His989  
54  
55 and Ala990 as potential interactors with CFTR correctors, these residues having been recently  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 shown to be crucial for PC binding and ABCB4 function<sup>19</sup>. We also detected Gln725, a residue  
4 conserved in ABCB1 and implicated in the binding of tariquidar<sup>43</sup>. Concerning ABCB4<sup>c</sup>, we  
5  
6 identified Phe357, Tyr403 and Arg1046 located in the allosteric region, the ATP binding sites  
7  
8 1 and 2, respectively. These three residues were previously reported to be mutated in patients  
9  
10 suffering from PFIC3 and low-phospholipid associated cholelithiasis syndrome<sup>44-46</sup>, suggesting  
11  
12 their important role in ABCB4 expression and function. Moreover, Tyr403 and Tyr1043 were  
13  
14 also reported to be essential for ATP binding and hydrolysis<sup>19,47</sup>. It is thus tempting to speculate  
15  
16 that the predicted direct interaction of CFTR correctors with key residues of ABCB4 may  
17  
18 preclude its phospholipid floppase activity. This view is supported by the fact that sildenafil  
19  
20 (the C10 parent molecule) and C3 impair the function of ABCB1 and CFTR, respectively<sup>38,48</sup>.  
21  
22  
23  
24  
25

26  
27 We propose that the trafficking rescue of ABCB4 variants mediated by CFTR correctors may  
28  
29 be conferred through their direct interaction with critical domains of ABCB4, as shown by our  
30  
31 *in silico* docking analyses. We expect that our findings will help to design new non-inhibitory  
32  
33 ABCB4 correctors that may lead to the preclinical development of pharmacological alternative  
34  
35 to UDCA treatment and liver transplantation. Indeed, if our hypothesis is confirmed, the next  
36  
37 challenge will be to identify small molecules able to promote folding and trafficking of  
38  
39 defective variants without compromising their activity. Thus, further investigations are eagerly  
40  
41 needed in order to optimize bioavailability and affinity of these correctors, not only to promote  
42  
43 traffic correction but also to maintain the function of the transporter.  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## REFERENCES

1. Falguières T, Aït-Slimane T, Housset C, Maurice M. ABCB4: insights from pathobiology into therapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2014;38(5):557-563.
2. Srikant S, Gaudet R. Mechanics and pharmacology of substrate selection and transport by eukaryotic ABC exporters. *Nature structural & molecular biology*. 2019;26(9):792-801.
3. Smit JJ, Schinkel AH, Mol CA, et al. Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein. *Lab Invest*. 1994;71(5):638-649.
4. Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*. 1993;75(3):451-462.
5. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol*. 2013;3(3):1035-1078.
6. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Dossier C, et al. A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Hepatology*. 2016;63(5):1620-1631.
7. Vauthier V, Housset C, Falguières T. Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters. *Biochem Pharmacol*. 2017;136:1-11.
8. Jacquemin E, De Vree JM, Cresteil D, et al. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology*. 2001;120(6):1448-1458.
9. Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2012;36 Suppl 1:S26-35.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

10. Poupon R. Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: An overview of their mechanisms of action. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2012;36 Suppl 1:S3-S12.
11. Achufusi TGO, Safadi AO, Mahabadi N. Ursodeoxycholic Acid. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC; 2020.
12. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. The spectrum of liver diseases related to ABCB4 gene mutations: pathophysiology and clinical aspects. *Semin Liver Dis.* 2010;30(2):134-146.
13. Vauthier V, Ben Saad A, Elie J, et al. Structural analogues of roscovitine rescue the intracellular traffic and the function of ER-retained ABCB4 variants in cell models. *Sci Rep.* 2019;9(1):6653.
14. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Delautier D, et al. A missense mutation in ABCB4 gene involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 leads to a folding defect that can be rescued by low temperature. *Hepatology.* 2009;49(4):1218-1227.
15. Gautherot J, Durand-Schneider AM, Delautier D, et al. Effects of Cellular, chemical and pharmacological chaperones on the rescue of a trafficking-defective mutant of the ATP-binding cassette transporters ABCB1/ABCB4. *J Biol Chem.* 2012;287(7):5070-5078.
16. Poupon R, Rosmorduc O, Boelle PY, et al. Genotype-phenotype relationships in the low-phospholipid associated cholelithiasis syndrome. A study of 156 consecutive patients. *Hepatology.* 2013;58(3):1105-1110.
17. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol.* 2011;731:237-245.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

18. Alam A, Kowal J, Broude E, Roninson I, Locher KP. Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein. *Science*. 2019;363(6428):753-756.
19. Olsen JA, Alam A, Kowal J, Stieger B, Locher KP. Structure of the human lipid exporter ABCB4 in a lipid environment. *Nature structural & molecular biology*. 2019;27(1):62-70.
20. Šali A, Blundell TL. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology*. 1993;234(3):779-815.
21. Fiser A, Do RKG, Šali A. Modeling of loops in protein structures. *Protein Science*. 2000;9(9):1753-1773.
22. Martí-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sánchez R, and FM, Šali A. Comparative Protein Structure Modeling of Genes and Genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 2000;29(1):291-325.
23. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*. 2010;31(2):455-461.
24. Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*. 2016;11(5):905-919.
25. Lopes-Pacheco M, Boinot C, Sabirzhanova I, Morales MM, Guggino WB, Cebotaru L. Combination of Correctors Rescue DeltaF508-CFTR by Reducing Its Association with Hsp40 and Hsp27. *J Biol Chem*. 2015;290(42):25636-25645.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60
26. Sabirzhanova I, Lopes-Pacheco M, Rapino D, et al. Rescuing trafficking mutants of the ATP binding cassette protein, ABCA4, with small molecule correctors as a treatment for Stargardt eye disease. *J Biol Chem*. 2015;290(32):19743-19755.
27. Sormunen R, Eskelinen S, Lehto VP. Bile canaliculus formation in cultured HEPG2 cells. *Lab Invest*. 1993;68(6):652-662.
28. Tougeron D, Fotsing G, Barbu V, Beauchant M. ABCB4/ MDR3 gene mutations and Cholangiocarcinomas. *J Hepatol*. 2012;57(2):467-468.
29. Gautherot J, Delautier D, Maubert MA, et al. Phosphorylation of ABCB4 impacts its function: Insights from disease-causing mutations. *Hepatology*. 2014;60(2):610-621.
30. Cosconati S, Forli S, Perryman AL, Harris R, Goodsell DS, Olson AJ. Virtual Screening with AutoDock: Theory and Practice. *Expert opinion on drug discovery*. 2010;5(6):597-607.
31. Gordo-Gilart R, Andueza S, Hierro L, Jara P, Alvarez L. Functional Rescue of Trafficking-Impaired ABCB4 Mutants by Chemical Chaperones. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150098.
32. Andress EJ, Nicolaou M, Romero MR, et al. Molecular mechanistic explanation for the spectrum of cholestatic disease caused by the S320F variant of ABCB4. *Hepatology*. 2014;59(5):1921-1931.
33. Spanò V, Montalbano A, Carbone A, Scudieri P, Galiotta LJV, Barraja P. An overview on chemical structures as  $\Delta F508$ -CFTR correctors. *Eur J Med Chem*. 2019;180:430-448.
34. Kinting S, Höppner S, Schindlbeck U, et al. Functional rescue of misfolding ABCA3 mutations by small molecular correctors. *Hum Mol Genet*. 2018;27(6):943-953.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

35. van der Woerd WL, Wichers CG, Vestergaard AL, et al. Rescue of defective ATP8B1 trafficking by CFTR correctors as a therapeutic strategy for familial intrahepatic cholestasis. *J Hepatol*. 2016;64(6):1339-1347.
36. Carotti M, Marsolier J, Soardi M, et al. Repairing folding-defective  $\alpha$ -sarcoglycan mutants by CFTR correctors, a potential therapy for limb-girdle muscular dystrophy 2D. *Hum Mol Genet*. 2018;27(6):969-984.
37. Yoshikado T, Takada T, Yamamoto T, et al. Itraconazole-induced cholestasis: involvement of the inhibition of bile canalicular phospholipid translocator MDR3/ABCB4. *Mol Pharmacol*. 2011;79(2):241-250.
38. Shi Z, Tiwari AK, Shukla S, et al. Sildenafil reverses ABCB1- and ABCG2-mediated chemotherapeutic drug resistance. *Cancer Res*. 2011;71(8):3029-3041.
39. Morita SY, Terada T. Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. *Biomed Res Int*. 2014;2014:954781.
40. Wang PH, Tu YS, Tseng YJ. PgpRules: a Decision Tree Based Prediction Server for P-glycoprotein Substrates and Inhibitors. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2019;35(20):4193-4195.
41. Ekins S. Drug Transporter Pharmacophores. *Transporters as Drug Carriers*. 2009(44):215-221.
42. Molinski SV, Shahani VM, Subramanian AS, et al. Comprehensive mapping of cystic fibrosis mutations to CFTR protein identifies mutation clusters and molecular docking predicts corrector binding site. *Proteins*. 2018;86(8):833-843.
43. Loo TW, Clarke DM. Mapping the Binding Site of the Inhibitor Tariquidar That Stabilizes the First Transmembrane Domain of P-glycoprotein. *J Biol Chem*. 2015;290(49):29389-29401.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

44. Degiorgio D, Colombo C, Seia M, et al. Molecular characterization and structural implications of 25 new ABCB4 mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3). *Eur J Hum Genet.* 2007;15(12):1230-1238.
45. Colombo C, Vajro P, Degiorgio D, et al. Clinical features and genotype-phenotype correlations in children with progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 related to ABCB4 mutations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;52(1):73-83.
46. Nakken KE, Labori KJ, Rødningen OK, et al. ABCB4 sequence variations in young adults with cholesterol gallstone disease. *Liver Int.* 2009;29(5):743-747.
47. Degiorgio D, Corsetto PA, Rizzo AM, et al. Two ABCB4 point mutations of strategic NBD-motifs do not prevent protein targeting to the plasma membrane but promote MDR3 dysfunction. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(5):633-639.
48. Kim Chiaw P, Wellhauser L, Huan LJ, Ramjeesingh M, Bear CE. A chemical corrector modifies the channel function of F508del-CFTR. *Mol Pharmacol.* 2010;78(3):411-418.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. CFTR correctors are not cytotoxic.** HEK cells were treated with 10  $\mu$ M of the indicated compounds during 16 hours. Then cytotoxicity was assessed by MTT assay and expressed as the percentage of means for control vehicle-treated cells. Means ( $\pm$  SEM) of at least three independent experiments per condition performed in triplicate are shown.

**Figure 2. CFTR correctors partially rescue the maturation and the localization of ABCB4-I541F.** (A) ABCB4-I541F was transiently expressed in HEK cells. After 16 hours of treatment with vehicle (ctrl, control) or 10  $\mu$ M of the indicated compounds, cell lysates were prepared and analysed by immunoblotting using the indicated antibodies. ABCB4-WT is shown as reference. The mature and immature forms of ABCB4 are indicated (arrows), as well as molecular weight markers. This panel is representative of at least five independent experiments for each condition. (B) Densitometry analysis of A. The percentage of the mature form of ABCB4-I541F was quantified and then expressed as fold change compared to vehicle-treated cells (ctrl). Dark grey bars indicate compounds for which means are significantly different from control. Means ( $\pm$  SEM) of at least five independent experiments per condition are shown. (C) ABCB4-WT or ABCB4-I541F were expressed in HepG2 cells. After 16 hours of treatment with vehicle (control) or 10  $\mu$ M of the indicated correctors, cells were fixed and permeabilized. Then, after immunolabelling, ABCB4 (red) and endogenous ABCC2 (green) were visualized by confocal microscopy. Nuclei shown in the merged images were labelled with Hoechst 33342 (blue). Asterisks in the lower frames indicate bile canaliculi. This panel is representative of at least three independent experiments per condition. Bars: 10  $\mu$ m.

**Figure 3. CFTR correctors partially rescue the maturation and the canalicular localization of other ER-retained ABCB4 variants.** (A-C) ABCB4-I490T (A), R545H (B) or L556R (C) were transiently expressed in HEK cells. After treatment with 10  $\mu$ M of the

1  
2  
3 indicated CFTR correctors, the maturation of the missense variants was assessed by  
4 immunoblotting as in Figure 2A. Arrows indicate mature ABCB4. Molecular weight markers  
5 (in kDa) are also indicated. These panels are representative of at least five independent  
6 experiments for each condition. (D-F) Densitometry analyses of A-C, as performed in Figure  
7 2B. Means ( $\pm$  SEM) of five independent experiments per condition are represented. (G-I) After  
8 treatment with vehicle (control) or 10  $\mu$ M of the indicated CFTR correctors, HepG2 cells  
9 expressing ABCB4-I490T (G), ABCB4-R545H (H) or ABCB4-L556R (I) were processed for  
10 indirect immunofluorescence and confocal microscopy, as described in Figure 2C. Dashed  
11 squares indicate magnification shown on the right of each merged panel. Asterisks indicate bile  
12 canaliculi. Each panel is representative of at least three independent experiments for each  
13 condition. Bars: 10  $\mu$ m.

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29 **Figure 4. CFTR correctors do not rescue the activity of ER-retained ABCB4 variants and**  
30 **inhibit ABCB4-WT activity.** HEK cells expressing ABCB4-I541F (A) ABCB4-I490T (B),  
31 ABCB4-R545H (C), ABCB4-L556R (D) or ABCB4-WT (E) were treated with vehicle (ctrl,  
32 control) or 10  $\mu$ M of the indicated CFTR correctors, and ABCB4-mediated PC secretion was  
33 measured and represented as a percentage of the activity for control vehicle-treated cells  
34 expressing ABCB4-WT after background subtraction. Means ( $\pm$  SEM) of at least three  
35 independent experiments performed in triplicate for each tested condition are shown.

36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46 **Figure 5. *In silico* molecular docking of CFTR correctors suggest their direct interaction**  
47 **with ABCB4.** (A) *In silico* molecular docking of the six color-coded CFTR correctors was  
48 performed with ABCB4 in inward-facing (ABCB4<sup>if</sup>) and closed conformation (ABCB4<sup>cc</sup>)  
49 models (see *Materials and Methods* for details). For ABCB4<sup>if</sup>, a single site of potential  
50 interaction was identified in the protein chamber while three sites were identified for ABCB4<sup>cc</sup>  
51 in an allosteric site and the two ATP-binding sites. For each CFTR corrector and for each site,  
52 the 50 poses with the highest affinities from 20 independent simulations are shown. (B) For  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 each of the six CFTR correctors of interest, the contact rate of ABCB4 residues was calculated  
4  
5 for the four sites of interest shown in A (see *Materials and Methods* for details). For the sake  
6  
7 of clarity, only residues for which the contact rate was  $\geq 50\%$  are indicated. Horizontal dash  
8  
9 lines indicate the cut-offs applied in C. Means ( $\pm$  SEM) of 20 independent simulations per  
10  
11 CFTR corrector are shown. (C) ABCB4 residues indicated in B with dark grey bars for which  
12  
13 the contact rate is greater than 50% (ABCB4<sup>if</sup> - Protein chamber; ABCB4<sup>cc</sup> - Allosteric site) or  
14  
15 90% (ABCB4<sup>cc</sup> - ATP-binding sites 1 and 2) are represented with their lateral chains in the 3D  
16  
17 structures of ABCB4<sup>if</sup> and ABCB4<sup>cc</sup>. Each transmembrane domain and nucleotide binding  
18  
19 domain are represented in different colors, as well as the coupling helices (see Supplementary  
20  
21 Table S6). (D) ABCB4 transmembrane domains (TM), nucleotide binding domains (NBD) and  
22  
23 coupling helices (Cp; their numbers indicate the linked transmembrane domains), for which  
24  
25 potential interaction with CFTR correctors is suggested in B and C, are highlighted with the  
26  
27 same color code as in C.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

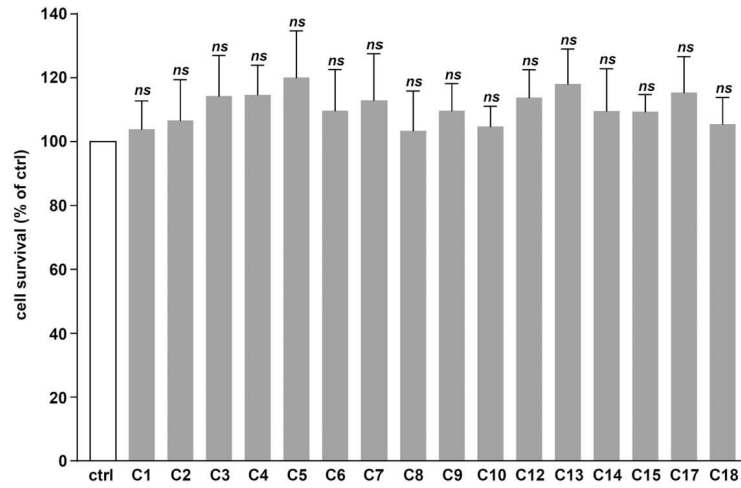


Figure 1. CFTR correctors are not cytotoxic.

149x97mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

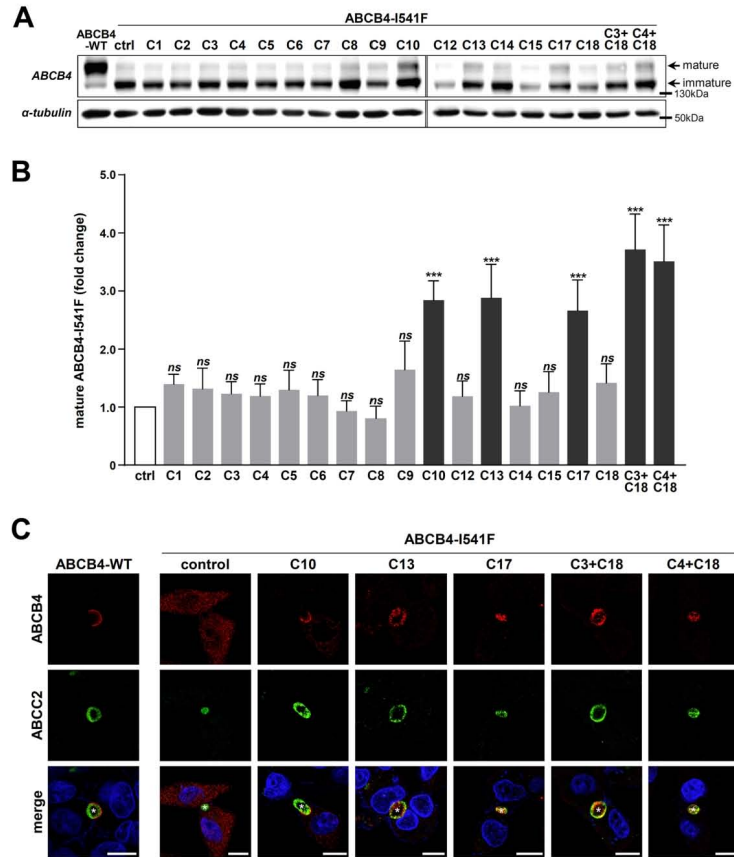


Figure 2. CFTR correctors partially rescue the maturation and the localization of ABCB4-I541F.

199x231mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

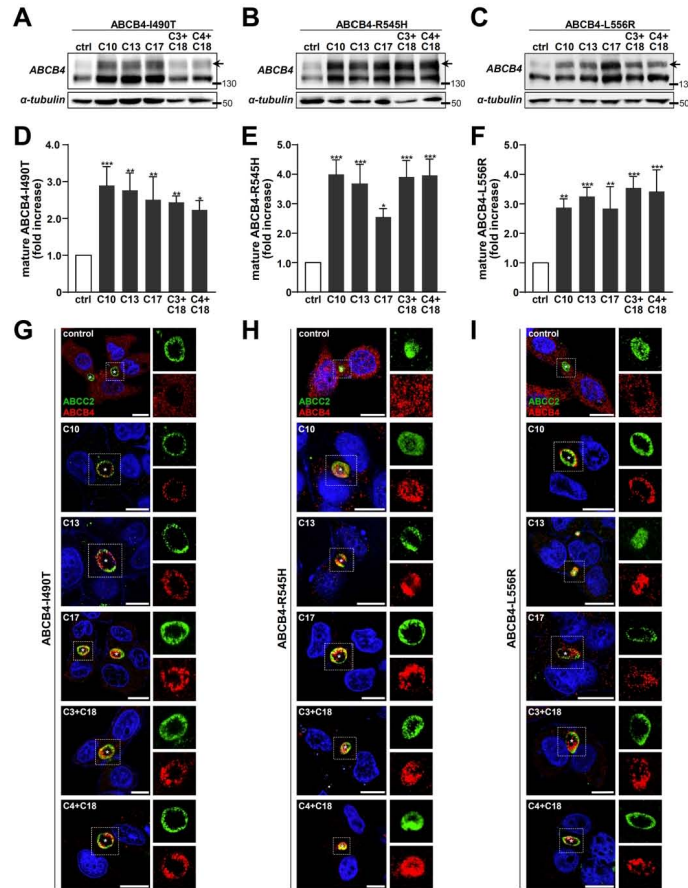


Figure 3. CFTR correctors partially rescue the maturation and the canalicular localization of other ER-retained ABCB4 variants.

199x256mm (300 x 300 DPI)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

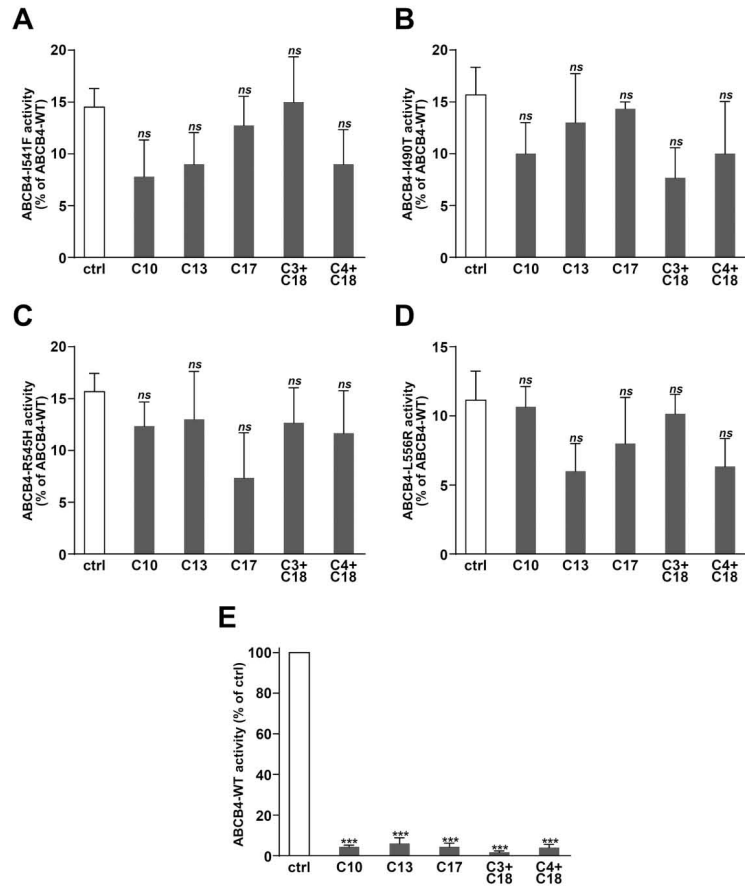


Figure 4. CFTR correctors do not rescue the activity of ER-retained ABCB4 variants and inhibit ABCB4-WT activity.

199x238mm (300 x 300 DPI)



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

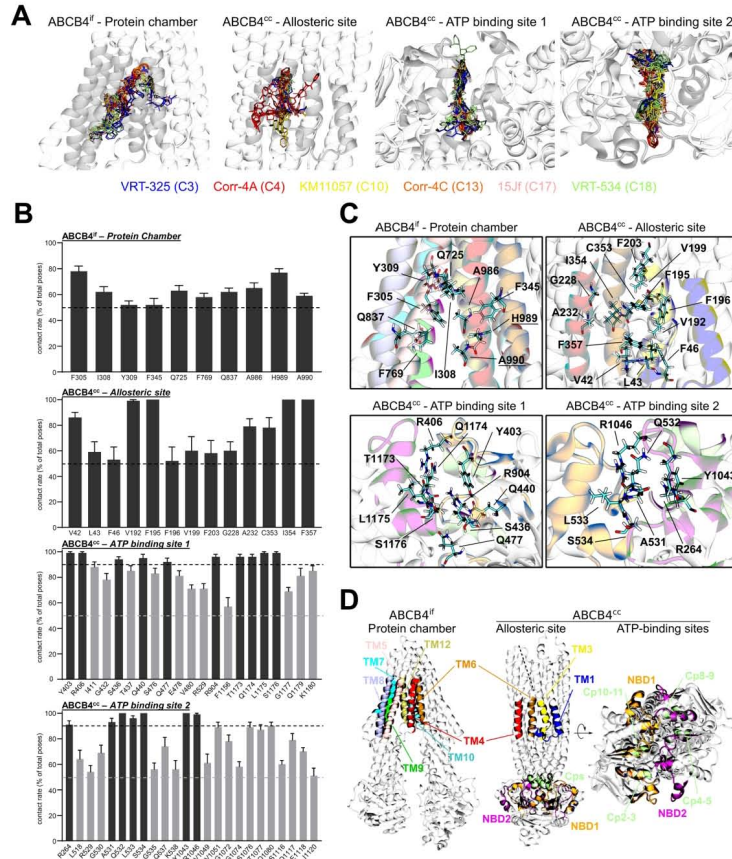


Figure 5. In silico molecular docking of CFTR correctors suggest their direct interaction with ABCB4.

199x233mm (300 x 300 DPI)

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### Effect of CFTR correctors on the traffic and the function of intracellularly retained ABCB4 variants

Amel Ben Saad<sup>1,2</sup>, Virginie Vauthier<sup>2,3</sup>, Ágota Tóth<sup>4</sup>, Angelika Janaszekiewicz<sup>4</sup>,

Anne-Marie Durand-Schneider<sup>2</sup>, Alix Bruneau<sup>2,5</sup>, Jean-Louis Delaunay<sup>2</sup>,

Martine Lapalus<sup>1</sup>, Elodie Mareux<sup>1</sup>, Isabelle Garcin<sup>1</sup>, Emmanuel Gonzales<sup>1,6</sup>,

Chantal Housset<sup>2,7</sup>, Tounsia Aït-Slimane<sup>2</sup>, Emmanuel Jacquemin<sup>1,6</sup>, Florent Di Meo<sup>4</sup>,

Thomas Falguières<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Inserm, Université Paris-Saclay, Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie, UMR\_S 1193, Hepatinov, 91400 Orsay, France.

<sup>2</sup> Inserm, Sorbonne Université, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), UMR\_S 938, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), 75012 Paris, France.

<sup>3</sup> Current address: Université de Paris, Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, 75014 Paris, France.

<sup>4</sup> Inserm, Université de Limoges, Faculté de Médecine et de Pharmacie, UMR 1248, Campus Marcland, 87000 Limoges, France.

<sup>5</sup> Current address: Department of Hepatology & Gastroenterology, Charité Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin, Germany.

<sup>6</sup> Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paediatric Hepatology & Paediatric Liver Transplant Department, Reference Center for Rare Paediatric Liver Diseases, FILFOIE, ERN Rare-Liver, Faculté de Médecine Paris-Saclay, CHU Bicêtre, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France.

<sup>7</sup> Assistance Publique - Hôpitaux de Paris. Hôpital Saint-Antoine, Reference Center for inflammatory biliary diseases and autoimmune hepatitis, FILFOIE, ERN Rare-Liver, 75012 Paris, France.

\* **Corresponding author:** Thomas Falguières, PhD – UMR\_S 1193 Inserm / Université Paris Saclay – Rue des Adèles – Bâtiment 440 – F-91405 Orsay cedex, France. Phone : +33-(0)1-69-15-62-94. e-mail: [thomas.falguieres@inserm.fr](mailto:thomas.falguieres@inserm.fr)

**SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS**

**ABCB4 model preparation.** Prior to docking calculations, both models were embedded in water-solvated (3:1) POPC:Cholesterol membrane lipid bilayers using the CHARMM-GUI webserver<sup>1-4</sup>. They were then minimized using the CPU version of PMEMD available in the AMBER18 package, using FF14SB, lipid17 and TIP3P forcefields for protein, lipid and water molecules, respectively<sup>5-8</sup>. Water, ions and lipids were then removed for docking calculations.

**Ligands.** The whole set of 16 CFTR correctors were initially considered for docking calculations, even though special attention was paid to VRT-325 (C3), Corr-4A (C4), KM11057 (C10), Corr-4C (C13), 15Jf (C17) and VRT-534 (C18). Correctors were downloaded from Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)<sup>9</sup> except for C7 which was manually built using the Maestro-Schrödinger Suite 2020-1 software (LLC, New York, NY, 2020). Corrector structures were first minimized at the quantum mechanical level using Density Functional Theory (DFT) M06-2X/6-31+G(d,p) level of theory<sup>10</sup>. Frequency analysis was carried out at the same level of theory to at least ensure a local minimum conformation by checking the absence of imaginary frequency. All relevant dihedral angles were allowed to be flexible during docking calculations (see Supplementary Table S1).

**Analysis of non-covalent interactions.** Considering the whole set of molecular poses, systematic contact (below 4.5 Å), H-bond and  $\pi$ -stacking interaction analyses were performed. H-bond interactions were considered, assuming distance- and angle-cutoffs set up to 3.5 Å and 120°, respectively. Two aromatic rings were considered  $\pi$ -stacked if: i) the distance between both rings' centers of mass is below 5.0 Å; ii) the angle between the two normal vectors to aromatic rings is below 10°. Analyses were carried out and rendered using CPPTRAJ<sup>11</sup>,

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

PyTRAJ<sup>12</sup> as well as homemade Python3 scripts (available on request) using Numpy<sup>20-2</sup><sup>13,14</sup>  
and Matplotlib<sup>22</sup><sup>15</sup> packages. 3D and 2D figures were rendered using the VMD 1.9.3<sup>16</sup> and CS  
ChemDraw softwares, respectively.

For Peer Review

Supplementary Table S1. Chemical structures of CFTR correctors used in this study

Compound	IUPAC name	Alternative name	Chemical Structure	PubChem CID	MW (Da)	References
C1	6-(1 <i>H</i> -Benzoimidazol-2-yl)sulfanylmethyl)-2-(6-methoxy-4-methyl-quinazolin-2-ylamino)-pyrimidin-4-ol	Corr-3a		<a href="#">135486495</a>	445.5	17
C2	2-(1-{4-[(4-Chlorophenyl)sulfonyl]-1-piperazinyl}ethyl)-4-(1-piperidinyl)quinazoline	VRT-640		<a href="#">23632303</a>	500.1	18
C3	4-(Cyclohexoxy)-2-(1-{4-[(4-methoxybenzene)sulfonyl]piperazin-1-yl}ethyl)quinazoline	VRT-325		<a href="#">11957831</a>	510.6	19
C4	N-(2-(5-Chloro-2-methoxyphenylamino)-4'-methyl-4,5'-bithiazol-2'-yl)benzamide	Corr-4a		<a href="#">1144671</a>	457.0	17
C5	4,5,7-trimethyl-N-phenylquinolin-2-amine	Corr-5a		<a href="#">740918</a>	262.3	17
C6	N-(4-bromophenyl)-4-methylquinolin-2-amine	Corr-5c		<a href="#">768745</a>	313.2	17
C7	2-(4-isopropoxycolinoyl)-N-(4-pentylphenyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoline-3-carboxamide	Compound 48		<i>not applicable</i>	485.6	20
C8	N-(2-fluorophenyl)-2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)-2-oxoacetamide	<i>not applicable</i>		<a href="#">2986288</a>	282.3	18
C9	7-Chloro-4-[4-(4-chlorophenyl)sulfonylpiperazin-1-yl]quinoline	KM11060		<a href="#">1241327</a>	422.3	21
C10	7-Chloro-4-[4-(phenylsulfonyl)piperazin-1-yl]quinoline	KM11057		<a href="#">1241326</a>	387.9	21
C12	N-(4-Fluorophenyl)-4-(4-methylphenyl)-1,3-thiazol-2-amine	Corr-2i		<a href="#">625111</a>	284.4	17
C13	N-[2-(3-Acetyl-phenylamino)-4'-methyl-[4,5']bithiazolyl-2'-yl]-benzamide	Corr-4c		<a href="#">2230879</a>	434.5	17
C14	N-[2-(2-Methoxy-phenylamino)-4'-methyl-[4,5']bithiazolyl-2'-yl]-benzamide	Corr-4d		<a href="#">1117191</a>	422.5	17
C15	Phenyl-[4-(4-vinyl-phenyl)-thiazol-2-yl]-amine	Corr-2b		<a href="#">683025</a>	278.4	17
C17	N-[5-[2-(5-Chloro-2-methoxyanilino)-1,3-thiazol-4-yl]-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl]-2,2-dimethylpropanamide	Compound 15Jf		<a href="#">11958611</a>	437.0	22
C18	1-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-N-[5-[(S)-(2-chlorophenyl)-[(2R)-2-hydroxypyrrolidin-1-yl]methyl]-1,3-thiazol-2-yl]cyclopropane-1-carboxamide	VRT-534		<a href="#">86621212</a>	498.0	18

*bold green bounds indicate allowed rotations during molecular docking calculations*

**Supplementary Table S2.** Technical parameters of blind and refined molecular docking calculations.**(A) Box parameter coordinates (center and size)**

Structure	Modelled sequence	Docking calculation	Volume search space	Box center			Box size		
				x	y	z	x	y	z
ABCB4 <sup>if</sup>	42-629	Blind	Overall	61.6	60.6	59.4	80.0	65.0	120.0
	692-1251	Refined	Protein chamber	60.0	62.7	94.4	29.5	29.5	29.5
ABCB4 <sup>cc</sup>	42-629	Blind	Overall	60.5	62.1	67.2	80.0	65.0	120.0
	692-1251	Refined	Allosteric site	51.1	72.9	80.0	23.0	23.0	23.0
			ATP-binding site 1	52.7	70.3	31.5	23.0	28.0	23.0
			ATP-binding site 2	65.2	49.3	30.7	23.0	28.0	23.0

*reported coordinates are defined according to available PDB orientations on request*

**(B) Flexible residues in each volume search space.**

Structure	Docking calculation	Volume search space	Flexible residues
ABCB4 <sup>if</sup>	Blind	Overall	None
	Refined	Protein chamber	234, 305, 309, 311, 312, 337, 338, 339, 345, 346, 349, 725, 728, 729, 841, 870, 874, 944, 952, 978, 982, 989
ABCB4 <sup>cc</sup>	Blind	Overall	None
	Refined	Allosteric site	44, 46, 195, 196, 239, 357
		ATP-binding site 1	166, 402, 403, 405, 435, 436, 437, 438, 440, 476, 477, 478, 557, 558, 902, 905, 908, 1156, 1166, 1173, 1174, 1176, 1179, 1180
		ATP-binding site 2	513, 514, 517, 524, 532, 534, 537, 538, 1042, 1043, 1045, 1053, 1071, 1076, 1077, 1080, 1116, 1117, 1118, 1199, 1200

*Ben Saad et al., Supplementary information***Supplementary Table S3.** Spatial distributions of the whole set of CFTR correctors over defined binding sites and out of these zones obtained from blind molecular docking calculations.

CFTR Correctors	ABCB4 <sup>if</sup>		ABCB4 <sup>ec</sup>			
	Protein chamber	Out of zone	Allosteric site	ATP-binding site 1	ATP-binding site 2	Out of zone
C1	0.98	0.02	0.02	0.28	0.46	0.24
C2	0.89	0.11	0.56	0.05	0.16	0.23
<b>C3</b>	<b>0.90</b>	<b>0.10</b>	<b>0.52</b>	<b>0.07</b>	<b>0.18</b>	<b>0.24</b>
<b>C4</b>	<b>1.00</b>	<b>0.01</b>	<b>0.29</b>	<b>0.16</b>	<b>0.50</b>	<b>0.06</b>
C5	0.94	0.07	0.25	0.18	0.40	0.17
C6	0.91	0.10	0.33	0.18	0.32	0.17
C7	1.00	0.00	0.43	0.06	0.11	0.40
C8	0.95	0.05	0.04	0.20	0.34	0.42
C9	0.92	0.08	0.26	0.12	0.44	0.18
<b>C10</b>	<b>0.90</b>	<b>0.10</b>	<b>0.35</b>	<b>0.12</b>	<b>0.41</b>	<b>0.13</b>
C12	0.95	0.05	0.32	0.21	0.41	0.07
<b>C13</b>	<b>0.99</b>	<b>0.01</b>	<b>0.24</b>	<b>0.24</b>	<b>0.52</b>	<b>0.01</b>
C14	0.96	0.04	0.26	0.16	0.53	0.05
C15	0.97	0.03	0.36	0.17	0.37	0.11
<b>C17</b>	<b>0.98</b>	<b>0.02</b>	<b>0.17</b>	<b>0.16</b>	<b>0.46</b>	<b>0.22</b>
<b>C18</b>	<b>0.92</b>	<b>0.08</b>	<b>0.44</b>	<b>0.04</b>	<b>0.16</b>	<b>0.36</b>
Average (Overall)	0.95 ± 0.04	0.05 ± 0.04	0.30 ± 0.15	0.15 ± 0.07	0.36 ± 0.14	0.19 ± 0.12
Average (Selected)	0.95 ± 0.05	0.05 ± 0.04	0.34 ± 0.13	0.13 ± 0.07	0.37 ± 0.16	0.17 ± 0.13

*averages ± SD are indicated for all correctors as well as for selected correctors reported in bold*

**Supplementary Table S4.** Minimum and maximum affinity energies ( $\Delta G_{\min}$  and  $\Delta G_{\max}$ , respectively; in kcal.mol<sup>-1</sup>) obtained from refined molecular docking calculations.

Correctors	ABCBA <sup>4f</sup>			ABCBA <sup>4c</sup>								
	Protein chamber			Allosteric site			ATP-binding site 1			ATP-binding site 2		
	$\Delta G_{\min}$	$\Delta G_{\max}$	#	$\Delta G_{\min}$	$\Delta G_{\max}$	#	$\Delta G_{\min}$	$\Delta G_{\max}$	#	$\Delta G_{\min}$	$\Delta G_{\max}$	#
C1	-10.7	-9.1	399	-9.7	-8.1	399	-11.6	-9.0	365	-11.1	-8.8	385
C2	-10.3	-8.9	400	-10.2	-8.9	393	-11.4	-7.5	175	-12.4	-8.7	138
<b>C3</b>	<b>-10.3</b>	<b>-8.9</b>	<b>400</b>	<b>-10.4</b>	<b>-8.5</b>	<b>400</b>	<b>-12.1</b>	<b>-7.8</b>	<b>111</b>	<b>-11.9</b>	<b>-8.8</b>	<b>219</b>
<b>C4</b>	<b>-9.6</b>	<b>-8.2</b>	<b>398</b>	<b>-8.8</b>	<b>-5.5</b>	<b>396</b>	<b>-9.9</b>	<b>-7.4</b>	<b>372</b>	<b>-10.3</b>	<b>-7.4</b>	<b>327</b>
C5	-9.6	-7.3	379	-10.0	-7.1	207	-9.3	-6.2	358	-9.5	-6.1	259
C6	-9.3	-6.9	398	-9.2	-6.6	280	-9.0	-6.3	307	-9.0	-5.5	342
C7	-12.2	-8.5	278	-9.7	-7.8	397	-9.9	-3.1	111	-11.6	-5.8	249
C8	-9.5	-7.2	383	-8.5	-6.7	398	-9.3	-7.5	397	-9.6	-7.0	327
C9	-9.9	-7.8	397	-9.0	-7.3	400	-10.2	-5.9	248	-10.7	-7.6	289
<b>C10</b>	<b>-9.7</b>	<b>-7.6</b>	<b>400</b>	<b>-9.3</b>	<b>-7.0</b>	<b>352</b>	<b>-9.8</b>	<b>-6.8</b>	<b>267</b>	<b>-10.5</b>	<b>-7.5</b>	<b>310</b>
C12	-8.9	-7.3	400	-9.1	-7.2	398	-8.7	-6.7	388	-9.2	-6.3	315
<b>C13</b>	<b>-10.3</b>	<b>2.3</b>	<b>399</b>	<b>-10.1</b>	<b>-8.6</b>	<b>400</b>	<b>-10.2</b>	<b>-7.4</b>	<b>359</b>	<b>-10.7</b>	<b>-3.5</b>	<b>304</b>
C14	-9.8	-7.9	398	-9.1	-4.2	397	-9.9	-7.1	325	-10.0	-6.6	324
C15	-8.8	-7.1	397	-8.6	-6.6	391	-8.4	-6.3	386	-9.3	-5.6	255
<b>C17</b>	<b>-8.9</b>	<b>-7.3</b>	<b>399</b>	<b>-8.5</b>	<b>-6.5</b>	<b>392</b>	<b>-9.2</b>	<b>-6.6</b>	<b>327</b>	<b>-9.4</b>	<b>-6.8</b>	<b>368</b>
<b>C18</b>	<b>-10.5</b>	<b>-8.8</b>	<b>400</b>	<b>-9.8</b>	<b>-7.3</b>	<b>264</b>	<b>-11.0</b>	<b>-2.0</b>	<b>336</b>	<b>-10.1</b>	<b>-7.4</b>	<b>192</b>

# indicates the selected number of poses for each molecule, with a maximum 2 kcal.mol<sup>-1</sup> range with respect to the top-ranked pose for each ABCBA state/CFTR corrector/region triad. Selected CFTR correctors are shown in bold.



**Supplementary Table S5.** Description of non-covalent interactions of CFTR correctors with ABCB4<sup>if</sup> and ABCB4<sup>cc</sup>.

Conformation	Binding sites	H-bonding interactions		van der Waals interactions	
		Residue	Involvement rate	Residue	Involvement rate
ABCB4 <sup>if</sup>	Protein Chamber	Gln725	0.21	Phe338	0.24
		Trp234	0.08	Phe776	0.21
		Tyr312	0.06	Phe982	0.18
		Tyr309	0.05	Phe993	0.14
		Gln772	0.05		
ABCB4 <sup>cc</sup>	Allosteric site	Arg361	0.04	Phe357	0.54
				Phe195	0.46
	ATP-binding site 1	Arg904	0.27	Tyr403	1.00
		Arg529	0.10		
		Gln440	0.09		
		Tyr403	0.09		
		Gln1179	0.07		
		Arg406	0.06		
		Ser476	0.05		
	ATP-binding site 2	Arg1046	0.21	Tyr1043	1.00
		Gln1080	0.21		
		Gln537	0.13		
		Arg264	0.06		

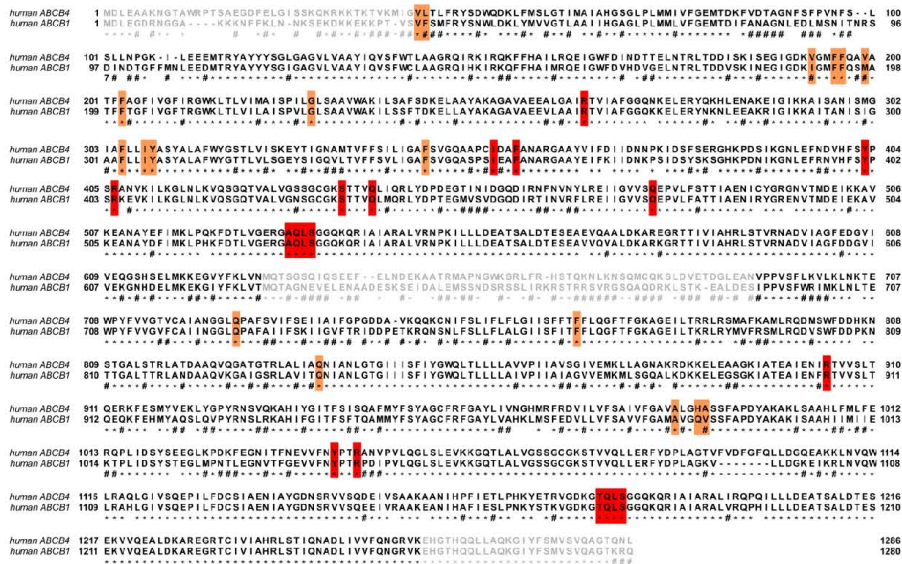
**Supplementary Table S6.** Sequence-based definitions of ABCB4<sup>lf</sup> and ABCB4<sup>cc</sup> binding sites from molecular docking calculations.

	ABCB4 <sup>lf</sup>		ABCB4 <sup>cc</sup>		Color code in Fig. 5C-D
	Protein Chamber	Allosteric site	ATP-binding site 1	ATP-binding site 2	
TM1	-	42-65	-	-	
TM2	-	-	-	-	
TM3	-	185-200	-	-	
TM4	227-240	225-241	-	-	
TM5	291-314	-	-	-	
TM6	336-353	346-361	-	-	
NBD1	-	-	401-415, 431-446 474-481, 555-561	479-485, 510-539, 561-563	
TM7	717-731	-	-	-	
TM8	756-780	-	-	-	
TM9	828-846	-	-	-	
TM10	867-878	-	-	-	
TM11	975-993	-	-	-	
TM12	-	-	-	-	
NBD2	-	-	1118-1123, 1155-1181, 1203-1204	1041-1053, 1071-1085, 1115-1118, 1197-1203, 1247-1248	
Cp2-3	-	-	161-167	-	
Cp4-5	-	-	-	262-268	
Cp8-9	-	-	-	799-804	
Cp10-11	-	-	901-909	-	

*Locations according to transmembrane helices (TM), nucleotide binding domains (NBD) and coupling helices (Cp) are reported*

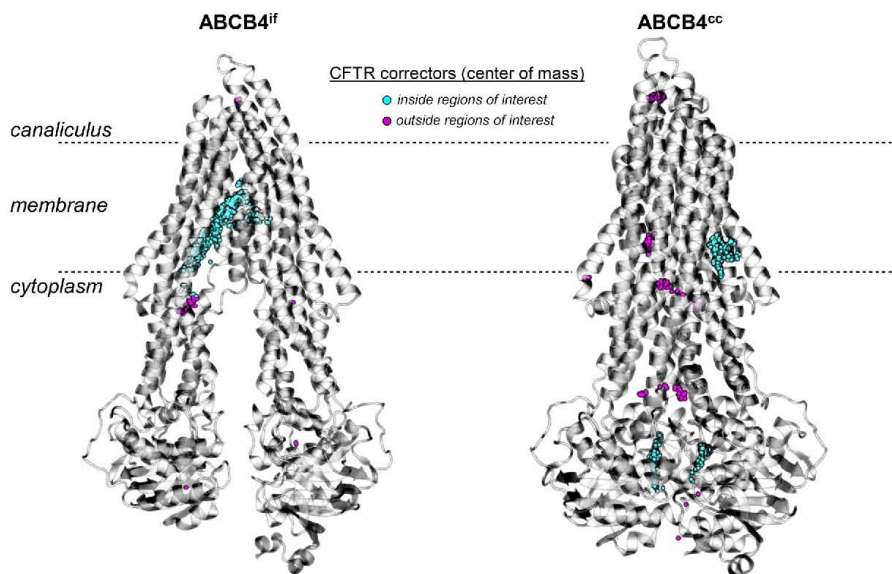
Ben Saad et al., Supplementary information

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Supplementary Figure S1. Sequence alignment of human ABCB4 and human ABCB1.**  
The protein sequences of human ABCB4 (NP\_000434.1) and ABCB1 (NP\_000918.2) were aligned using the Uniprot alignment tool (<https://www.uniprot.org/align/>) and represented using Jalview software (<https://www.jalview.org/>). Conservation of residues are represented as follows: \*, identical; # similar. Residues with contact rates  $\geq 50\%$  and  $\geq 90\%$  (see Fig. 5B-C) are highlighted in orange and red, respectively. Residues in grey (N- and C-terminal domains and L<sub>1</sub>-linker) were not considered in the 3D models.

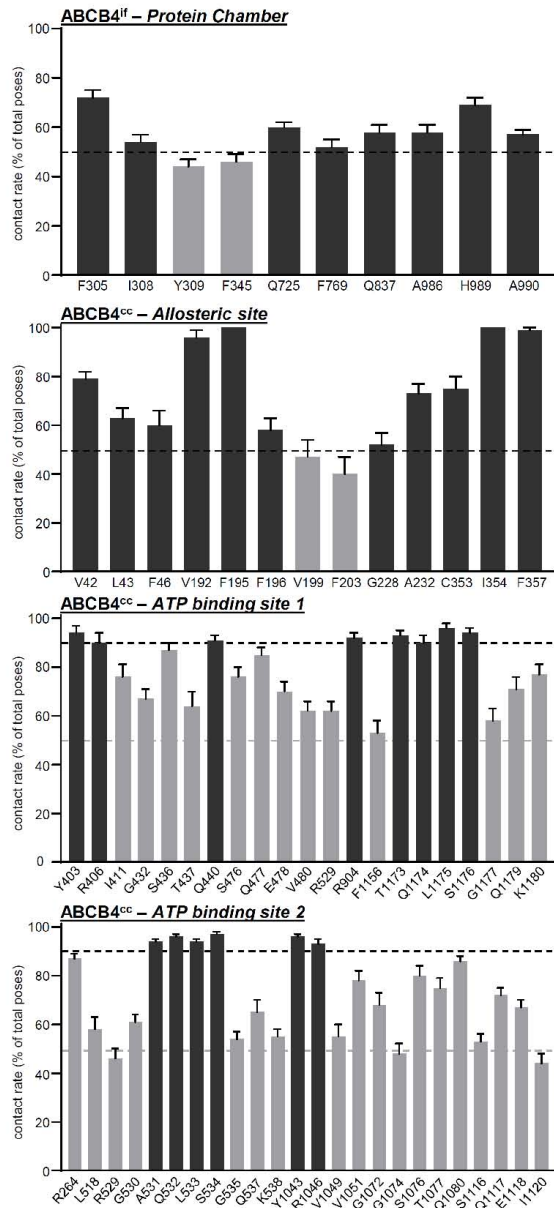
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Supplementary Figure S2. *In silico* molecular docking of CFTR correctors into ABCB4<sup>if</sup> and ABCB4<sup>cc</sup>.** Blind molecular docking simulations with CFTR correctors shown in Supplementary Table S1 were performed using the two indicated conformations of ABCB4 (see *Materials and Methods* for details). Four hundred poses from 20 independent simulations are displayed for each corrector. For the sake of clarity, only the corrector centers of mass are represented and color-coded according to their localization inside or outside the regions defined in Supplementary Table S2. Results from these analyses are summarized in Supplementary Table S3.

*Ben Saad et al., Supplementary information*

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



**Supplementary Figure S3. Contact rate of ABCB4 residues with CFTR correctors.** The contact rates of ABCB4 residues identified in Figure 5B with all correctors shown in Supplementary Table S1 are represented. Dash lines indicate the cut-offs chosen for considering the involvement of the residues. Means ( $\pm$  SEM) of 20 independent simulations per CFTR corrector are shown.

## SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Lee J, Patel DS, Ståhle J, et al. CHARMM-GUI Membrane Builder for Complex Biological Membrane Simulations with Glycolipids and Lipoglycans. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2019;15(1):775-786.
2. Jo S, Kim T, Im W. Automated Builder and Database of Protein/Membrane Complexes for Molecular Dynamics Simulations. *PLOS ONE*. 2007;2(9):e880.
3. Jo S, Kim T, Iyer VG, Im W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*. 2008;29(11):1859-1865.
4. Jo S, Lim JB, Klauda JB, Im W. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophysical Journal*. 2009;97(1):50-58.
5. D.A. Case, I.Y. Ben-Shalom, S.R. Brozell, et al. AMBER 2018. *University of California, San Francisco* 2018.
6. Skjevik AA, Madej BD, Dickson CJ, Teigen K, Walker RC, Gould IR. All-atom lipid bilayer self-assembly with the AMBER and CHARMM lipid force fields. *Chemical Communications*. 2015;51(21):4402-4405.
7. Dickson CJ, Madej BD, Skjevik AA, et al. Lipid14: The Amber Lipid Force Field. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2014;10(2):865-879.
8. Salomon-Ferrer R, Case DA, Walker RC. An overview of the Amber biomolecular simulation package. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 2013;3(2):198-210.
9. Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*. 2018;47(D1):D1102-D1109.
10. Zhao Y, Truhlar D. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)*. 2008;120(1):215-241.
11. Roe DR, Cheatham TE. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2013;9(7):3084-3095.
12. Nguyen H, Roe DR, Swails J, Case DA. Pytraj. 2015; <https://github.com/Amber-MD/pytraj>.
13. Walt Svd, Colbert SC, Varoquaux G. The NumPy Array: A Structure for Efficient Numerical Computation. *Computing in Science & Engineering*. 2011;13(2):22-30.
14. Oliphant T. *Guide to Numpy*. Trelgol Publishing USA; 2006.
15. Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering*. 2007;9(3):90-95.
16. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 1996;14:33-38.
17. Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, et al. Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest*. 2005;115(9):2564-2571.

*Ben Saad et al., Supplementary information*

- 1  
2  
3 18. Vertex Pharmaceuticals™ (<https://www.vrtx.com/>).
- 4  
5 19. Van Goor F, Straley KS, Cao D, et al. Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating  
6 in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung*  
7 *Cell Mol Physiol.* 2006;290(6):L1117-1130.
- 8  
9 20. Hirth BH, Qiao S, Cuff LM, et al. Discovery of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-  
10 carboxylic acid diamides that increase CFTR mediated chloride transport. *Bioorg Med*  
11 *Chem Lett.* 2005;15(8):2087-2091.
- 12  
13 21. Robert R, Carlile GW, Pavel C, et al. Structural analog of sildenafil identified as a novel  
14 corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Mol Pharmacol.* 2008;73(2):478-489.
- 15  
16 22. Yoo CL, Yu GJ, Yang B, Robins LI, Verkman AS, Kurth MJ. 4'-Methyl-4,5'-bithiazole-  
17 based correctors of defective delta F508-CFTR cellular processing. *Bioorg Med Chem*  
18 *Lett.* 2008;18(8):2610-2614.
- 19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

## **Deuxième partie : RAB10, un nouveau partenaire potentiel d'ABCB4**

Les mécanismes moléculaires qui régulent la biosynthèse, le trafic, la stabilité et l'activité d'ABCB4 restent mal connus. Pour clarifier certains de ces mécanismes, dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressée à l'identification des nouveaux partenaires moléculaires d'ABCB4 par une approche protéomique. Parmi les protéines identifiées, RAB10 a été détectée comme partenaire potentiel.

### **1. Matériels et méthodes**

#### **1-1. Immunoprécipitation d'ABCB4 et analyse par spectrométrie de masse**

A partir de lysats d'hépatocytes primaires humains et de cellules HEK exprimant stablement ABCB4, ABCB4 a été immunoprécipité en utilisant 0,5 µg d'anticorps anti-ABCB4 (P3II-26 – Enzo Life Sciences). Les lysats ont ensuite été incubés avec 40 µl de billes de Protéine A-Sépharose (GE Healthcare) durant toute la nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, les complexes protéiques ont été élués à partir des billes avec un tampon contenant 50 mM de Tris-HCl pH 8.5 et 2% SDS. 30% de l'immunoprécipitat a été utilisé au laboratoire pour l'analyse sur gel et les 70% restants ont été analysés par spectrométrie de masse en collaboration avec la plateforme protéomique 3P5 (François Guillonnet et Patrick Mayeux, Institut Cochin, Paris). Le système utilisé est constitué d'une chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem nLC-ESI-MS/MS (Nanoflow Liquid Chromatography – ElectroSpray Ionisation – Tandem Mass Spectrometry, Thermo Fisher Scientific). Les échantillons ont été dans un premier temps digérés par la trypsine puis séparés par chromatographie en phase liquide. Les peptides ainsi générés ont été analysés par un spectromètre de masse en tandem LTQ-Orbitrap équipé d'une trappe ionique linéaire et d'un piège à ions électrostatique (Lahouassa et al. 2016). Enfin, les données obtenues ont été comparées avec des banques de données protéiques afin d'identifier les partenaires potentiels d'ABCB4. Plusieurs conditions contrôles (comme des cellules n'exprimant pas ABCB4, le tampon de lyse sans lysat cellulaire et l'utilisation d'IgGs non spécifiques (BioLegend)) ont également été intégrées dans cette analyse pour limiter au maximum les faux positifs.



## **1-2. Plasmides et ARN interférants**

Pour étudier le rôle régulateur de RAB10 sur ABCB4, différentes constructions de RAB10 taguées avec la GFP ont été utilisées : la forme sauvage (RAB10-WT) ainsi que les formes dominante active (RAB10-Q68L, liée au GTP) et négative (RAB10-T23N, liée au GDP). Ces constructions ont été obtenues de la part de Mark McNiven (Département de biochimie et biologie moléculaire, Mayo clinique, Rochester, USA) (Li and Schulze 2016). Le plasmide GFP-C1 a également été utilisé comme contrôle. Pour l'extinction de l'expression de RAB10, des ARN interférants (siRNAs) ciblant spécifiquement cette protéine RAB ont été utilisés, 'One-Targetplus Human RAB10 siRNA SMARTpool' (Dharmacon-GE Healthcare). Le siRNA 'On-Targetplus Non-targeting Control Pool ' a été aussi utilisé comme contrôle. L'analyse de l'expression d'ABCB4 dans les modèles cellulaires a été effectuée comme décrit précédemment, à l'aide du plasmide pcDNA3-ABCB4 (Delaunay et al. 2009 ; Vauthier et al. 2019).

## **1-3. Modèles cellulaires, transfection et anticorps**

Deux lignées cellulaires ont été utilisées dans cette étude, les cellules HEK et les cellules HeLa. Les cellules ont été co-transfectées avec les plasmides permettant l'expression d'ABCB4 et de RAB10 pour un ratio 1/1 avec du Turbofect (Thermo Fisher Scientific), selon les indications du fournisseur. Pour les siRNAs, une quantité de 75 pmol/mL a été délivrée dans les cellules en utilisant du Jet Prime (Ozyme). Les différents anticorps primaires utilisés sont les suivants : anti-ABCB4 (P3II-26, Enzo Life Sciences), anti-RAB10 (D36C4, Cell Signaling), anti-GFP, anti-Calnexine (SPA-865, Enzo Life Sciences), anti-Giantine (PRB-114C, Covance), anti-EEA-1 (Sc-6415, Santa Cruz Biotechnology), anti-Lamp-1 (sc-20011, Santa Cruz Biotechnology) et anti-Tubuline (1E4C11, ProteinTech).

## **1-4. Immunoblot et immunofluorescence**

Pour les expériences d'immunoblot, les cellules HEK ont été lysées dans un tampon contenant 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA ainsi que des inhibiteurs de protéases (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma). Les échantillons ont été ensuite séparés par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), transférés sur une membrane de nitrocellulose puis incubés avec les anticorps adéquats. Les cellules HeLa ont été utilisées pour les expériences d'immunomarquage, elles ont été cultivées sur des lamelles, transfectées avec les différentes constructions ou avec des siRNAs puis fixées avec 4% paraformaldéhyde (PFA, Thermo

Fisher Scientific), saturées avec 0.2% sérum albumine bovine (BSA) et perméabilisées avec 0,05% saponine. Après leur incubation avec les anticorps primaires et secondaires, les échantillons ont été montés sur lames puis observées avec un microscope à épifluorescence Olympus IX83 équipé d'un objectif à immersion 63x/1.4 oil, comme décrit précédemment (Vauthier et al. 2019).

### **1-5. Invalidation de RAB10 par la technologie CRISPR/Cas9**

Des cellules HEK et HeLa invalidées pour RAB10 ont été générées par la technologie CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) comme précédemment décrit (Ran et al. 2013). Le plasmide pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459, Addgene) complexé à l'ARN guide complémentaire à RAB10 (dont la séquence est sens 5'-CACCGCGTACGTCTTCTTCGCCATT-3' et anti-sens 5'-AAACAATGGCGAAGAAGACGTACGC - 3') a été transfecté dans les cellules. Les cellules positives ont été ensuite sélectionnées en présence de 2 µg/mL puromycine (Gibco).

## 2. Résultats obtenus

### 2-1. Identification de RAB10 comme partenaire d'ABCB4

Afin d'identifier et caractériser de nouveaux partenaires moléculaires d'ABCB4, une approche d'immunoprécipitation combinée à une analyse en spectrométrie de masse a été utilisée. Cette approche nous a permis d'identifier 1220 protéines totales dont 14 d'entre-elles potentiellement spécifiques à ABCB4 (Tableau 2).

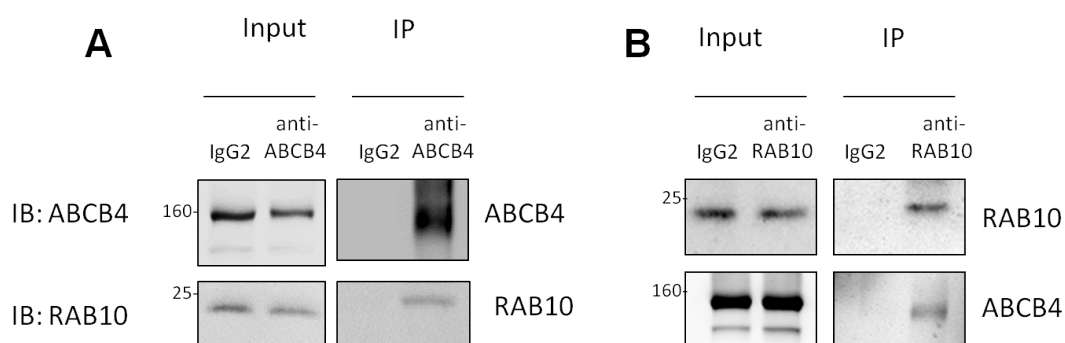
<b>Protéines identifiées</b>	<b>Fonctions</b>
CAP guanine-méthyltransférase	Ajout de coiffe sur l'ARNm
Nucleolar GTP-binding protein 2	GTPase associée à la sous unité 60S
Polyadenylation factor FIP1	Polyadénylation des ARNm
Protein glycosyltransferase DAD1	Glycosylation des protéines
DnajC8 (Hsp40)	Chaperonne moléculaire
RAB10	Trafic intracellulaire
RAB13	Trafic intracellulaire
Gamma-taxilin	Trafic intracellulaire
S-phase Kinase associated protein 1	Ubiquitine ligase SCF
GTP-binding protein Rheb	Activateur de mTOR
Pyruvate deshydrogenase	Catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA
Short chain deshydrogenase 3	Catalyse la réduction de rétinol
Synaptic functional regulator FMR1	Développement neuronal
RAI3 (Retinoic acid induced protein 3)	Plusieurs rôles dont l'interaction entre l'acide rétinoïque et les protéines G

**Tableau 2 : Les différents partenaires potentiels d'ABCB4.** Les protéines présentées dans ce tableau ont été sélectionnées selon deux critères ; non détectées dans les conditions contrôles (les lysats de cellules n'exprimant pas ABCB4, le tampon de lyse sans lysat cellulaire ou les immunoprécipitats d'IgG2) et au moins deux de leur peptide ont été détectés dans les immunoprécipitats issus de cellules exprimant ABCB4.

Parmi les protéines identifiées, certaines sont impliquées dans la biosynthèse et le repliement protéique, la glycosylation, la dégradation ainsi que le trafic intracellulaire. Comme dans la première partie de ma thèse je me suis intéressée à la correction du trafic des variants de classe II d'ABCB4, je voulais étudier et mieux comprendre les mécanismes régulant le trafic d'ABCB4. Pour cela, je me suis focalisée particulièrement sur la petite GTPase RAB10, une protéine qui joue un rôle clé dans le trafic intracellulaire (Chua and Tang 2018). J'ai donc exploré l'effet de la surexpression et l'extinction de cette RAB sur l'expression, localisation et la fonction d'ABCB4.

## 2-2. Validation de l'interaction entre RAB10 et ABCB4

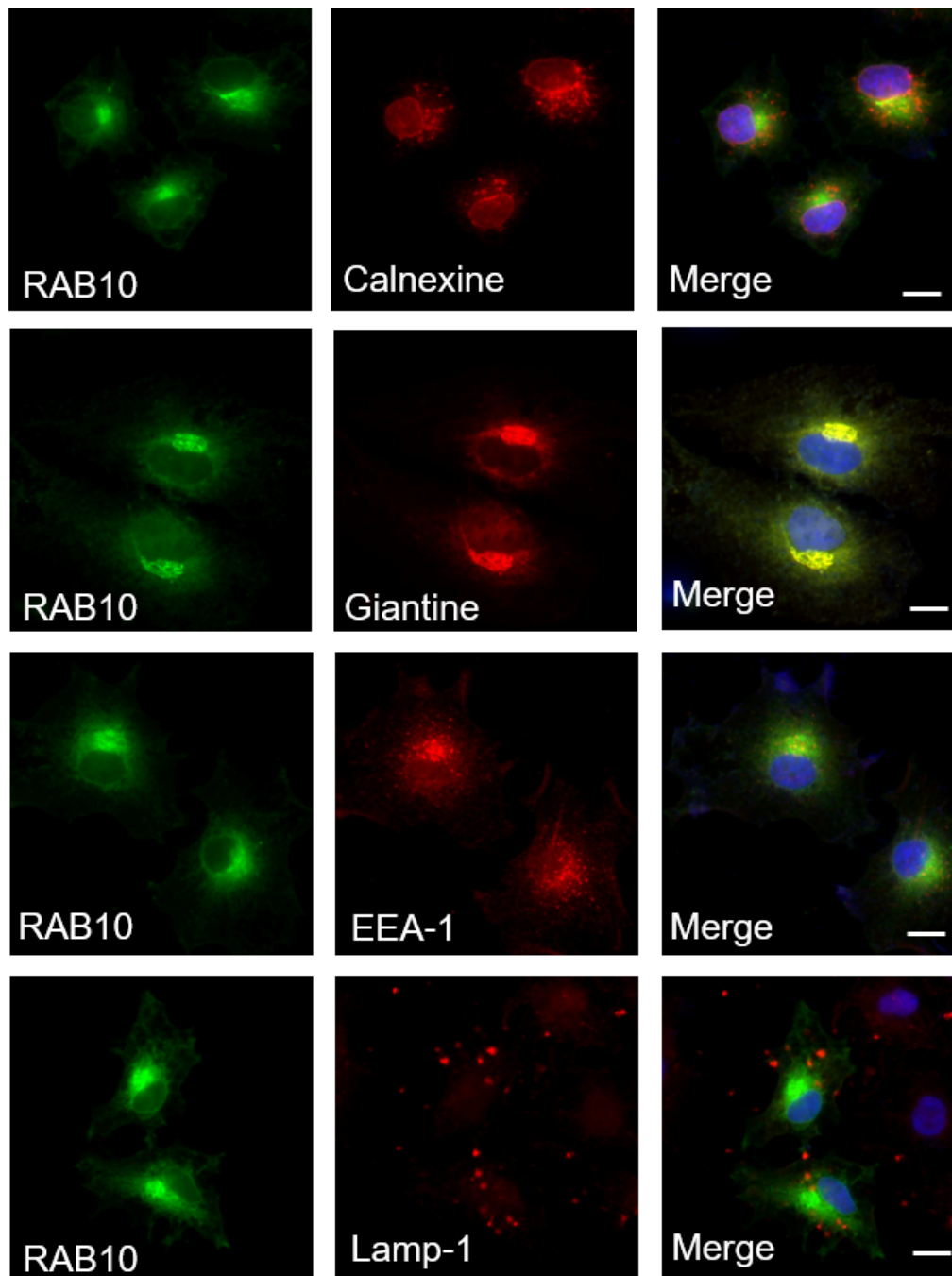
Pour valider l'interaction entre ABCB4 et RAB10, une approche de co-immunoprécipitation a été entreprise dans des hépatocytes humains. Comme présenté dans la figure 27A, en immunoprécipitant ABCB4, RAB10 a été bien détectée dans les complexes immunoprécipités et inversement (Figure 27B). Ces résultats ont donc confirmé l'interaction entre ABCB4 et RAB10.



**Figure 27 : Co-immunoprécipitation d'ABCB4 et RAB10 dans des hépatocytes humains.** (A) Immunoprécipitation d'ABCB4 puis RAB10 a été révélée par immunoblot. (B) Immunoprécipitation de RAB10 et révélation d'ABCB4 par immunoblot.

## 2-3. Localisation de RAB10 dans nos modèles cellulaires

D'après la littérature scientifique, RAB10 peut adopter plusieurs localisations intracellulaires (voir Introduction, section II-2-6-2-2). Cette protéine a été détectée au niveau du RE, de l'appareil de Golgi et des endosomes. Avant d'étudier son rôle régulateur sur ABCB4, j'ai vérifié la localisation de RAB10 dans nos modèles cellulaires. En utilisant des cellules HeLa transfectées par RAB10-WT tagué GFP et les marqueurs de différents compartiments intracellulaires, j'ai pu montrer que RAB10 est localisé au niveau de l'appareil de Golgi, colocalisant majoritairement avec la Giantine (Figure 28).

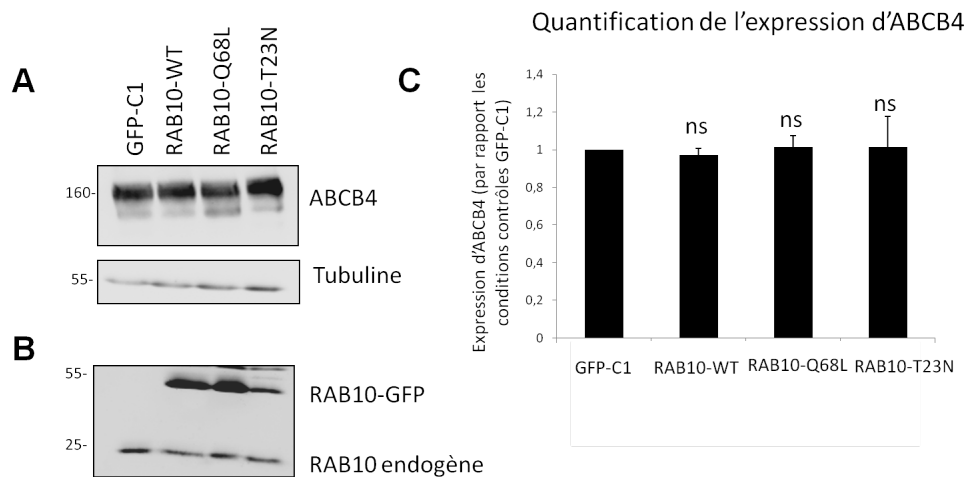


**Figure 22 : Localisation de RAB10.** Des cellules HeLa transfectées par la forme RAB10-WT ont été utilisées. RAB10 est marquée en vert et les marqueurs des différents compartiments intracellulaires en rouge. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI). La coloration jaune témoigne d'une colocalisation des marqueurs rouges et verts. La calnexine a été utilisée comme marqueur du RE, la Giantine pour marquer l'appareil de Golgi, EEA-1 pour les endosomes précoces et Lamp-1 pour les endosomes tardifs/lysosomes. Barres : 10  $\mu$ m.

#### 2-4. Effet de la surexpression de RAB10 sur l'expression d'ABCB4

J'ai ensuite évalué l'effet de la surexpression de différentes formes de RAB10 (WT, la forme constitutivement active Q68L ou la forme dominante inactive T23N) sur l'expression d'ABCB4 par immunoblot. Des cellules HEK co-transfectées avec ABCB4 et les différentes

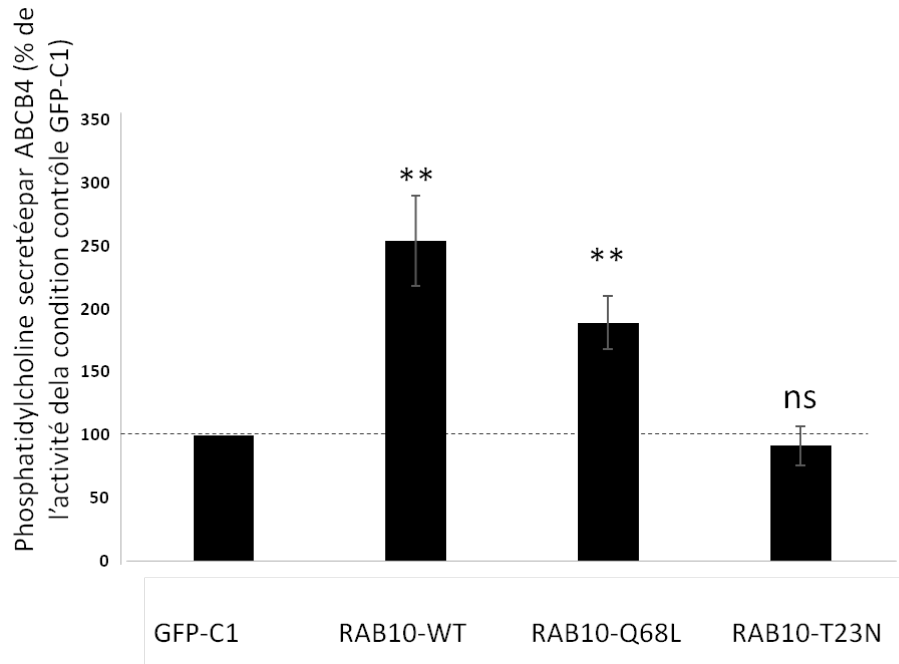
formes de RAB10 ou GFP-C1 (utilisé comme contrôle pour mimer les conditions de co-transfection dans les cellules) ont été utilisées. La figure 29A montre l'expression d'ABCB4 et la figure 29B présente l'expression de RAB10 et ses différentes formes. L'analyse densitométrique de ces résultats indique que le niveau d'expression d'ABCB4 n'est pas significativement modifié, quelle que soit la forme surexprimée de RAB10 (Figure 29C). Il semble donc que RAB10 n'affecte pas le niveau d'expression total d'ABCB4.



**Figure 23 : Effet de la surexpression de différentes formes de RAB10 sur l'expression d'ABCB4.** Des cellules HEK co-exprimant RAB10 ou ses formes dominantes active ou inactive ainsi qu'ABCB4 ont été utilisées. (A) Expression de RAB10, un anticorps anti-RAB10 a été utilisé pour la révélation. (B) Expression d'ABCB4, la tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (C) Quantification de l'expression d'ABCB4 à partir de (A) ; les moyennes ( $\pm$  SEM) de trois expériences indépendantes sont représentées. ns : non significatif.

## 2-5. Effet de la surexpression de RAB10 et ses différentes formes sur la fonction d'ABCB4

Par la suite, l'effet de la surexpression de RAB10 sur l'activité d'ABCB4 a été étudié. J'ai dosé la PC sécrétée par des cellules HEK co-transfectées avec ABCB4 et les différentes formes de RAB10 (ou la construction GFP-C1 utilisée comme contrôle). De manière intéressante, une augmentation significative de la quantité de PC sécrétée par ABCB4 a été observée suite à la surexpression soit de la forme sauvage soit de la forme constitutivement active Q68L de RAB10 comparée à la condition contrôle. Cette augmentation d'activité d'ABCB4 n'a pas été observée après la surexpression de la forme inactive RAB10-T23N (Figure 30).

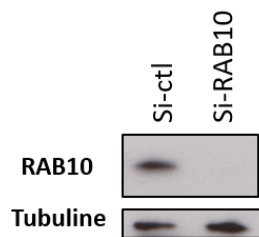


**Figure 30 : Dosage de PC secrétée par des cellules co-transfectées avec ABCB4 et les différentes formes de RAB10.** La PC secrétée par ces cellules a été mesurée par un dosage fluo-enzymatique précédemment décrit (Gautherot et al. 2014). Les moyennes ( $\pm$ SEM) de 3 expériences indépendantes sont représentées comme un pourcentage de l'activité de la condition contrôle (GFP-C1). \*\*,  $p < 0.01$ .

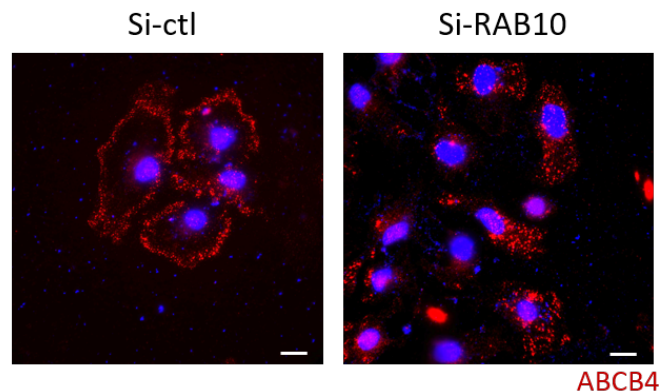
## 2-6. Effet de l'extinction de RAB10 sur la localisation d'ABCB4

Pour expliquer les précédents résultats, nous suggérons que RAB10 régule la fonction d'ABCB4 de façon indirecte en agissant sur son adressage à la membrane. Pour vérifier notre hypothèse, j'ai étudié l'effet de l'extinction de RAB10 sur la localisation d'ABCB4 par une approche d'immunofluorescence. Des cellules HeLa dont l'expression endogène de RAB10 a été inhibée par des ARN interférents spécifiques ont été utilisées (Figure 31A). Les résultats d'immunofluorescence présentés en figure 31B indiquent qu'ABCB4, marqué en rouge, est détecté au niveau des membranes des cellules dans les conditions contrôles et qu'il présente une expression intracellulaire suite à l'extinction de RAB10. L'extinction de RAB10 dérégule la localisation membranaire d'ABCB4. Ces résultats semblent donc confirmer notre hypothèse et RAB10 pourrait être impliquée dans l'adressage d'ABCB4 à la membrane plasmique.

## A Expression de RAB10



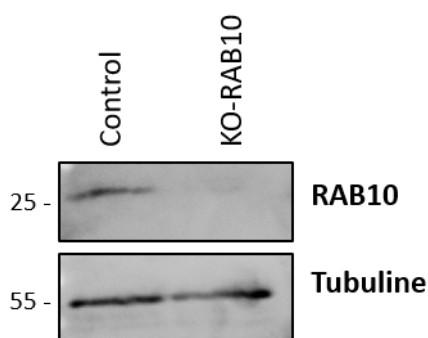
## B Localisation d'ABCB4



**Figure 31 : Etude de la localisation d'ABCB4 suite à l'extinction de RAB10.** Des cellules HeLa exprimant ABCB4 et transfectées par des ARN interférents spécifiques à RAB10 (Si-RAB10) ou contrôles (Si-ctrl) ont été utilisées. (A) Analyse de l'expression de RAB10 par immunoblot. La tubuline est utilisée comme contrôle de charge. (B) Immunolocalisation d'ABCB4 (rouge). Les noyaux sont marqués en bleu. Barres : 10 μm.

## 2-7. Développement d'un modèle cellulaire RAB10 KO par la technologie CRISPR/Cas9

Pour mieux étudier l'effet de l'extinction de RAB10 sur la localisation et la fonction d'ABCB4, des cellules HEK invalidées pour RAB10 de façon stable ont été générés par la technologie CRISPR/Cas9. Pour valider ce modèle, l'expression de RAB10 a été vérifiée par immunoblot. Comme présenté dans la figure 32, l'expression de RAB10 a été éteinte dans ces cellules par rapport à la condition contrôle. L'utilisation de ce modèle CRISPR/Cas9 dans les expériences d'immunofluorescence et de dosage de PC permettra d'approfondir l'étude du rôle régulateur de RAB10 sur ABCB4 en facilitant les procédures expérimentales, en évitant l'utilisation répétée des siRNAs anti-RAB10 et en facilitant la reproductibilité de nos résultats.



**Figure 32 : Validation du modèle cellulaire HEK-RAB10-KO.** Etude de l'expression de RAB10 par immunoblot dans des cellules HEK contrôles et cellules RAB10-KO en utilisant la technologie CRISPR/Cas9. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge



## **-DISCUSSION-**

Les travaux menés au cours de ma thèse ont été consacrés à l'étude du transporteur biliaire ABCB4. Ils ont permis d'une part d'identifier de nouvelles petites molécules correctrices pour les variants de classe II d'ABCB4 retenus dans le RE et d'autre part d'apporter de nouvelles connaissances quant aux acteurs moléculaires régulant le trafic et la fonction de ce transporteur.

### **Première partie : Identification de correcteurs pour les variants retenus d'ABCB4**

La classe II des variants d'ABCB4 regroupe les variants présentant un défaut de repliement et une rétention intracellulaire. La possibilité de corriger l'adressage membranaire de certains de ces variants par l'abaissement de la température ou par des moyens pharmacologiques (comme la CsA et le 4-PBA) a déjà été démontrée (Delaunay et al. 2009 ; Gautherot et al. 2012 ; Gordo-Gilart et al. 2016). Cependant, l'effet inhibiteur de la CsA sur la fonction d'ABCB4, la biodisponibilité et la forte concentration de 4-PBA utilisée constituent des limitations majeures à leur utilisation en clinique (Andress et al. 2014 ; Gordo-Gilart et al. 2016). Dans le but d'identifier d'autres molécules correctrices pour ce groupe de variants, plusieurs correcteurs candidats de CFTR ont été évalués. Les expériences menées au cours de la première partie de ma thèse ont permis de montrer que certains correcteurs de CFTR, notamment la roscovitine et ses analogues, les composés C10, C13, C17 et les combinaisons C3+C18 et C4+C18 sont capables de corriger la maturation ainsi que l'expression canaliculaire de quatre variants retenus d'ABCB4 (I541F, I490T, R545H et L556R).

La roscovitine, une molécule inhibitrice de protéines kinases dépendantes des cyclines, a été identifiée dans un petit crible comme correctrice du variant  $\Delta F508$  de CFTR (Norez et al. 2006). Selon Norez et ses collègues, cette molécule corrige le trafic de CFTR- $\Delta F508$  indépendamment de son effet sur les kinases, en modulant l'interaction du transporteur mal replié avec la calnexine et en inhibant le système de dégradation ERAD (Norez et al. 2006). Dans notre étude, la roscovitine a également montré un effet correcteur potentiel sur le variant I541F d'ABCB4. Des formes matures et canaliculaires de ce variant ont été détectées suite à un traitement avec cette molécule. Cependant, dans nos modèles cellulaires, la roscovitine a présenté une forte cytotoxicité ainsi qu'un effet inhibiteur dépendant de la dose sur la fonction d'ABCB4. En collaboration avec le Dr Laurent Meijer de ManRos Therapeutics, des

analogues structuraux de la roscovitine, moins toxiques et moins inhibiteurs, ont été élaborés. Trois composés des analogues générés, nommés MRT2-235, MRT2-237 et MRT2-243, ont permis de restaurer partiellement la maturation, la localisation membranaire et de manière encore plus intéressante la fonction de trois variants retenus d'ABCB4 (I541F, I490T et L556R) (Vauthier et al. 2019).

En plus de la roscovitine et de ses analogues, cette étude a permis de mettre en évidence l'effet correcteur potentiel d'autres composés, identifiés lors de criblages à haut débit réalisés pour le variant CFTR- $\Delta$ F508, sur les variants retenus d'ABCB4. En effet, la maturation et la relocalisation membranaire de quatre variants d'ABCB4 ont été corrigées par les composés C10, C13 et C17 ainsi que les combinaisons de C18 avec C3 ou C18 avec C4. Les composés C4, C13 et C17 appartiennent à la famille des thiazoles, ils sont les premiers correcteurs identifiés par criblage à haut débit pour CFTR (Spanò et al. 2019). Ces trois composés ont également montré un effet correcteur sur plusieurs variants déficients d'autres protéines comme le transporteur ABCA3 (Kinting et al. 2018), la flippase ATP8B1 (van der Woerd et al. 2016) ainsi que l' $\alpha$ -sarcoglycane (Carotti et al. 2018). Le composé C10 est un dérivé du sildénafil, un médicament utilisé en clinique pour plusieurs indications (Robert et al. 2008). Les composés C3 et C18, appartenant respectivement à la famille des quinazolines et pyridines, ont été identifiés quant à eux par la compagnie Vertex Pharmaceuticals (Spanò et al. 2019). Ces différents correcteurs interfèrent cependant avec la sécrétion de PC d'ABCB4. En effet, un effet inhibiteur de ces composés sur la fonction floppase d'ABCB4 a été observé. Une explication possible des effets correcteurs de trafic mais inhibiteurs de fonction de ces composés observés sur ABCB4 pourrait être l'interaction directe de ces correcteurs avec le transporteur. Pour valider cette hypothèse, une approche de docking moléculaire *in silico* utilisant deux modèles structuraux d'ABCB4 (ABCB4 inward-facing et ABCB4 closed conformation) a été élaborée. Nous avons pu déterminer trois sites potentiels de fixation de ces composés sur ABCB4 (un site transmembranaire, un site allostérique ainsi que les sites de fixation d'ATP). L'analyse des sites potentiels d'interaction des correcteurs avec ABCB4 a montré l'implication des résidus His989, Ala990, Tyr403 et Tyr1043. Ces résidus jouent un rôle important dans la fonction d'ABCB4 (Degiorgio et al. 2014; Olsen et al. 2020). L'interaction des correcteurs de CFTR avec ces résidus clés d'ABCB4 constitue ainsi une piste à explorer vers la compréhension de l'inhibition de fonction du transporteur par ces molécules.

Lors de cette étude, nous avons montré la possibilité de corriger la maturation et le trafic de quatre variants retenus d'ABCB4 par plusieurs molécules appartenant à différentes familles chimiques (Spanò et al. 2019). Il semblerait donc que le repliement et le trafic de variants déficients d'ABCB4 puissent être restaurés par plusieurs mécanismes moléculaires distincts.

Le mécanisme d'action de la roscovitine et de ses analogues sur ABCB4 reste cependant non caractérisé. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour définir ces mécanismes. Il est intéressant de noter que les trois analogues de roscovitine (MRT2-235, MRT2-237 et MRT2-243) ont permis une restauration partielle de la fonction de variants d'ABCB4 relocalisés à la membrane. La combinaison des analogues de roscovitine avec un traitement potentiateur pourrait également améliorer l'activité d'ABCB4. De telles thérapies combinatoires ont été déjà décrites et approuvées pour les patients atteints de mucoviscidose. En effet, aujourd'hui plusieurs bithérapies et même des trithérapies combinant des correcteurs avec le potentiateur Ivacaftor/VX-770 sont utilisées en clinique comme les traitements ORKAMBI® et TRIKAFTA® (Deeks 2016; Hoy 2019). Il serait donc intéressant de tester, dans nos modèles cellulaires, l'effet de la combinaison des analogues de roscovitine avec l'Ivacaftor/VX-770 ou le nouveau potentiateur développé par Galapagos, le GLPG1837, sur les variants d'ABCB4. L'UDCA, décrit pour l'amélioration des symptômes des patients souffrant de maladies biliaires, pourrait également être utilisé en combinaison avec les analogues de roscovitine. En effet, chez des patients atteints de PFIC2, portant des variations génétiques *d'ABCB11*, la combinaison de l'UDCA avec le correcteur 4-PBA a montré un effet bénéfique sur la fonction d'ABCB11 ainsi qu'une amélioration des symptômes des patients (Gonzales et al. 2015). Par ailleurs, il faudrait également tester les analogues de roscovitine sur d'autres variants retenus d'ABCB4, comme G68R, A364V, L701P et A953D, situés dans d'autres régions du transporteur. Enfin, toujours en collaboration avec ManRos Therapeutics, il sera intéressant de tester de nouveaux analogues de roscovitine en visant de meilleurs rapports bénéfice/toxicité.

Malgré leur effet correcteur potentiel, les composés de la CFF (C3, C4, C10, C13, C17 et C18) ont montré une forte inhibition de la fonction floppase d'ABCB4. Ces effets inhibiteurs ont été observés même à des doses plus faibles (nos résultats non montrés). Un tel effet inhibiteur n'a été rapporté sur CFTR que dans une seule étude. En effet, Kim Chiaw et ses collègues ont montré que le composé C3 interfère et inhibe la fonction de CFTR (Kim Chiaw et al. 2010). Il serait alors intéressant d'obtenir plus d'informations quant à l'effet des

autres correcteurs disponibles auprès de la CFF sur l'activité de CFTR, afin de mieux comprendre l'inhibition de fonction induite par ces molécules.

Les expériences de docking *in silico* réalisées au cours de cette étude ont permis de suggérer des mécanismes d'action de ces composés et de prédire leurs sites potentiels d'interaction avec ABCB4. Pour confirmer ces sites d'interactions, il serait intéressant de compléter les analyses réalisées par des expériences de dynamique moléculaire. Au-delà de cette analyse, l'approche bio-informatique prédictive nous ouvre la voie à d'autres études. En effet, en collaboration avec l'équipe de Florent Di Meo avec qui nous avons déjà collaboré au cours de cette étude, nous allons pouvoir cribler des molécules de manière virtuelle, orienter l'optimisation chimique des molécules d'intérêt et modéliser les interactions de ces petites molécules avec le transporteur transmembranaire.

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur une approche de repositionnement. En effet, l'ensemble des molécules testées ont déjà été décrites et identifiées pour d'autres applications. De nos jours, le repositionnement des médicaments constitue une voie attractive pour plusieurs industries pharmaceutiques et présente de nombreux avantages comme celui de bénéficier de connaissances déjà acquises sur la molécule (dose, biodisponibilité, toxicité...) ou encore de réduire le délai et le coût de développement des médicaments. La combinaison de cette approche de repositionnement avec la chimie médicinale et les outils bio-informatiques prédictifs pourrait être un outil puissant pour élaborer et optimiser des nouvelles pharmacothérapies ciblées pour les patients atteints de pathologies biliaires liées à des défauts d'ABCB4. Parallèlement aux approches utilisées dans cette étude et en collaboration avec la plateforme de criblage de l'Institut Pasteur de Lille, un criblage à haut débit se basant sur des expériences d'immunofluorescence et de détection des formes membranaires d'ABCB4 a été effectué et a permis d'identifier de nouvelles molécules correctrices pour les variants retenus d'ABCB4. Ces analyses toujours en cours devraient permettre l'identification de nouvelles molécules à potentiel thérapeutique.

Enfin, il est primordial de valider l'efficacité des analogues de roscovitine *in vivo*. Nous disposons dans le laboratoire des souris *Abcb4*<sup>-/-</sup>, n'exprimant donc pas Abcb4. La réintroduction des différents variants d'ABCB4 humain chez ces souris, soit par une injection hydrodynamique des plasmides spécifiques comme précédemment décrit par Le Saux et ses collègues (Le Saux et al. 2011) soit par l'administration de vecteurs viraux (AAV8) comme récemment décrit (Aronson et al. 2019; Weber et al. 2019), permettrait d'évaluer l'impact des

composés identifiés sur la localisation (immunohistochimie sur des coupes de foie) et la sécrétion de PC dans la bile des variants d'ABCB4.

## **Deuxième partie : RAB10, un partenaire potentiel d'ABCB4**

L'élucidation des mécanismes moléculaires régulant le trafic et la fonction d'ABCB4 est fondamentale pour comprendre la biologie d'ABCB4 et développer de nouveaux traitements pour les patients atteints de pathologies associées à un défaut d'ABCB4. Durant ces dernières années, plusieurs protéines ont été décrites comme partenaires moléculaires d'ABCB4 comme HAX-1, MLC2a, RACK-1 et EBP50 (Chan et al. 2005; Ikebuchi et al. 2009; Ortiz et al. 2004; Venot et al. 2016). La majorité de ces protéines interagissent avec le domaine linker d'ABCB4 et ont été identifiées par une approche de double hybride utilisant ce domaine linker comme appât. Dans le but d'identifier de nouveaux partenaires moléculaires d'ABCB4, dans la deuxième partie de mon projet, une approche d'immunoprécipitation couplée à une analyse en spectrométrie de masse a été entreprise. Cette approche a permis d'identifier 14 partenaires potentiellement spécifiques à ABCB4 dont la petite GTPase RAB10. Appartenant à la famille des protéines RABs, cette protéine joue un rôle clé dans le trafic intracellulaire (Chua and Tang 2018).

Il est intéressant de noter que plusieurs membres de la famille des protéines RABs interagissent et contrôlent le trafic de nombreux transporteurs ABC. En effet, il a été montré que RAB4 et RAB5 interagissent avec ABCB1 et qu'ils régulent à la fois son adressage membranaire et son endocytose (Ferrándiz-Huertas, Fernández-Carvajal, and Ferrer-Montiel 2011 ; Fu et al. 2007). RAB11, localisée au niveau des endosomes de recyclage, colocalise avec ABCB11 et ABCC2 et contrôle leur recyclage et leur trafic vers la membrane (Wakabayashi, Lippincott-Schwartz, and Arias 2004 ; Park et al. 2014). RAB4, RAB5a, RAB7, RAB11 et RAB27a ont également été rapportés comme régulateurs du transporteur CFTR/ABCC7 (Farinha and Matos 2018).

Après la confirmation de l'interaction entre RAB10 et ABCB4 par des expériences de co-immunoprécipitation, le rôle régulateur de RAB10 sur ABCB4 a été étudié par des approches d'immunoblot et d'immunofluorescence. Nous avons pu montrer que la surexpression de RAB10-WT ou de sa forme constitutivement active (RAB10-Q68L) ne modifie pas l'expression totale d'ABCB4 mais permet une augmentation significative de la fonction du transporteur et que l'extinction de l'expression de RAB10 par des ARN interférents spécifiques modifie la localisation membranaire d'ABCB4. Ces résultats suggèrent que RAB10 serait impliquée dans la régulation de l'adressage d'ABCB4 vers la membrane plasmique. Parmi les fonctions décrites pour RAB10, son implication dans l'adressage de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique de plusieurs protéines,

notamment le transporteur de glucose GLUT4 et le récepteur TLR4 (Wang et al. 2010 ; Chen and Lippincott-Schwartz 2013). Un rôle similaire de RAB10 dans la régulation du trafic et de l'activité d'ABCB4 pourrait ainsi être envisagé.

Pour valider cette hypothèse plusieurs expériences supplémentaires seront nécessaires. Comme l'approche d'immunoblot n'a pas permis de détecter une différence d'expression d'ABCB4 après la surexpression des différentes formes de RAB10, il est possible que RAB10 ait plutôt un effet sur le ciblage canaliculaire d'ABCB4 et donc indirectement sur son activité comme mes résultats le suggèrent. Afin de tester cette hypothèse, il est envisageable d'utiliser d'autres approches qui permettent de quantifier séparément les proportions membranaires et intracellulaires d'ABCB4. Nous disposons dans le laboratoire de constructions d'ABCB4 avec un tag inséré dans sa première boucle extracellulaire (3xMyc ou FLAG). Ces constructions ont déjà été validées dans le cadre d'autres études de notre laboratoire ((Venot et al. 2016) ; criblage à haut débit réalisé en collaboration avec la plateforme de l'Institut Pasteur de Lille). Des expériences de marquage de surface, en utilisant un anticorps dirigé contre cette étiquette extracellulaire dans des modèles cellulaires non perméabilisées, nous permettront d'apprécier les formes membranaires d'ABCB4 et ainsi de comparer les proportions membranaires d'ABCB4 en fonction de la forme surexprimée de RAB10 (WT, Q68L ou T23N). Les expériences d'immunofluorescence réalisées dans les cellules invalidées pour RAB10 ayant montré une rétention intracellulaire d'ABCB4, nous envisageons d'identifier les compartiments de rétention d'ABCB4 en utilisant des marqueurs spécifiques des compartiments intracellulaires.

Pour mieux explorer l'effet de l'extinction de RAB10 sur ABCB4, j'ai élaboré des modèles cellulaires dont l'expression de RAB10 est stablement abolie par la technologie CRISPR/Cas9. Ces modèles seront utilisés pour confirmer et compléter les expériences des ARN interférents, étudier la localisation ainsi que la fonction de sécrétion de PC médiée par ABCB4.

Nous avons également observé qu'à la différence de l'augmentation d'activité d'ABCB4 induite par la surexpression de RAB10 WT ou la forme constitutivement active Q68L, la surexpression de la forme dominante-inactive T23N n'induit pas une baisse significative d'activité d'ABCB4. En effet, RAB10 présente une forte homologie avec RAB8 et RAB13 (Diekmann et al. 2011). Certaines études suggèrent qu'elle possède des rôles redondants avec RAB8 et RAB13 (Chua and Tang 2018). Pour résoudre ce point nous envisageons également d'inhiber leur expression en plus de celle de RAB10.

Un des inconvénients de l'approche d'immunoprécipitation utilisée dans cette étude est la détection de plusieurs partenaires potentiellement non spécifiques (faux positifs) (Béganton et al. 2019). En effet, sur les 1220 protéines détectées dans cette analyse seulement 14 partenaires ont été potentiellement spécifiques pour ABCB4. L'utilisation d'autres approches plus quantitatives telles que le SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture) permettrait d'identifier des partenaires de manière plus spécifique. Les résultats de notre approche pourraient aussi être recoupés avec ceux d'autres analyses telles que des cribles double hybride chez la levure ou des GST pull-downs en utilisant des fragments solubles de la protéine. Réciproquement aux faux-positifs, notre approche a peut-être généré des faux-négatifs, nous faisant passer à côté de certaines interactions pourtant essentielles au trafic et à la fonction d'ABCB4.

De plus, l'immunoprécipitation ne permet pas de fournir des informations sur le domaine d'interaction d'ABCB4 avec RAB10. Des expériences de co-immunoprécipitations utilisant des mutants délétés d'ABCB4 ou l'utilisation d'autres approches comme des GST pull downs avec des fragments solubles d'ABCB4 permettraient de définir ces domaines d'interactions. Il a été rapporté que RAB4 interagit avec le domaine C-terminal d'ABCB1 (Ferrándiz-Huertas, Fernández-Carvajal, and Ferrer-Montiel 2011). Comme le domaine C-terminal d'ABCB4 est très conservé et partage une forte homologie avec ABCB1 (van der Blik et al. 1988), il est possible que RAB10 interagisse également avec le domaine C-terminal d'ABCB4.

En plus de RAB10 d'autres nouveaux partenaires potentiels d'ABCB4 ont été détectés dans cette analyse (voir tableau 2), il serait donc intéressant de confirmer leur interaction avec ABCB4 ainsi que leur implication dans sa régulation. Des expériences de surexpression ou d'inactivation de ces nouveaux partenaires seront utiles pour caractériser leur rôle dans la régulation de l'expression, trafic et fonction d'ABCB4.

Enfin, il est intéressant de noter que chez plusieurs patients atteints de PFIC3, aucune mutation d'*ABCB4* n'a été mise en évidence (Jacquemin 2012). Des mutations de protéines qui régulent le trafic ou l'activité d'ABCB4 pourraient être à l'origine de PFIC3 inexplicables, démontrant ainsi l'importance d'étudier et de caractériser les différents partenaires d'ABCB4. Les partenaires identifiées pourraient également constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.



## **-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES-**

A l'heure actuelle, le seul traitement à long terme pour les patients atteints de formes graves de pathologies biliaires liées à un défaut d'ABCB4 reste la transplantation hépatique. Cependant, la disponibilité des greffons ainsi que les complications post-transplantation constituent les limitations majeures de cette thérapie. Il est donc essentiel d'élaborer des nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces patients. Il est évident qu'une meilleure compréhension du fonctionnement, des mécanismes et des acteurs moléculaires régulant ABCB4 sont fondamentales pour développer et proposer de nouvelles thérapies efficaces.

Dans une optique de médecine personnalisée, la première partie de ma thèse a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives pour traiter les patients atteints de pathologies associées à des variations génétiques affectant le trafic intracellulaire d'ABCB4 par des moyens pharmacologiques. En effet, nous avons pu montrer que plusieurs correcteurs de CFTR dont la roscovitine et certains de ses analogues, les composés C10, C13 et C17 ainsi que les combinaisons de C18 avec C3 ou C4 permettent de corriger la maturation et la localisation canaliculaire de quatre variants retenus d'ABCB4 (I541F, I490T, R545H et L556R). Certes, l'intérêt thérapeutique des composés CFF (C3, C4, C10, C13, C17 et C18) reste limité à cause de leur forte inhibition de l'activité d'ABCB4, néanmoins la compréhension de leur mécanisme d'action a apporté de nouvelles connaissances sur le fonctionnement d'ABCB4. Les trois analogues structuraux de roscovitine (MRT2-235, MRT2-237 et MRT2-243), quant à eux, constituent un espoir thérapeutique et une alternative intéressante à explorer. En effet, ces trois composés ont permis de restaurer partiellement la fonction de sécrétion de PC des variants relocalisés à la membrane plasmique. En clinique, le seul traitement médicamenteux proposé pour les patients atteints de pathologies biliaires associées à un défaut d'ABCB4 est l'UDCA. Son efficacité dépend néanmoins d'une fonction résiduelle d'ABCB4. L'administration des analogues de roscovitine pourrait permettre une restauration partielle de l'activité d'ABCB4, et ainsi une meilleure réponse à l'UDCA et par conséquent retarder ou éviter la transplantation hépatique.

La recherche et la proposition de nouvelles approches thérapeutiques pour les patients atteints de pathologies biliaires associées à un défaut d'ABCB4 doivent se baser sur une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'expression, trafic et le fonctionnement d'ABCB4. Dans la deuxième partie de ma thèse, nous avons pu identifier la petite GTPase RAB10 comme partenaire potentiel d'ABCB4. Nos résultats préliminaires indiquent que la

surexpression de RAB10 permet d'augmenter l'activité d'ABCB4 et au contraire son extinction dérégule la localisation membranaire de ce transporteur. Ces résultats suggèrent donc l'implication de RAB10 dans l'adressage d'ABCB4 à la membrane plasmique. Plusieurs expériences complémentaires sont cependant nécessaires afin de valider cette hypothèse et d'approfondir cette étude. Il serait intéressant d'étudier la localisation et la fonction d'ABCB4 dans les modèles cellulaires invalidés pour RAB10 par la technologie CRISPR/Cas9 et aussi d'étudier par des expériences d'immunofluorescences et par des marquages de surface, les proportions d'ABCB4 membranaire et intracellulaire suite à l'extinction ou la surexpression de RAB10.

Enfin, l'ensemble des travaux présentés dans cette étude ont permis d'apporter des connaissances nouvelles sur la biologie et le fonctionnement d'ABCB4 ainsi que d'ouvrir des perspectives pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients atteints de pathologies biliaires sévères liées à des déficits fonctionnels d'ABCB4.

## -RÉFÉRENCES-

- Admirand, W. H., and D. M. Small. 1968. 'The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man', *J Clin Invest*, 47: 1043-52.
- Agellon, L. B., C. J. Walkey, D. E. Vance, F. Kuipers, and H. J. Verkade. 1999. 'The unique acyl chain specificity of biliary phosphatidylcholines in mice is independent of their biosynthetic origin in the liver', *Hepatology*, 30: 725-9.
- Alam, A., J. Kowal, E. Broude, I. Roninson, and K. P. Locher. 2019. 'Structural insight into substrate and inhibitor discrimination by human P-glycoprotein', *Science*, 363: 753-56.
- Almughem, F. A., A. M. Aldossary, E. A. Tawfik, M. N. Alomary, W. S. Alharbi, M. Y. Alshahrani, and A. A. Alshehri. 2020. 'Cystic Fibrosis: Overview of the Current Development Trends and Innovative Therapeutic Strategies', *Pharmaceutics*, 12.
- Alton, E. W. F. W., D. K. Armstrong, D. Ashby, K. J. Bayfield, D. Bilton, E. V. Bloomfield, A. C. Boyd, J. Brand, R. Buchan, R. Calcedo, P. Carvelli, M. Chan, S. H. Cheng, D. D. S. Collie, S. Cunningham, H. E. Davidson, G. Davies, J. C. Davies, L. A. Davies, M. H. Dewar, A. Doherty, J. Donovan, N. S. Dwyer, H. I. Elgmati, R. F. Featherstone, J. Gavino, S. Gea-Sorli, D. M. Geddes, J. S. R. Gibson, D. R. Gill, A. P. Greening, U. Griesenbach, D. M. Hansell, K. Harman, T. E. Higgins, S. L. Hodges, S. C. Hyde, L. Hyndman, J. A. Innes, J. Jacob, N. Jones, B. F. Keogh, M. P. Limberis, P. Lloyd-Evans, A. W. Maclean, M. C. Manvell, D. McCormick, M. McGovern, G. McLachlan, C. Meng, M. A. Montero, H. Milligan, L. J. Moyce, G. D. Murray, A. G. Nicholson, T. Osadolor, J. Parra-Leiton, D. J. Porteous, I. A. Pringle, E. K. Punch, K. M. Pytel, A. L. Quittner, G. Rivellini, C. J. Saunders, R. K. Scheule, S. Sheard, N. J. Simmonds, K. Smith, S. N. Smith, N. Soussi, S. Soussi, E. J. Spearing, B. J. Stevenson, S. G. Sumner-Jones, M. Turkkila, R. P. Ureta, M. D. Waller, M. Y. Wasowicz, J. M. Wilson, and P. Wolstenholme-Hogg. 2015. 'Repeated nebulisation of non-viral CFTR gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial', *Lancet Respir Med*, 3: 684-91.
- Amzal, R., A. Thébaut, M. Lapalus, M. Almes, B. Grosse, E. Mareux, M. Collado-Hilly, A. Davit-Spraul, L. Bidou, O. Namy, E. Jacquemin, and E. Gonzales. 2020. 'Pharmacological premature termination codon readthrough of ABCB11 in bile salt export pump deficiency: an in vitro study', *Hepatology*.
- Andress, E. J., M. Nicolaou, M. R. Romero, S. Naik, P. H. Dixon, C. Williamson, and K. J. Linton. 2014. 'Molecular mechanistic explanation for the spectrum of cholestatic disease caused by the S320F variant of ABCB4', *Hepatology*, 59: 1921-31.
- Aronson, S. J., R. S. Bakker, X. Shi, S. Duijst, L. Ten Bloemendaal, D. R. de Waart, J. Verheij, G. Ronzitti, R. P. Oude Elferink, U. Beuers, C. C. Paulusma, and P. J. Bosma. 2019. 'Liver-directed gene therapy results in long-term correction of progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 in mice', *J Hepatol*, 71: 153-62.
- Babbey, C. M., N. Ahktar, E. Wang, C. C. Chen, B. D. Grant, and K. W. Dunn. 2006. 'Rab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized Madin-Darby canine kidney cells', *Mol Biol Cell*, 17: 3156-75.
- Babbey, C. M., R. L. Bacallao, and K. W. Dunn. 2010. 'Rab10 associates with primary cilia and the exocyst complex in renal epithelial cells', *Am J Physiol Renal Physiol*, 299: F495-506.
- Béganton, B., E. Coyaud, A. Mangé, and J. Solassol. 2019. '[New approaches for protein-protein interaction study]', *Med Sci (Paris)*, 35: 223-31.

- Biemans-Oldehinkel, E., M. K. Doeven, and B. Poolman. 2006. 'ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains', *FEBS Lett*, 580: 1023-35.
- Boyer, J. L. 2013. 'Bile formation and secretion', *Compr Physiol*, 3: 1035-78.
- Bruneau, Alix. 2019. 'Régulation de l'expression membranaire du transporteur de phospholipides biliaries ABCB4 : effet de mutations', *Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université*.
- Cabrera, D., J. P. Arab, and M. Arrese. 2019. 'UDCA, NorUDCA, and TUDCA in Liver Diseases: A Review of Their Mechanisms of Action and Clinical Applications', *Handb Exp Pharmacol*, 256: 237-64.
- Carotti, M., J. Marsolier, M. Soardi, E. Bianchini, C. Gomiero, C. Fecchio, S. F. Henriques, R. Betto, R. Sacchetto, I. Richard, and D. Sandonà. 2018. 'Repairing folding-defective  $\alpha$ -sarcoglycan mutants by CFTR correctors, a potential therapy for limb-girdle muscular dystrophy 2D', *Hum Mol Genet*, 27: 969-84.
- Chan, W., G. Calderon, A. L. Swift, J. Moseley, S. Li, H. Hosoya, I. M. Arias, and D. F. Ortiz. 2005. 'Myosin II regulatory light chain is required for trafficking of bile salt export protein to the apical membrane in Madin-Darby canine kidney cells', *J Biol Chem*, 280: 23741-7.
- Chavrier, P., M. Vingron, C. Sander, K. Simons, and M. Zerial. 1990. 'Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line', *Mol Cell Biol*, 10: 6578-85.
- Chen, Y., and J. Lippincott-Schwartz. 2013. 'Rab10 delivers GLUT4 storage vesicles to the plasma membrane', *Commun Integr Biol*, 6: e23779.
- Chen, Z., T. Shi, L. Zhang, P. Zhu, M. Deng, C. Huang, T. Hu, L. Jiang, and J. Li. 2016. 'Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade', *Cancer Lett*, 370: 153-64.
- Cheng, S. H., R. J. Gregory, J. Marshall, S. Paul, D. W. Souza, G. A. White, C. R. O'Riordan, and A. E. Smith. 1990. 'Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis', *Cell*, 63: 827-34.
- Chua, C. E. L., and B. L. Tang. 2018. 'Rab 10-a traffic controller in multiple cellular pathways and locations', *J Cell Physiol*, 233: 6483-94.
- Cole, L. K., J. E. Vance, and D. E. Vance. 2012. 'Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism', *Biochim Biophys Acta*, 1821: 754-61.
- Coleman, R. 1987. 'Biochemistry of bile secretion', *Biochem J*, 244: 249-61.
- Crawford, A. R., A. J. Smith, V. C. Hatch, R. P. Oude Elferink, P. Borst, and J. M. Crawford. 1997. 'Hepatic secretion of phospholipid vesicles in the mouse critically depends on mdr2 or MDR3 P-glycoprotein expression. Visualization by electron microscopy', *J Clin Invest*, 100: 2562-7.
- Czuba, L. C., K. M. Hillgren, and P. W. Swaan. 2018. 'Post-translational modifications of transporters', *Pharmacol Ther*, 192: 88-99.
- Davies, J. C., O. Van de Steen, S. van Koningsbruggen-Rietschel, P. Drevinek, N. Derichs, E. F. McKone, D. Kanters, L. Allamassey, F. Namour, H. de Kock, and K. Conrath. 2019. 'GLPG1837, a CFTR potentiator, in p.Gly551Asp (G551D)-CF patients: An open-label, single-arm, phase 2a study (SAPHIRA1)', *J Cyst Fibros*, 18: 693-99.
- Davit-Spraul, A., E. Gonzales, C. Baussan, and E. Jacquemin. 2009. 'Progressive familial intrahepatic cholestasis', *Orphanet J Rare Dis*, 4: 1.
- Dawson, P. A., and S. J. Karpen. 2015. 'Intestinal transport and metabolism of bile acids', *J Lipid Res*, 56: 1085-99.
- De Boeck, K., A. Munck, S. Walker, A. Faro, P. Hiatt, G. Gilmartin, and M. Higgins. 2014. 'Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation', *J Cyst Fibros*, 13: 674-80.

- De Vree, J. M., R. Ottenhoff, P. J. Bosma, A. J. Smith, J. Aten, and R. P. Oude Elferink. 2000. 'Correction of liver disease by hepatocyte transplantation in a mouse model of progressive familial intrahepatic cholestasis', *Gastroenterology*, 119: 1720-30.
- Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets. 2001. 'The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily', *Genome Res*, 11: 1156-66.
- Deeks, E. D. 2016. 'Lumacaftor/Ivacaftor: A Review in Cystic Fibrosis', *Drugs*, 76: 1191-201.
- Degiorgio, D., P. A. Corsetto, A. M. Rizzo, C. Colombo, M. Seia, L. Costantino, G. Montorfano, R. Tomaiuolo, D. Bordo, S. Sansanelli, M. Li, D. Tavian, M. P. Rastaldi, and D. A. Coviello. 2014. 'Two ABCB4 point mutations of strategic NBD-motifs do not prevent protein targeting to the plasma membrane but promote MDR3 dysfunction', *Eur J Hum Genet*, 22: 633-9.
- Delaunay, J. L., A. Bruneau, B. Hoffmann, A. M. Durand-Schneider, V. Barbu, E. Jacquemin, M. Maurice, C. Housset, I. Callebaut, and T. Ait-Slimane. 2017. 'Functional defect of variants in the adenosine triphosphate-binding sites of ABCB4 and their rescue by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator, ivacaftor (VX-770)', *Hepatology*, 65: 560-70.
- Delaunay, J. L., A. M. Durand-Schneider, D. Delautier, A. Rada, J. Gautherot, E. Jacquemin, T. Ait-Slimane, and M. Maurice. 2009. 'A missense mutation in ABCB4 gene involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 leads to a folding defect that can be rescued by low temperature', *Hepatology*, 49: 1218-27.
- Delaunay, J. L., A. M. Durand-Schneider, C. Dossier, T. Falguières, J. Gautherot, A. Davit-Spraul, T. Ait-Slimane, C. Housset, E. Jacquemin, and M. Maurice. 2016. 'A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3', *Hepatology*, 63: 1620-31.
- Deleuze, J. F., E. Jacquemin, C. Dubuisson, D. Cresteil, M. Dumont, S. Erlinger, O. Bernard, and M. Hadchouel. 1996. 'Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis', *Hepatology*, 23: 904-8.
- Di Ciaula, A., D. Q. Wang, L. Bonfrate, and P. Portincasa. 2013. 'Current views on genetics and epigenetics of cholesterol gallstone disease', *Cholesterol*, 2013: 298421.
- Díaz-Villanueva, J. F., R. Díaz-Molina, and V. García-González. 2015. 'Protein Folding and Mechanisms of Proteostasis', *Int J Mol Sci*, 16: 17193-230.
- Diekmann, Y., E. Seixas, M. Gouw, F. Tavares-Cadete, M. C. Seabra, and J. B. Pereira-Leal. 2011. 'Thousands of rab GTPases for the cell biologist', *PLoS Comput Biol*, 7: e1002217.
- Dijkers, A., and U. J. Tietge. 2010. 'Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC', *World J Gastroenterol*, 16: 5936-45.
- Dowling, R. H. 1973. 'The enterohepatic circulation of bile acids as they relate to lipid disorders', *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)*, 5: 59-67.
- Du, M., X. Liu, E. M. Welch, S. Hirawat, S. W. Peltz, and D. M. Bedwell. 2008. '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*, 105: 2064-9.
- English, A. R., and G. K. Voeltz. 2013. 'Rab10 GTPase regulates ER dynamics and morphology', *Nat Cell Biol*, 15: 169-78.
- Erlinger, S. 1982. 'Does Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-atpase have any role in bile secretion?', *Am J Physiol*, 243: G243-7.
- Esteller, A. 2008. 'Physiology of bile secretion', *World J Gastroenterol*, 14: 5641-9.
- Falguières, T., T. Ait-Slimane, C. Housset, and M. Maurice. 2014. 'ABCB4: Insights from pathobiology into therapy', *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 38: 557-63.
- Farinha, C. M., and P. Matos. 2018. 'Rab GTPases regulate the trafficking of channels and transporters - a focus on cystic fibrosis', *Small GTPases*, 9: 136-44.

- Ferrándiz-Huertas, C., A. Fernández-Carvajal, and A. Ferrer-Montiel. 2011. 'Rab4 interacts with the human P-glycoprotein and modulates its surface expression in multidrug resistant K562 cells', *Int J Cancer*, 128: 192-205.
- Fickert, P., and M. Wagner. 2017. 'Biliary bile acids in hepatobiliary injury - What is the link?', *J Hepatol*, 67: 619-31.
- Ford, R. C., and K. Beis. 2019. 'Learning the ABCs one at a time: structure and mechanism of ABC transporters', 47: 23-36.
- Froux, L., A. Elbahnsi, B. Boucherle, A. Billet, N. Baatallah, B. Hoffmann, J. Alliot, R. Zelli, W. Zeinyeh, R. Haudecoeur, B. Chevalier, A. Fortuné, S. Mirval, C. Simard, P. Lehn, J. P. Mornon, A. Hinzpeter, F. Becq, I. Callebaut, and J. L. Décout. 2020. 'Targeting different binding sites in the CFTR structures allows to synergistically potentiate channel activity', *Eur J Med Chem*, 190: 112116.
- Fu, D., E. M. van Dam, A. Brymora, I. G. Duggin, P. J. Robinson, and B. D. Roufogalis. 2007. 'The small GTPases Rab5 and RalA regulate intracellular traffic of P-glycoprotein', *Biochim Biophys Acta*, 1773: 1062-72.
- Ganne-Carrié, N., C. Baussan, V. Grando, J. Gaudelus, D. Cresteil, and E. Jacquemin. 2003. 'Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 revealed by oral contraceptive pills', *J Hepatol*, 38: 693-4.
- Gatmaitan, Z. C., A. T. Nies, and I. M. Arias. 1997. 'Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver', *Am J Physiol*, 272: G1041-9.
- Gautherot, J., T. Claudel, F. Cuperus, C. D. Fuchs, T. Falguières, and M. Trauner. 2018. 'Thyroid hormone receptor  $\beta$ 1 stimulates ABCB4 to increase biliary phosphatidylcholine excretion in mice', 59: 1610-19.
- Gautherot, J., D. Delautier, M. A. Maubert, T. Aït-Slimane, G. Bolbach, J. L. Delaunay, A. M. Durand-Schneider, D. Firrincieli, V. Barbu, N. Chignard, C. Housset, M. Maurice, and T. Falguières. 2014. 'Phosphorylation of ABCB4 impacts its function: insights from disease-causing mutations', *Hepatology*, 60: 610-21.
- Gautherot, J., A. M. Durand-Schneider, D. Delautier, J. L. Delaunay, A. Rada, J. Gabillet, C. Housset, M. Maurice, and T. Ait-Slimane. 2012. 'Effects of cellular, chemical, and pharmacological chaperones on the rescue of a trafficking-defective mutant of the ATP-binding cassette transporter proteins ABCB1/ABCB4', *J Biol Chem*, 287: 5070-8.
- Gautherot, Julien. 2012. 'Maturation et trafic intracellulaire du transporteur biliaire ABCB4 : effet des mutations', *Université Pierre et Marie - Paris VI*.
- Gonzales, E., B. Grosse, B. Schuller, A. Davit-Spraul, F. Conti, C. Guettier, D. Cassio, and E. Jacquemin. 2015. 'Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate', *Hepatology*, 62: 558-66.
- Gonzales, E., S. A. Taylor, A. Davit-Spraul, A. Thébaut, N. Thomassin, C. Guettier, P. F. Whittington, and E. Jacquemin. 2017. 'MYO5B mutations cause cholestasis with normal serum gamma-glutamyl transferase activity in children without microvillous inclusion disease', *Hepatology*, 65: 164-73.
- Gordo-Gilart, R., S. Andueza, L. Hierro, P. Jara, and L. Alvarez. 2016. 'Functional Rescue of Trafficking-Impaired ABCB4 Mutants by Chemical Chaperones', *PLoS One*, 11: e0150098.
- Gotthardt, D., H. Runz, V. Keitel, C. Fischer, C. Flechtenmacher, M. Wirtenberger, K. H. Weiss, S. Imparato, A. Braun, K. Hemminki, W. Stremmel, F. Rüschenhoff, A. Stiehl, R. Kubitz, B. Burwinkel, P. Schirmacher, A. S. Knisely, J. Zschocke, and P. Sauer. 2008. 'A mutation in the canalicular phospholipid transporter gene, ABCB4, is

- associated with cholestasis, ductopenia, and cirrhosis in adults', *Hepatology*, 48: 1157-66.
- Goubault, P., T. Brunel, A. Rode, B. Bancel, K. Mohkam, and J. Y. Mabrut. 2019. 'Low-Phospholipid Associated Cholelithiasis (LPAC) syndrome: A synthetic review', *J Visc Surg*, 156: 319-28.
- Groen, A., M. R. Romero, C. Kunne, S. J. Hoosdally, P. H. Dixon, C. Wooding, C. Williamson, J. Seppen, K. Van den Oever, K. S. Mok, C. C. Paulusma, K. J. Linton, and R. P. Oude Elferink. 2011. 'Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity', *Gastroenterology*, 141: 1927-37.e1-4.
- Hadida, S., F. Van Goor, J. Zhou, V. Arumugam, J. McCartney, A. Hazlewood, C. Decker, P. Negulescu, and P. D. Grootenhuus. 2014. 'Discovery of N-(2,4-di-tert-butyl-5-hydroxyphenyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide (VX-770, ivacaftor), a potent and orally bioavailable CFTR potentiator', *J Med Chem*, 57: 9776-95.
- Hagey, L. R., D. L. Crombie, E. Espinosa, M. C. Carey, H. Igimi, and A. F. Hofmann. 1993. 'Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores', *J Lipid Res*, 34: 1911-7.
- Hamoud, A. R., L. Weaver, D. E. Stec, and T. D. Hinds, Jr. 2018. 'Bilirubin in the Liver-Gut Signaling Axis', *Trends Endocrinol Metab*, 29: 140-50.
- He, H., F. Dai, L. Yu, X. She, Y. Zhao, J. Jiang, X. Chen, and S. Zhao. 2002. 'Identification and characterization of nine novel human small GTPases showing variable expressions in liver cancer tissues', *Gene Expr*, 10: 231-42.
- Hooiveld, G. J., T. A. Vos, G. L. Scheffer, H. Van Goor, H. Koning, V. Bloks, A. E. Loot, D. K. Meijer, P. L. Jansen, F. Kuipers, and M. Müller. 1999. '3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins) induce hepatic expression of the phospholipid translocase mdr2 in rats', *Gastroenterology*, 117: 678-87.
- Housset, C., Y. Chrétien, D. Debray, and N. Chignard. 2016. 'Functions of the Gallbladder', *Compr Physiol*, 6: 1549-77.
- Howard, M., R. A. Frizzell, and D. M. Bedwell. 1996. 'Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations', *Nat Med*, 2: 467-9.
- Hoy, S. M. 2019. 'Elexacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor: First Approval', *Drugs*, 79: 2001-07.
- Huang, L., A. Zhao, J. L. Lew, T. Zhang, Y. Hrywna, J. R. Thompson, N. de Pedro, I. Royo, R. A. Blevins, F. Peláez, S. D. Wright, and J. Cui. 2003. 'Farnesoid X receptor activates transcription of the phospholipid pump MDR3', *J Biol Chem*, 278: 51085-90.
- Hundt, M., H. Basit, and S. John. 2020. 'Physiology, Bile Secretion.' in, *StatPearls* (StatPearls Publishing
- Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL)).
- Ikebuchi, Y., T. Takada, K. Ito, T. Yoshikado, N. Anzai, Y. Kanai, and H. Suzuki. 2009. 'Receptor for activated C-kinase 1 regulates the cellular localization and function of ABCB4', *Hepatology Res*, 39: 1091-107.
- Jacquemin, E. 2012. 'Progressive familial intrahepatic cholestasis', *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 36 Suppl 1: S26-35.
- Jetter, A., and G. A. Kullak-Ublick. 2020. 'Drugs and hepatic transporters: A review', *Pharmacol Res*, 154: 104234.
- Kent, C. 2005. 'Regulatory enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis: a personal perspective', *Biochim Biophys Acta*, 1733: 53-66.
- Kerem, E., M. W. Konstan, K. De Boeck, F. J. Accurso, I. Sermet-Gaudelus, M. Wilschanski, J. S. Elborn, P. Melotti, I. Bronsveld, I. Fajac, A. Malfroot, D. B. Rosenbluth, P. A. Walker, S. A. McColley, C. Knoop, S. Quattrucci, E. Rietschel, P. L. Zeitlin, J. Barth, G. L. Elfring, E. M. Welch, A. Branstrom, R. J. Spiegel, S. W. Peltz, T. Ajayi, and S.

- M. Rowe. 2014. 'Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial', *Lancet Respir Med*, 2: 539-47.
- Kim Chiaw, P., L. Wellhauser, L. J. Huan, M. Ramjeesingh, and C. E. Bear. 2010. 'A chemical corrector modifies the channel function of F508del-CFTR', *Mol Pharmacol*, 78: 411-8.
- Kim, Y., and J. Chen. 2018. 'Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation', *Science*, 359: 915-19.
- Kinting, S., S. Höppner, U. Schindlbeck, M. E. Forstner, J. Harfst, T. Wittmann, and M. Griese. 2018. 'Functional rescue of misfolding ABCA3 mutations by small molecular correctors', *Hum Mol Genet*, 27: 943-53.
- Kipp, H., and I. M. Arias. 2000. 'Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver', *J Biol Chem*, 275: 15917-25.
- Kipp, H., and I. M. Arias. 2002. 'Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes', *Annu Rev Physiol*, 64: 595-608.
- Lahouassa, H., M. L. Blondot, L. Chauveau, G. Chougui, M. Morel, M. Leduc, F. Guillonnet, B. C. Ramirez, O. Schwartz, and F. Margottin-Goguet. 2016. 'HIV-1 Vpr degrades the HLTF DNA translocase in T cells and macrophages', *Proc Natl Acad Sci USA*, 113: 5311-6.
- LaRusso, N. F. 1996. 'Morphology, physiology, and biochemistry of biliary epithelia', *Toxicol Pathol*, 24: 84-9.
- Le Saux, O., K. Fülöp, Y. Yamaguchi, A. Iliás, Z. Szabó, C. N. Brampton, V. Pomozi, K. Huszár, T. Arányi, and A. Váradi. 2011. 'Expression and in vivo rescue of human ABCC6 disease-causing mutants in mouse liver', *PLoS One*, 6: e24738.
- Lee, J. Y., L. N. Kinch, D. M. Borek, J. Wang, J. Wang, I. L. Urbatsch, X. S. Xie, N. V. Grishin, J. C. Cohen, Z. Otwinowski, H. H. Hobbs, and D. M. Rosenbaum. 2016. 'Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8', *Nature*, 533: 561-4.
- Leubitz, A., A. Frydman-Marom, N. Sharpe, J. van Duzer, K. C. M. Campbell, and F. Vanhoutte. 2019. 'Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Single Ascending Doses of ELX-02, a Potential Treatment for Genetic Disorders Caused by Nonsense Mutations, in Healthy Volunteers', *Clin Pharmacol Drug Dev*, 8: 984-94.
- Li, Z., and R. J. Schulze. 2016. 'A novel Rab10-EHBP1-EHD2 complex essential for the autophagic engulfment of lipid droplets', 2: e1601470.
- Lincke, C. R., J. J. Smit, T. van der Velde-Koerts, and P. Borst. 1991. 'Structure of the human MDR3 gene and physical mapping of the human MDR locus', *J Biol Chem*, 266: 5303-10.
- Linton, K. J. 2007. 'Structure and function of ABC transporters', *Physiology (Bethesda)*, 22: 122-30.
- Lipiński, P., and I. Jankowska. 2018. '[Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3]', *Dev Period Med*, 22: 385-89.
- Liu, F., Z. Zhang, A. Levit, J. Levring, K. K. Touhara, B. K. Shoichet, and J. Chen. 2019. 'Structural identification of a hotspot on CFTR for potentiation', *Science*, 364: 1184-88.
- Liu, O., and B. D. Grant. 2015. 'Basolateral Endocytic Recycling Requires RAB-10 and AMPH-1 Mediated Recruitment of RAB-5 GAP TBC-2 to Endosomes', *PLoS Genet*, 11: e1005514.
- Liu, X. 2019. 'ABC Family Transporters', *Adv Exp Med Biol*, 1141: 13-100.



- Loo, T. W., and D. M. Clarke. 1995. 'P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones', *J Biol Chem*, 270: 21839-44.
- Lopes-Pacheco, M. 2019. 'CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine', *Front Pharmacol*, 10: 1662.
- Lu, X., L. Liu, W. Shan, L. Kong, N. Chen, Y. Lou, and S. Zeng. 2019. 'The Role of the Sodium-taurocholate Co-transporting Polypeptide (NTCP) and Bile Salt Export Pump (BSEP) in Related Liver Disease', *Curr Drug Metab*, 20: 377-89.
- Lucena, J. F., J. I. Herrero, J. Quiroga, B. Sangro, J. Garcia-Foncillas, N. Zabalegui, J. Sola, M. Herraiz, J. F. Medina, and J. Prieto. 2003. 'A multidrug resistance 3 gene mutation causing cholelithiasis, cholestasis of pregnancy, and adulthood biliary cirrhosis', *Gastroenterology*, 124: 1037-42.
- Lv, P., Y. Sheng, Z. Zhao, W. Zhao, L. Gu, T. Xu, and E. Song. 2015. 'Targeted disruption of Rab10 causes early embryonic lethality', *Protein Cell*, 6: 463-67.
- Maggiore, G., E. Gonzales, M. Sciveres, M. J. Redon, B. Grosse, B. Stieger, A. Davit-Spraul, M. Fabre, and E. Jacquemin. 2010. 'Relapsing features of bile salt export pump deficiency after liver transplantation in two patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2', *J Hepatol*, 53: 981-6.
- Maldonado-Valderrama, J., P. Wilde, A. Macierzanka, and A. Mackie. 2011. 'The role of bile salts in digestion', *Adv Colloid Interface Sci*, 165: 36-46.
- Mareux, E., M. Lapalus, R. Amzal, M. Almes, T. Aït-Slimane, J. L. Delaunay, P. Adnot, M. Collado-Hilly, A. Davit-Spraul, T. Falguières, I. Callebaut, E. Gonzales, and E. Jacquemin. 2020. 'Functional rescue of an ABCB11 mutant by ivacaftor: A new targeted pharmacotherapy approach in bile salt export pump deficiency', *Liver Int*.
- Marinelli, R. A., G. L. Lehmann, L. R. Soria, and M. J. Marchissio. 2011. 'Hepatocyte aquaporins in bile formation and cholestasis', *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16: 2642-52.
- Misra, S., P. Ujházy, Z. Gatmaitan, L. Varticovski, and I. M. Arias. 1998. 'The role of phosphoinositide 3-kinase in taurocholate-induced trafficking of ATP-dependent canalicular transporters in rat liver', *J Biol Chem*, 273: 26638-44.
- Molinski, S. V., V. M. Shahani, A. S. Subramanian, S. S. MacKinnon, G. Woollard, M. Laforet, O. Laselva, L. D. Morayniss, C. E. Bear, and A. Windemuth. 2018. 'Comprehensive mapping of cystic fibrosis mutations to CFTR protein identifies mutation clusters and molecular docking predicts corrector binding site', 86: 833-43.
- Morais, P., H. Adachi, and Y. T. Yu. 2020. 'Suppression of Nonsense Mutations by New Emerging Technologies', *Int J Mol Sci*, 21.
- Morita, S. Y., T. Tsuda, M. Horikami, R. Teraoka, S. Kitagawa, and T. Terada. 2013. 'Bile salt-stimulated phospholipid efflux mediated by ABCB4 localized in nonraft membranes', *J Lipid Res*, 54: 1221-30.
- Mottino, A. D., and V. A. Catania. 2008. 'Hepatic drug transporters and nuclear receptors: regulation by therapeutic agents', *World J Gastroenterol*, 14: 7068-74.
- Müller, M. P., and R. S. Goody. 2018. 'Molecular control of Rab activity by GEFs, GAPs and GDI', *Small GTPases*, 9: 5-21.
- Nevens, F., P. Andreone, G. Mazzella, S. I. Strasser, C. Bowlus, P. Invernizzi, J. P. Drenth, P. J. Pockros, J. Regula, U. Beuers, M. Trauner, D. E. Jones, A. Floreani, S. Hohenester, V. Luketic, M. Shiffman, K. J. van Erpecum, V. Vargas, C. Vincent, G. M. Hirschfield, H. Shah, B. Hansen, K. D. Lindor, H. U. Marschall, K. V. Kowdley, R. Hooshmand-Rad, T. Marmon, S. Sheeron, R. Pencek, L. MacConell, M. Pruzanski, and D. Shapiro. 2016. 'A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis', *N Engl J Med*, 375: 631-43.

- Nies, A. T., Z. Gatmaitan, and I. M. Arias. 1996. 'ATP-dependent phosphatidylcholine translocation in rat liver canalicular plasma membrane vesicles', *J Lipid Res*, 37: 1125-36.
- Norez, C., S. Noel, M. Wilke, M. Bijvelds, H. Jorna, P. Melin, H. DeJonge, and F. Becq. 2006. 'Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat', *FEBS Lett*, 580: 2081-6.
- Norez, C., C. Vandebrouck, J. Bertrand, S. Noel, E. Durieu, N. Oumata, H. Galons, F. Antigny, A. Chatelier, P. Bois, L. Meijer, and F. Becq. 2014. 'Roscovitine is a proteostasis regulator that corrects the trafficking defect of F508del-CFTR by a CDK-independent mechanism', *Br J Pharmacol*, 171: 4831-49.
- Olsen, J. A., A. Alam, J. Kowal, B. Stieger, and K. P. Locher. 2020. 'Structure of the human lipid exporter ABCB4 in a lipid environment', *Nat Struct Mol Biol*, 27: 62-70.
- Ortiz, D. F., J. Moseley, G. Calderon, A. L. Swift, S. Li, and I. M. Arias. 2004. 'Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and regulates its abundance in the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells', *J Biol Chem*, 279: 32761-70.
- Overeem, A. W., Q. Li, Y. L. Qiu, F. Cartón-García, C. Leng, K. Klappe, J. Dronkers, N. H. Hsiao, J. S. Wang, D. Arango, and S. C. D. van Ijzendoorn. 2020. 'A Molecular Mechanism Underlying Genotype-Specific Intrahepatic Cholestasis Resulting From MYO5B Mutations', *Hepatology*, 72: 213-29.
- Park, S. W., C. M. Schonhoff, C. R. Webster, and M. S. Anwer. 2014. 'Rab11, but not Rab4, facilitates cyclic AMP- and tauroursodeoxycholate-induced MRP2 translocation to the plasma membrane', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 307: G863-70.
- Paumgartner, G., J. Reichen, K. von Bergmann, and R. Preisig. 1975. 'Elaboration of hepatocytic bile', *Bull N Y Acad Med*, 51: 455-71.
- Pedemonte, N., and L. J. Galletta. 2012. 'Pharmacological Correctors of Mutant CFTR Mistrafficking', *Front Pharmacol*, 3: 175.
- Pedemonte, N., G. L. Lukacs, K. Du, E. Caci, O. Zegarra-Moran, L. J. Galletta, and A. S. Verkman. 2005. 'Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening', *J Clin Invest*, 115: 2564-71.
- Pibiri, I., L. Lentini, R. Melfi, G. Gallucci, A. Pace, A. Spinello, G. Barone, and A. Di Leonardo. 2015. 'Enhancement of premature stop codon readthrough in the CFTR gene by Ataluren (PTC124) derivatives', *Eur J Med Chem*, 101: 236-44.
- Pillarisetty, L. S., and A. Sharma. 2020. 'Pregnancy Intrahepatic Cholestasis.' in, *StatPearls* (StatPearls Publishing)
- Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL)).
- Poupon, R. 2012. 'Ursodeoxycholic acid and bile-acid mimetics as therapeutic agents for cholestatic liver diseases: an overview of their mechanisms of action', *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 36 Suppl 1: S3-12.
- Rai, A., A. Oprisko, J. Campos, Y. Fu, T. Friese, A. Itzen, R. S. Goody, E. M. Gazdag, and M. P. Müller. 2016. 'bMERB domains are bivalent Rab8 family effectors evolved by gene duplication', *Elife*, 5.
- Ramsey, B. W., J. Davies, N. G. McElvaney, E. Tullis, S. C. Bell, P. Dřevínek, M. Griese, E. F. McKone, C. E. Wainwright, M. W. Konstan, R. Moss, F. Ratjen, I. Sermet-Gaudelus, S. M. Rowe, Q. Dong, S. Rodriguez, K. Yen, C. Ordoñez, and J. S. Elborn. 2011. 'A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation', *N Engl J Med*, 365: 1663-72.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott, and F. Zhang. 2013. 'Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system', *Nat Protoc*, 8: 2281-308.

- Reichert, M. C., and F. Lammert. 2018. 'ABCB4 Gene Aberrations in Human Liver Disease: An Evolving Spectrum', *Semin Liver Dis*, 38: 299-307.
- Robert, R., G. W. Carlile, C. Pavel, N. Liu, S. M. Anjos, J. Liao, Y. Luo, D. Zhang, D. Y. Thomas, and J. W. Hanrahan. 2008. 'Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect', *Mol Pharmacol*, 73: 478-89.
- Rosmorduc, O., B. Hermelin, and R. Poupon. 2001. 'MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis', *Gastroenterology*, 120: 1459-67.
- Rosmorduc, O., and R. Poupon. 2007. 'Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene', *Orphanet J Rare Dis*, 2: 29.
- Rubenstein, R. C., and B. M. Lyons. 2001. 'Sodium 4-phenylbutyrate downregulates HSC70 expression by facilitating mRNA degradation', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281: L43-51.
- Ruetz, S., and P. Gros. 1994. 'Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene', *Cell*, 77: 1071-81.
- Russell, D. W. 2003. 'The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis', *Annu Rev Biochem*, 72: 137-74.
- . 2009. 'Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism', *J Lipid Res*, 50 Suppl: S120-5.
- Sainz-Ramos, M., I. Villate-Beitia, I. Gallego, A. L. Qtaish N, T. B. Lopez-Mendez, R. Eritja, S. Grijalvo, G. Puras, and J. L. Pedraz. 2020. 'Non-viral mediated gene therapy in human cystic fibrosis airway epithelial cells recovers chloride channel functionality', *Int J Pharm*, 588: 119757.
- Sano, H., W. G. Roach, G. R. Peck, M. Fukuda, and G. E. Lienhard. 2008. 'Rab10 in insulin-stimulated GLUT4 translocation', *Biochem J*, 411: 89-95.
- Shoda, J., Y. Inada, A. Tsuji, H. Kusama, T. Ueda, T. Ikegami, H. Suzuki, Y. Sugiyama, D. E. Cohen, and N. Tanaka. 2004. 'Bezafibrate stimulates canalicular localization of NBD-labeled PC in HepG2 cells by PPARalpha-mediated redistribution of ABCB4', *J Lipid Res*, 45: 1813-25.
- Shoda, J., K. Okada, Y. Inada, H. Kusama, H. Utsunomiya, K. Oda, T. Yokoi, K. Yoshizato, and H. Suzuki. 2007. 'Bezafibrate induces multidrug-resistance P-Glycoprotein 3 expression in cultured human hepatocytes and humanized livers of chimeric mice', *Hepatol Res*, 37: 548-56.
- Siew, S. M., S. C. Cunningham, E. Zhu, S. S. Tay, E. Venuti, C. Bolitho, and I. E. Alexander. 2019. 'Prevention of Cholestatic Liver Disease and Reduced Tumorigenicity in a Murine Model of PFIC Type 3 Using Hybrid AAV-piggyBac Gene Therapy', *Hepatology*, 70: 2047-61.
- Smit, J. J., A. H. Schinkel, C. A. Mol, D. Majoor, W. J. Mooi, A. P. Jongsma, C. R. Lincke, and P. Borst. 1994. 'Tissue distribution of the human MDR3 P-glycoprotein', *Lab Invest*, 71: 638-49.
- Smit, J. J., A. H. Schinkel, R. P. Oude Elferink, A. K. Groen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C. A. Mol, R. Ottenhoff, N. M. van der Lugt, M. A. van Roon, and et al. 1993. 'Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease', *Cell*, 75: 451-62.
- Smith, A. J., A. van Helvoort, G. van Meer, K. Szabo, E. Welker, G. Szakacs, A. Varadi, B. Sarkadi, and P. Borst. 2000. 'MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping', *J Biol Chem*, 275: 23530-9.
- Song, Y., N. D. Sonawane, D. Salinas, L. Qian, N. Pedemonte, L. J. Galletta, and A. S. Verkman. 2004. 'Evidence against the rescue of defective DeltaF508-CFTR cellular

- processing by curcumin in cell culture and mouse models', *J Biol Chem*, 279: 40629-33.
- Spanò, V., A. Montalbano, A. Carbone, P. Scudieri, L. J. V. Galiotta, and P. Barraja. 2019. 'An overview on chemical structures as  $\Delta F508$ -CFTR correctors', *Eur J Med Chem*, 180: 430-48.
- Srikant, S., and R. Gaudet. 2019. 'Mechanics and pharmacology of substrate selection and transport by eukaryotic ABC exporters', *Nat Struct Mol Biol*, 26: 792-801.
- Stenmark, H. 2009. 'Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 513-25.
- Stieger, B., Y. Meier, and P. J. Meier. 2007. 'The bile salt export pump', *Pflugers Arch*, 453: 611-20.
- Szöllösi, D., D. Rose-Sperling, U. A. Hellmich, and T. Stockner. 2018. 'Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters', *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1860: 818-32.
- Tabibian, J. H., A. I. Masyuk, T. V. Masyuk, S. P. O'Hara, and N. F. LaRusso. 2013. 'Physiology of cholangiocytes', *Compr Physiol*, 3: 541-65.
- Tavana, J. P., M. Rosene, N. O. Jensen, P. G. Ridge, J. S. Kauwe, and C. M. Karch. 2019. 'RAB10: an Alzheimer's disease resilience locus and potential drug target', *Clin Interv Aging*, 14: 73-79.
- Taylor-Cousar, J. L., A. Munck, E. F. McKone, C. K. van der Ent, A. Moeller, C. Simard, L. T. Wang, E. P. Ingenito, C. McKee, Y. Lu, J. Lekstrom-Himes, and J. S. Elborn. 2017. 'Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del', *N Engl J Med*, 377: 2013-23.
- Trauner, M., and J. L. Boyer. 2003. 'Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation', *Physiol Rev*, 83: 633-71.
- Trefts, E., M. Gannon, and D. H. Wasserman. 2017. 'The liver', *Curr Biol*, 27: R1147-r51.
- Van der Blik, A. M., F. Baas, T. Ten Houte de Lange, P. M. Kooiman, T. Van der Velde-Koerts, and P. Borst. 1987. 'The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver', *EMBO J*, 6: 3325-31.
- van der Blik, A. M., P. M. Kooiman, C. Schneider, and P. Borst. 1988. 'Sequence of *mdr3* cDNA encoding a human P-glycoprotein', *Gene*, 71: 401-11.
- van der Woerd, W. L., C. G. Wichers, A. L. Vestergaard, J. P. Andersen, C. C. Paulusma, R. H. Houwen, and S. F. van de Graaf. 2016. 'Rescue of defective ATP8B1 trafficking by CFTR correctors as a therapeutic strategy for familial intrahepatic cholestasis', *J Hepatol*, 64: 1339-47.
- Van Goor, F., S. Hadida, P. D. Grootenhuis, B. Burton, D. Cao, T. Neuberger, A. Turnbull, A. Singh, J. Joubran, A. Hazlewood, J. Zhou, J. McCartney, V. Arumugam, C. Decker, J. Yang, C. Young, E. R. Olson, J. J. Wine, R. A. Frizzell, M. Ashlock, and P. Negulescu. 2009. 'Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106: 18825-30.
- Van Goor, F., K. S. Straley, D. Cao, J. González, S. Hadida, A. Hazlewood, J. Joubran, T. Knapp, L. R. Makings, M. Miller, T. Neuberger, E. Olson, V. Panchenko, J. Rader, A. Singh, J. H. Stack, R. Tung, P. D. Grootenhuis, and P. Negulescu. 2006. 'Rescue of  $\Delta F508$ -CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290: L1117-30.
- van Wonderen, J. H., R. M. McMahon, M. L. O'Mara, C. A. McDevitt, A. J. Thomson, I. D. Kerr, F. MacMillan, and R. Callaghan. 2014. 'The central cavity of ABCB1 undergoes alternating access during ATP hydrolysis', *Febs j*, 281: 2190-201.

- Vauthier, V., A. Ben Saad, J. Elie, N. Oumata, A. M. Durand-Schneider, A. Bruneau, J. L. Delaunay, C. Housset, T. Ait-Slimane, L. Meijer, and T. Falguières. 2019. 'Structural analogues of roscovitine rescue the intracellular traffic and the function of ER-retained ABCB4 variants in cell models', *Sci Rep*, 9: 6653.
- Vauthier, V., C. Housset, and T. Falguières. 2017. 'Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters', *Biochem Pharmacol*.
- Venot, Q., J. L. Delaunay, L. Fouassier, D. Delautier, T. Falguières, C. Housset, M. Maurice, and T. Ait-Slimane. 2016. 'A PDZ-Like Motif in the Biliary Transporter ABCB4 Interacts with the Scaffold Protein EBP50 and Regulates ABCB4 Cell Surface Expression', *PLoS One*, 11: e0146962.
- Vitale, G., S. Gitto, R. Vukotic, F. Raimondi, and P. Andreone. 2019. 'Familial intrahepatic cholestasis: New and wide perspectives', *Dig Liver Dis*, 51: 922-33.
- Wakabayashi, Y., J. Lippincott-Schwartz, and I. M. Arias. 2004. 'Intracellular trafficking of bile salt export pump (ABCB11) in polarized hepatic cells: constitutive cycling between the canalicular membrane and rab11-positive endosomes', *Mol Biol Cell*, 15: 3485-96.
- Walkey, C. J., L. Yu, L. B. Agellon, and D. E. Vance. 1998. 'Biochemical and evolutionary significance of phospholipid methylation', *J Biol Chem*, 273: 27043-6.
- Wang, D., J. Lou, C. Ouyang, W. Chen, Y. Liu, X. Liu, X. Cao, J. Wang, and L. Lu. 2010. 'Ras-related protein Rab10 facilitates TLR4 signaling by promoting replenishment of TLR4 onto the plasma membrane', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 13806-11.
- Wang, D. Q., D. E. Cohen, and M. C. Carey. 2009. 'Biliary lipids and cholesterol gallstone disease', *J Lipid Res*, 50 Suppl: S406-11.
- Wang, L., W. T. Hou, L. Chen, Y. L. Jiang, D. Xu, L. Sun, C. Z. Zhou, and Y. Chen. 2020. 'Cryo-EM structure of human bile salts exporter ABCB11', *Cell Res*, 30: 623-25.
- Wang, T., Y. Liu, X. H. Xu, C. Y. Deng, K. Y. Wu, J. Zhu, X. Q. Fu, M. He, and Z. G. Luo. 2011. 'Lgl1 activation of rab10 promotes axonal membrane trafficking underlying neuronal polarization', *Dev Cell*, 21: 431-44.
- Wang, W., W. D. Jia, B. Hu, and Y. Y. Pan. 2017. 'RAB10 overexpression promotes tumor growth and indicates poor prognosis of hepatocellular carcinoma', *Oncotarget*, 8: 26434-47.
- Weber, N. D., L. Odriozola, J. Martínez-García, V. Ferrer, A. Douar, B. Bénichou, G. González-Aseguinolaza, and C. Smerdou. 2019. 'Gene therapy for progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 in a clinically relevant mouse model', *Nat Commun*, 10: 5694.
- Williamson, C., and V. Geenes. 2014. 'Intrahepatic cholestasis of pregnancy', *Obstet Gynecol*, 124: 120-33.
- Wolkoff, A. W. 2014. 'Organic anion uptake by hepatocytes', *Compr Physiol*, 4: 1715-35.
- Xia, X., H. Francis, S. Glaser, G. Alpini, and G. LeSage. 2006. 'Bile acid interactions with cholangiocytes', *World J Gastroenterol*, 12: 3553-63.
- Yoshikado, T., T. Takada, T. Yamamoto, H. Yamaji, K. Ito, T. Santa, H. Yokota, Y. Yatomi, H. Yoshida, J. Goto, S. Tsuji, and H. Suzuki. 2011. 'Itraconazole-induced cholestasis: involvement of the inhibition of bile canalicular phospholipid translocator MDR3/ABCB4', *Mol Pharmacol*, 79: 241-50.
- Zanlungo, S., and A. Rigotti. 2009. 'Determinants of transhepatic cholesterol flux and their relevance for gallstone formation', *Liver Int*, 29: 323-30.
- Zein, A. A., R. Kaur, T. O. K. Hussein, G. A. Graf, and J. Y. Lee. 2019. 'ABCG5/G8: a structural view to pathophysiology of the hepatobiliary cholesterol secretion', *Biochem Soc Trans*, 47: 1259-68.

Ziol, M., V. Barbu, O. Rosmorduc, A. Frassati-Biaggi, N. Barget, B. Hermelin, G. L. Scheffer, S. Bennouna, J. C. Trinchet, M. Beaugrand, and N. Ganne-Carrié. 2008. 'ABCB4 heterozygous gene mutations associated with fibrosing cholestatic liver disease in adults', *Gastroenterology*, 135: 131-41.