



HAL
open science

Pharmacothérapie ciblée des déficits en ABCB11

Elodie Mareux

► **To cite this version:**

Elodie Mareux. Pharmacothérapie ciblée des déficits en ABCB11. Hépatologie et Gastroentérologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL083 . tel-04292996

HAL Id: tel-04292996

<https://theses.hal.science/tel-04292996v1>

Submitted on 18 Nov 2023

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

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

Pharmacothérapie ciblée des déficits en
ABCB11
Targeted pharmacotherapy in ABCB11 deficiency

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°568 : signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, Physiopathogenèse et traitement
des maladies du foie, 91400, Orsay, France
Réfèrent : Faculté de médecine

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 17/11/2021, par**

Elodie MAREUX

Composition du Jury

Antoine DURRBACH PU-PH, APHP, Université Paris-Saclay (UMR_S 1186)	Président
Pascale FANEN PU-PH, APHP, Université Paris Est-Créteil (UMR_S 955)	Rapporteuse & Examinatrice
Chantal HOUSSET PU-PH, APHP, Sorbonne Université (UMR_S 938)	Rapporteuse & Examinatrice
Alexandre HINZPETER CRCN, Université Paris Descartes (Inserm UMR_S 1151)	Examineur
Wilfried LE GOFF CRCN, Sorbonne Université (Inserm UMR_S 1166)	Examineur
Emmanuel GONZALES PU-PH, APHP, Université Paris-Saclay (UMR_S 1193)	Directeur de thèse
Emmanuel JACQUEMIN PU-PH, APHP, Université Paris-Saclay (UMR_S 1193)	Invité

~ REMERCIEMENTS ~

En premier lieu, je souhaite remercier profondément le Pr. Emmanuel Jacquemin de m'avoir accueilli et soutenu durant ces trois années. Un grand merci également au Directeur de l'unité le Pr. Didier Samuel et au Directeur d'équipe le Dr. Thierry Tordjmann.

Je remercie le Pr. Antoine Durrbach de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je remercie mes rapportrices la Pr. Pascale Fanen et la Pr. Chantal Housset du temps qu'elles ont consacré à ce manuscrit ainsi que les Dr. Wilfried Le Goff et Alexandre Hinzpeter qui ont accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examineurs.

Un immense merci à mon Directeur de thèse, le Pr. Emmanuel Gonzales, d'avoir accueilli l'étudiante de Master 2 que j'étais et d'avoir cru en moi. Je te suis très reconnaissante de m'avoir conseillé, écouté, laissé expérimenter et apprendre de mes erreurs. Merci à vous deux les « Emmanuels » de m'avoir offert toutes ces opportunités de présenter mes travaux lors de congrès qui m'ont été extrêmement bénéfiques tant sur le plan scientifique qu'humain.

Au commencement, Martine et Rachida. Merci de votre disponibilité, votre patience et vos précieux conseils. Vous m'avez prise sous votre aile et m'avez transmis votre savoir-faire. Martine tu as été mon indéfectible soutien lorsque tout ne fonctionnait pas « du feu de dieu » et que « ça ne mangeait pas de pain » de refaire quelques tests supplémentaires. Rachida, notre complicité et nos fous rires m'ont aidé à avancer. Toutes deux dans la même galère.

Puis vinrent Thomas et Amel. Votre arrivée au laboratoire a sans nul doute bouleversé positivement notre petite routine. Thomas, ton dynamisme et ta spontanéité ont souvent été le coup de boost dont j'avais besoin pour avancer et tes conseils, toujours appréciables. Amel, ta gentillesse, ta bienveillance et ta vivacité d'esprit ont été pour moi un modèle.

Toujours présente, LA team 4. J'ai beaucoup appris et grandi à vos côtés : Mauricette, Latifa et Isa « petite », trucs et astuces pour vivre mieux/écologique ; Olivier et Thibault, garder la forme (morale et physique) ; Isa « la grande », rando/trail/run une histoire d'organisation ; Greg ou toute l'actualité historique/sportive/scientifique/∞ au

labo. Merci pour tous ces moments partagés mêlant fous rires, débats, repas, confinements/déconfinementsⁿ et j'en passe. Je suis arrivée pauvre et vous m'avez enrichie.

Une pensée aux docteurs et post-doctorants que j'ai eu la chance de rencontrer, Emilie, Laure, Nicolas, Camille, Amine, Tom, Ilaria, Mounia. Je n'oublierai pas les moments que nous avons partagés ensemble.

J'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble de nos collaborateurs sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Merci à Tounsia et Jean-Louis, pour nos échanges scientifiques et à Isabelle Callebaut pour son expertise et sa contribution à l'étude structurale. Votre disponibilité sans faille m'a été d'une grande aide. Merci à Rodolphe Auger, Michel Lepoivre et Sophie Bombard de leur accueil au sein de leurs laboratoires pour mes expérimentations radioactives. Merci à Jean-Luc Decout pour les molécules potentiatrices. Je tiens également à remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Un grand merci également à l'équipe pédagogique de physiologie animale qui m'a permis de goûter aux joies de l'enseignement. Heather, Laurence, Patricia et Sylvie, vos conseils et votre disponibilité m'ont donné les moyens de partager mon savoir et le faire grandir.

Je terminerai en remerciant l'ensemble de mes amis et ma famille sans qui je ne serai pas celle que je suis aujourd'hui et qui chaque jour me donne la force d'aller plus loin. Une pensée particulière à mon mari et ma maman. Guillaume, ces années à mes côtés n'ont pas été de tout repos. Merci de ton support, de tes encouragements et de ton amour. Maman, le simple mot merci ne suffit pas à exprimer ce que je ressens. Tu es mon GPS en voiture, ma boussole en randonnée, mon radar en plein brouillard, et bien d'autres choses. Tati Marie-Claire, Tati-Lène, Mamie, Jean-Jacques, Gisèle, Yanie, Anecie, Jessy, Guillaume, Waren, Blanche, Fanny, ceux qui sont dans mon cœur et que je n'ai pas cités, à tous, je vous dédie ce travail.

« Vous ne pouvez pas arrêter les vagues, mais vous pouvez apprendre à surfer. » - Joseph Goldstein ou Jon Kabat-Zinn.

A ma mère,

~ TABLE DES MATIERES ~

~ LISTE DES ABREVIATIONS ~	1
~ AVANT-PROPOS ~	3
~ INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE ~	5
I – LA SECRETION BILIAIRE EST UNE FONCTION ESSENTIELLE DU FOIE	5
I – 1 – LE SYSTEME HEPATOBILIAIRE.....	5
I – 2 – PHYSIOLOGIE DE LA SECRETION BILIAIRE.....	8
I – 2 – 1 – Rôle physiologique de la bile	8
I – 2 – 2 – Composition de la bile dans l’espèce humaine.....	8
I – 2 – 3 – Formation et sécrétion de la bile	14
II – LE TRANSPORTEUR ABCB11.....	17
II – 1 – DECOUVERTE.....	17
II – 2 – EXPRESSION CELLULAIRE ET DISTRIBUTION TISSULAIRE	17
II – 3 – FONCTION	19
II – 4 – ABCB11 EST UN TRANSPORTEUR ABC.....	20
II – 4 – 1 – La superfamille des transporteurs ABC	20
II – 4 – 2 – Spécificité d’ABCB11	24
II – 5 – ABCB11 DE SA BIOSYNTHESE A SA DEGRADATION	25
II – 5 – 1 – Biosynthèse et maturation.....	25
II – 5 – 2 – Trafic intracellulaire et endocytose.....	26
II – 5 – 3 – Dégradation.....	28
II – 6 – REGULATION D’ABCB11	29
II – 6 – 1 – Régulation à court terme	29
II – 6 – 2 – Régulation à long terme	30
III – PATHOLOGIES ET TRAITEMENTS DES DEFICITS EN ABCB11.....	32
III – 1 – LES PATHOLOGIES ASSOCIEES A DES DEFICITS EN ABCB11	32
III – 1 – 1 – Les cholestases gravidique et médicamenteuse	32
III – 1 – 2 – La cholestase intrahépatique récurrente bénigne de type 2.....	33
III – 1 – 3 – La cholestase intrahépatique progressive familiale de type 2.....	33
III – 1 – 4 – Autres pathologies associées à des déficits en ABCB11	36
III – 2 – MODELES D’ETUDES DES PATHOLOGIES ASSOCIEES A DES DEFICITS EN ABCB11	36
III – 3 – TRAITEMENTS DES DEFICITS EN ABCB11	37
III – 3 – 1 – Traitements existants	37
III – 3 – 2 – Recherche de nouvelles thérapies	40

III – 3 – 3 – La pharmacothérapie ciblée	42
~ OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE ~	51
~ RESULTATS ~	53
I – CARACTERISATION DE VARIANTS FAUX SENS D’ABCB11 ET STRATEGIE DE POTENTIALISATION	53
I – 1 – ARTICLES	57
I – 1 – 1 – Premier article	58
I – 1 – 2 – Deuxième article.....	71
I – 1 – 3 – Troisième article.....	86
I – 2 – RESULTATS COMPLEMENTAIRES	113
I – 2 – 1 – Matériels et méthodes.....	113
I – 2 – 2 – Résultats	114
II – PHARMACOTHERAPIES CIBLEES COMBINATOIRES DE VARIANTS DE CLASSE I ET DE CLASSE II D’ABCB11	116
II – 1 – MATERIELS ET METHODES	116
II – 2 – LE VARIANT DE CLASSE I R1090X.....	117
II – 2 – 1 – Résultats préliminaires de l’équipe	117
II – 2 – 2 – Résultats	119
II – 3 – LE VARIANT DE CLASSE II R1128C.....	121
II – 3 – 1 – Résultats préliminaires de l’équipe	121
II – 3 – 2 – Résultats	122
~ DISCUSSION ~	129
~ CONCLUSION ET PERSPECTIVES ~	137
~ ANNEXES ~	139
~ BILAN SCIENTIFIQUE ~	147
~ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ~	151

~ FIGURES ET TABLEAUX ~

Figure 1 : Organisation d'un lobule hépatique	5
Figure 2 : Organisation des hépatocytes dans le canalicule biliaire.....	6
Figure 3 : L'arbre biliaire.....	7
Figure 4 : Les acides biliaires sont amphipathiques	9
Figure 5 : Biosynthèse des acides biliaires	10
Figure 6 : Cycle entérohépatique	12
Figure 7 : Régulation de la synthèse des acides biliaires.....	12
Figure 8 : Formation de micelles et vésicules unilamellaires dans la bile.....	13
Figure 9 : Les différentes fractions biliaires.....	14
Figure 10 : Transporteurs canaliculaires impliqués dans la sécrétion biliaire.....	15
Figure 11 : Modification de la bile par les cholangiocytes	16
Figure 12 : Variants d'épissage d'ABCB11 humain.....	18
Figure 13 : Expression d'ABCB11 dans l'espèce humaine.....	18
Figure 14 : Structure d'un transporteur ABC.....	21
Figure 15 : Modèle illustrant le mécanisme de fonctionnement des transporteurs ABC	23
Figure 16 : Structure d'ABCB11 humain en conformation « inward-facing ».....	25
Figure 17 : Protéines impliquées dans le trafic d'ABCB11.....	28
Figure 18 : Régulation transcriptionnelle d'ABCB11	31
Figure 19 : Les différentes formes de PFICs.....	35
Figure 20 : Cartographie des variations d'ABCB11.....	42
Figure 21 : Classification des variants d'ABCB11 et pharmacothérapie ciblée des déficits en ABCB11	45
Figure 22 : Les potentiateurs de CFTR n'ont pas d'effet sur l'activité d'Abcb11 wt ou de Ntcp.	114
Figure 23 : L'ivacaftor semble affecter la stabilité d'Abcb11	115
Figure 24 : Les variants R1090C et R1090W sont correctement adressés aux canalicules biliaires	117
Figure 25 : Les variants R1090C et R1090W sont adressés sous forme mature à la membrane apicale.....	118
Figure 26 : Modèle de structure 3D du site b de liaison à l'ATP.....	119
Figure 27 : Les variants R1090C et R1090W n'affectent pas la stabilité d'Abcb11.....	120

<i>Figure 28 : Les potentiateurs de CFTR ont tendance à corriger le défaut de transport des variants R1090C et R1090W.....</i>	<i>121</i>
<i>Figure 29 : Modélisation de la structure 3D du NBD2 d'ABCB11 humain.....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 30 : Cytotoxicité de l'alexacaftor (VX445) et du tezacaftor (VX661)</i>	<i>123</i>
<i>Figure 31 : Relocalisation partielle aux canalicules biliaires du variant R1128C après traitements correcteurs</i>	<i>124</i>
<i>Figure 32 : Les correcteurs de CFTR restaurent partiellement la maturation du variant R1128C</i>	<i>125</i>
<i>Figure 33 : Les correcteurs de CFTR corrigent partiellement le transport d'acides biliaires du variant R1128C</i>	<i>127</i>
<i>Tableau 1 : Caractéristiques des transporteurs ABC</i>	<i>22</i>
<i>Tableau 2 : Classification des variants d'ABCB11 et stratégies thérapeutiques étudiées.....</i>	<i>138</i>

~ LISTE DES ABREVIATIONS ~

4-PB	4-Phénylbutyrate		
	A		
AB	Acide biliaire	HEK293	Human embryonic kidney 293
ABC	ATP binding cassette	HepG2	Human hepatocellular carcinoma
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique		I
ARNm	Acide ribonucléique messenger	ICP	Intrahepatic cholestasis of pregnancy
ARNt	Acide ribonucléique de transfert		L
ATP	Adénosine triphosphate	LPAC	Low phospholipid associated cholelithiasis
AUDC	Acide ursodésoxycholique	LRH-1	Liver receptor homologue 1
	B		M
BRIC	Benign recurrent Intrahepatic Cholestasis	MDCK	Madin-Darby canin kidney
BSDF	Bile salt dependent bile flow	MDR	Multi-drug resistance
BSEP	Bile salt export pump	MSD	Membrane spanning domain
	C	MRP	Multidrug Resistance associated Protein
CDC	Chénodéoxycholate	MYO5B	Myosine 5B
CB	Canalicule biliaire		N
CF	Cystic Fibrosis	NBD	Nucleotide binding domain
CFTR	Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator	NBS	Nucleotide binding site
Cryo-EM	Cryo-microscopie électronique	NTCP	Na ⁺ taurocholate co-transporting polypeptide
CYP7A1	Cholestérol-7 α -hydroxylase		P
	D	PC	Phosphatidyl-choline
DILI	Drug-induced liver injury	PE	Phosphatidyl-éthanolamine
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	PKC	Protéine kinase C
DMSO	Diméthylsulfoxyde	PFIC	Progressive familial intrahepatic cholestasis
	E	P-gp	Glycoprotéine-P
E2	17 β -œstradiol	PS	Phosphatidylsérine
ERAD	Endoplasmic reticulum associated degradation		R
	F	RE	Réticulum endoplasmique
FXR	Farnesoid X receptor	RXR	Retinoic X receptor
	G		T
GFP	Green fluorescent protein	TC	Taurocholate
γ -GT	Gamma glutamyl transferase	TM	Transmembrane domain
G-PB	Glycérol Phénylbutyrate		W
		wt	wild-type

~ AVANT-PROPOS ~

La cholestase intrahépatique progressive familiale de type 2 (*Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2* – PFIC2) est une maladie génétique autosomique récessive rare due à des variants du gène *ABCB11* codant le transporteur canaliculaire des acides biliaires *ABCB11/BSEP* (*Bile Salt Export Pump*). Elle se manifeste dans les premiers mois de vie. Par sa sévérité et l'échec des traitements, deux tiers des patients subissent une transplantation hépatique avant l'âge adulte.

Mon projet de recherche s'inscrit dans une approche de thérapie ciblée visant à mieux comprendre les relations structure/fonction du transporteur *ABCB11* afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques curatives pour les patients atteints de déficit en *ABCB11*, dont la PFIC2.

Ce manuscrit est organisé en trois parties. La première partie comporte une synthèse de la littérature permettant d'introduire le rôle essentiel du transporteur *ABCB11*, les conséquences d'une dysfonction de ce transporteur et les pistes thérapeutiques pour corriger ces dysfonctionnements. La deuxième partie présente mes travaux de recherche au travers de publications auxquelles j'ai contribué de façon majeure ainsi que des résultats complémentaires qui n'ont pas encore été publiés. Enfin, la dernière partie est une discussion générale du travail présenté dans ce manuscrit et les différentes perspectives ouvertes par mes travaux.

~ INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE ~

I – La sécrétion biliaire est une fonction essentielle du foie

I – 1 – Le système hépatobiliaire

Le foie est un organe central de l'organisme humain par son volume (1,5 Kg en moyenne chez l'adulte), sa localisation stratégique (entre le tube digestif et la circulation sanguine) et ses fonctions essentielles (synthèse protéique, métabolisme glucidique et lipidique, détoxification et sécrétion biliaire). Il se divise en deux lobes principaux : le lobe hépatique droit (75 % du volume) et le lobe hépatique gauche (25 % du volume). La veine porte et l'artère hépatique pénètrent au niveau du hile hépatique et permettent un apport sanguin riche en nutriments et oxygène. Les canaux biliaires intrahépatiques se réunissent au niveau du hile hépatique pour former le canal hépatique commun qui permet l'excrétion de la bile vers le tube digestif.

Le lobule hépatique constitue l'unité fonctionnelle du foie. De forme hexagonale, chaque angle est doté d'un espace porte comprenant une subdivision de la veine porte, de l'artère hépatique et des canaux biliaires et lymphatiques (Sasse *et al.* 1992). Le sang circule des espaces portes vers la veine centrale, inversement au flux biliaire (Figure 1).

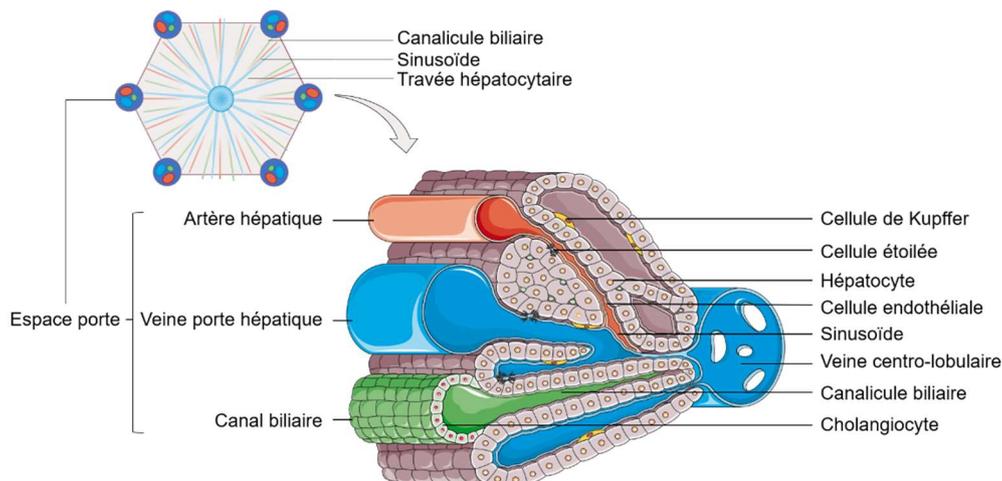


Figure 1 : Organisation d'un lobule hépatique. Le lobule hépatique constitue l'unité fonctionnelle du foie. Chaque lobule est composé d'espaces portes en périphérie constitués d'une branche de la veine porte et de l'artère hépatique et d'un canal biliaire. Les travées hépatocytaires sont séparées par les sinusoides qui transportent le sang des espaces portes vers une veine centrale. Les hépatocytes sécrètent la bile dans les canalicules biliaires, qui s'écoule en flux inverse au flux sanguin. Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales qui tapissent les canaux biliaires.

Le foie se compose d'hépatocytes, de cellules endothéliales, de cellules étoilées, de cellules de Kupffer et de cholangiocytes qui s'organisent dans une matrice fortement vascularisée par des sinusoides hépatiques (capillaires sanguins). Les hépatocytes sont les cellules principales du foie : ils représentent 60% de la population cellulaire hépatique et comptent pour 85% de son volume. Ce sont des cellules polyédriques (6 à 8 faces) hautement polarisées composées de deux domaines majeurs par leur importance fonctionnelle et/ou quantitative (Figure 2). D'une part, la membrane sinusoidale (basale) composée de microvilli est en contact avec les sinusoides. Elle permet les échanges bidirectionnels entre l'hépatocyte et le sang (ions, protéines plasmatiques, cholestérol, acides biliaires, bilirubine, hormones et nutriments) (Treyer et Musch 2013). D'autre part, la membrane canaliculaire (ou apicale) représente 10 à 15 % de la surface membranaire totale. Elle regroupe les transporteurs essentiels à la sécrétion biliaire.

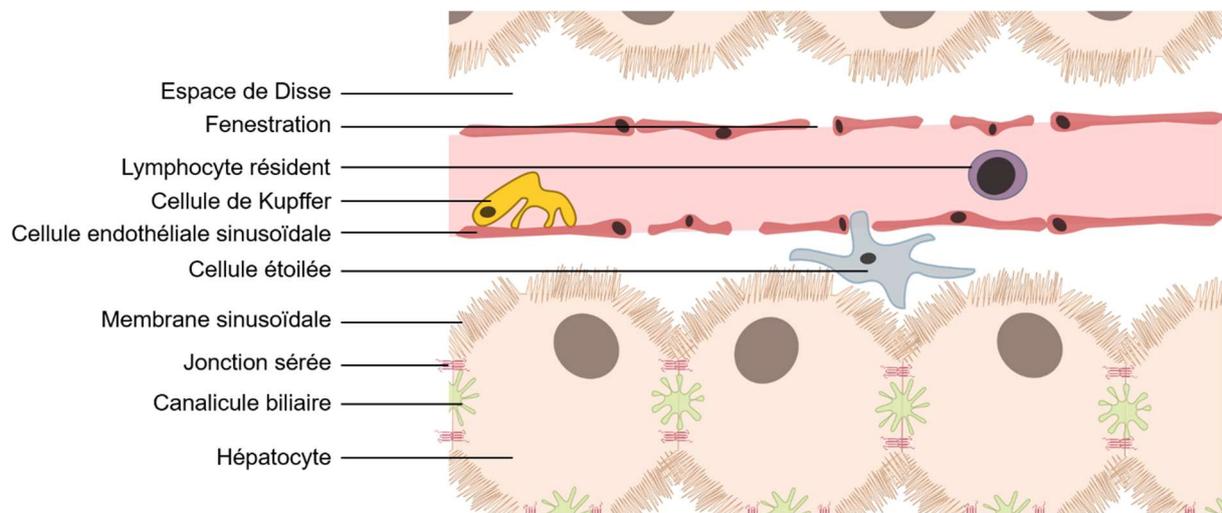


Figure 2 : Organisation des hépatocytes dans le canalicule biliaire. Les membranes basales des hépatocytes sont en contact avec les sinusoides. Les membranes apicales forment des canalicules biliaires fermés par des jonctions serrées. Les cellules étoilées (impliquées dans la fibrogenèse) sont situées dans l'espace de Disse entre les hépatocytes et les sinusoides. Les cellules de Kupffer (macrophages du foie) et les lymphocytes résident dans les sinusoides.

Le canalicule biliaire (CB) se forme par le repli des membranes apicales de deux hépatocytes adjacents (Anderson et Van 1995). Chaque hépatocyte contribue à former plusieurs CBs (environ 1 μm de diamètre). Les jonctions serrées qui scellent le CB sont composées principalement de claudines, occludines, *junctional adhesion molecules* (JAMs) et *Zonula occludens* (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) (Lee et Luk 2010, Treyer et Musch

2013). Elles assurent l'étanchéité du CB en empêchant la diffusion d'acides biliaires (ABs) et autres solutés de gros poids moléculaire tout en permettant celle de petits ions, en particulier le sodium. Les CBs sont interconnectés et forment un réseau complexe qui représente la plus petite branche de l'arbre biliaire (Figure 3). La bile initiale, formée dans l'espace canaliculaire, s'écoule vers la région périportale où les CBs se connectent au niveau des canaux de Hering, zone de transition entre les hépatocytes et les cholangiocytes. Ces canaux convergent pour former successivement les canaux interlobulaires (100 μM de diamètre) et le canal hépatique commun (> 800 μM de diamètre) au niveau du hile. Le canal cholédoque débute à la jonction entre le canal hépatique commun et le canal cystique (relié à la vésicule biliaire). Le canal cholédoque débouche dans le duodénum (partie haute de l'intestin). Les cholangiocytes sont les cellules épithéliales qui bordent la lumière des voies biliaires. Les cholangiocytes ont des phénotypes différents (morphologie et fonction) selon leur situation dans l'arbre biliaire et modifient la composition de la bile tout au long de l'arbre biliaire.

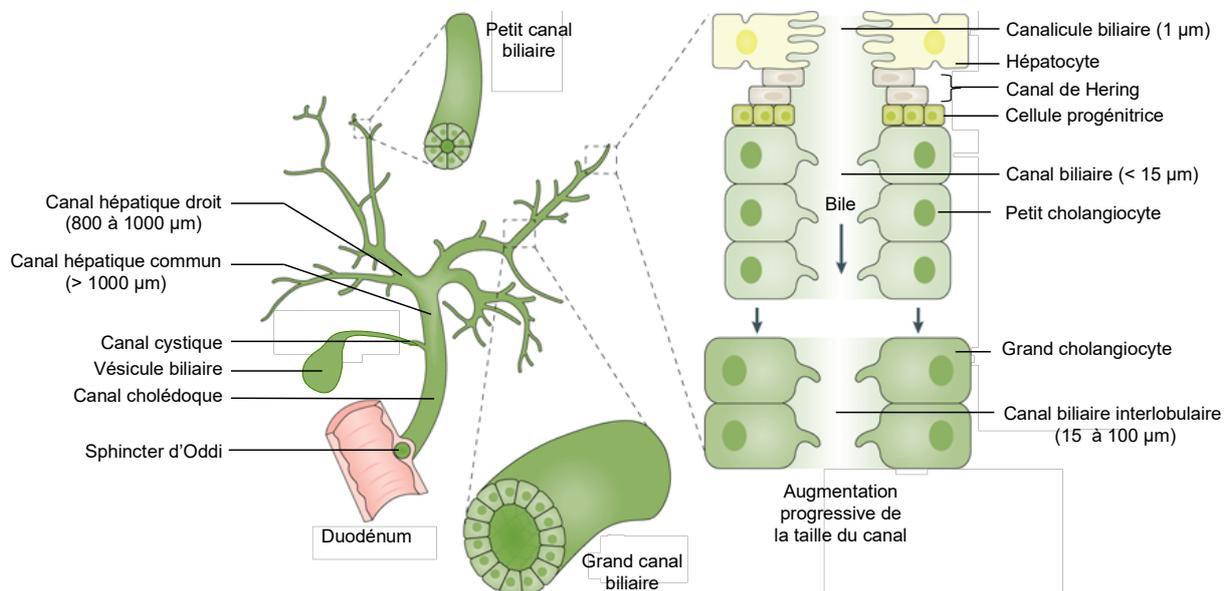


Figure 3 : L'arbre biliaire. La bile est acheminée par un réseau de canaux biliaires. Les canaux de Hering sont le lieu de transition entre les canalicules biliaires hépatiques et les canaux biliaires bordés par les cholangiocytes. Les cholangiocytes se différencient le long de l'arbre biliaire. Adapté de Banales *et al.* 2019.

I – 2 – Physiologie de la sécrétion biliaire

I – 2 – 1 – Rôle physiologique de la bile

Selon la théorie des humeurs d'Hippocrate, la bile, substance jaune provenant du foie, était l'une des 4 humeurs essentielles à l'équilibre vital. En effet, la sécrétion biliaire est une fonction essentielle du foie dont les rôles sont multiples (Boyer 2013). La bile est la voie majeure d'excrétion de substances lipophiles (xénobiotiques et toxines) et endobiotiques (bilirubine, cholestérol et acides biliaires) dont le poids moléculaire (> 300 à 500 Da) ne permet pas la filtration et l'excrétion par le rein. La bile protège l'organisme contre les infections entériques par excrétion d'immunoglobuline A (IgA), de cytokines inflammatoires et stimule l'immunité innée dans l'intestin. Beaucoup d'hormones et phéromones sont synthétisées dans la bile et contribuent à la croissance et au développement de l'intestin dans certaines espèces. Les ABs (solutés organiques majeurs de la bile) émulsionnent les graisses et vitamines liposolubles (A, D, E et K) provenant de l'alimentation permettant ainsi leur absorption intestinale.

I – 2 – 2 – Composition de la bile dans l'espèce humaine

La bile est un liquide aqueux composé majoritairement d'eau (95 % dans la bile initiale et 85 % dans la bile ductulaire) dans laquelle sont dissous des solutés endogènes, des xénobiotiques et des toxines environnementales. Les ABs sont les composés organiques majoritaires (67 %), suivis par les phospholipides (22 %) et le cholestérol (5 %). Les protéines (5 %) comprennent les IgA circulants, l'albumine, l'hémoglobine et le *Fibroblast Growth Factor 19* (FGF19). La bilirubine est le pigment majoritaire (0,3 %) à l'origine de la coloration jaune-verdâtre de la bile. Les autres composés sont les acides gras, enzymes, vitamines, stéroïdes et métaux lourds (Esteller 2008, Portincasa et Calamita 2012, Boyer 2013).

I – 2 – 2 – 1 – Les acides biliaires

Les ABs ont une structure amphipathique composée d'une extrémité polaire (lieu de conjugaison à la glycine ou à la taurine), une extrémité apolaire (noyau du cholestérol) formant une face polaire avec des groupements alcool et une face apolaire avec des fonctions méthyle (Figure 4).

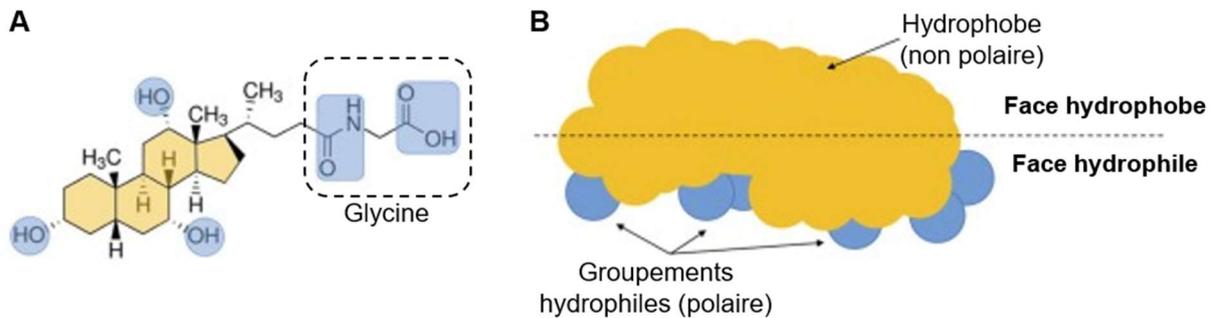


Figure 4 : Les acides biliaires sont amphipathiques. A. Structure du glycocholate. **B.** Les acides biliaires ont une face hydrophile et une face hydrophobe. Adapté de Urdaneta et Casadesus 2017.

Les ABs ont longtemps été considérés comme de simples détergents responsables de la solubilisation du cholestérol dans la bile et des graisses alimentaires dans les intestins. La découverte des récepteurs spécifiques des ABs en 1999 (*Farnesoid X Receptor*, FXR) et en 2004 (*Takeda G-protein coupled Receptor 5*, TGR5) ont permis de mettre en exergue leur rôle de signalisation au cours de processus biologiques tels que les métabolismes des ABs, du cholestérol, des triglycérides et du glucose, l'homéostasie énergétique, la perméabilité cellulaire, l'inflammation, l'apoptose et la prolifération cellulaire (Combettes *et al.* 1988, Bouscarel *et al.* 1995, Rao *et al.* 2002, Anwer 2012).

La biosynthèse des ABs s'effectue par deux voies majeures : la voie classique (ou neutre) et la voie alternative (ou acide) (Figure 5). La conversion du cholestérol hydrophobe en ABs amphiphiles fait intervenir 17 enzymes localisées dans le cytosol, le Réticulum Endoplasmique (RE), les mitochondries et les peroxysomes. La voie classique est initiée par la cholestérol-7 α -hydroxylase (CYP7A1), seule enzyme limitante de la biosynthèse des ABs alors que la voie alternative est initiée par la stérol-27-hydroxylase (CYP27A1) (Russell 2003, Chiang 2009). Dans des conditions physiologiques, la voie classique est prédominante, la voie alternative comptant pour seulement 9 % de la production journalière d'ABs (Duane et Javitt 1999). A partir du cholestérol, le foie humain synthétise deux ABs dits « primaires », à savoir le cholate et le ChénoDésoxyCholate (CDC). Ces derniers sont conjugués soit à la taurine soit à la glycine avec un rapport glycine/taurine de 3 pour 1 dans l'espèce humaine. A pH physiologique, la conjugaison favorise l'ionisation des ABs par des ions monovalents (essentiellement Na⁺ et K⁺) pour former des sels biliaires, ce qui augmente leur

solubilité et diminue leur toxicité (Russell 2003, Chiang 2013, Reshetnyak 2013). Les ABs conjugués sont déconjugués et déhydroxylés par le microbiote intestinal en ABs dits « secondaires », le désoxycholate (DC) et le lithocholate (LC). L'ursodésoxycholate (AUDC) est un AB dit « tertiaire » formé par la 7 β -épimérisation du CDC. Les ABs ayant un index d'hydrophilie élevé, tel que l'AUDC, sont cholérétiques, ont une concentration micellaire critique (CMC) élevée et ont une moindre toxicité cellulaire. Au contraire, les acides biliaires hydrophobes, tels que le CDC et le LC, ont une toxicité cellulaire importante (Perez et Briz 2009).

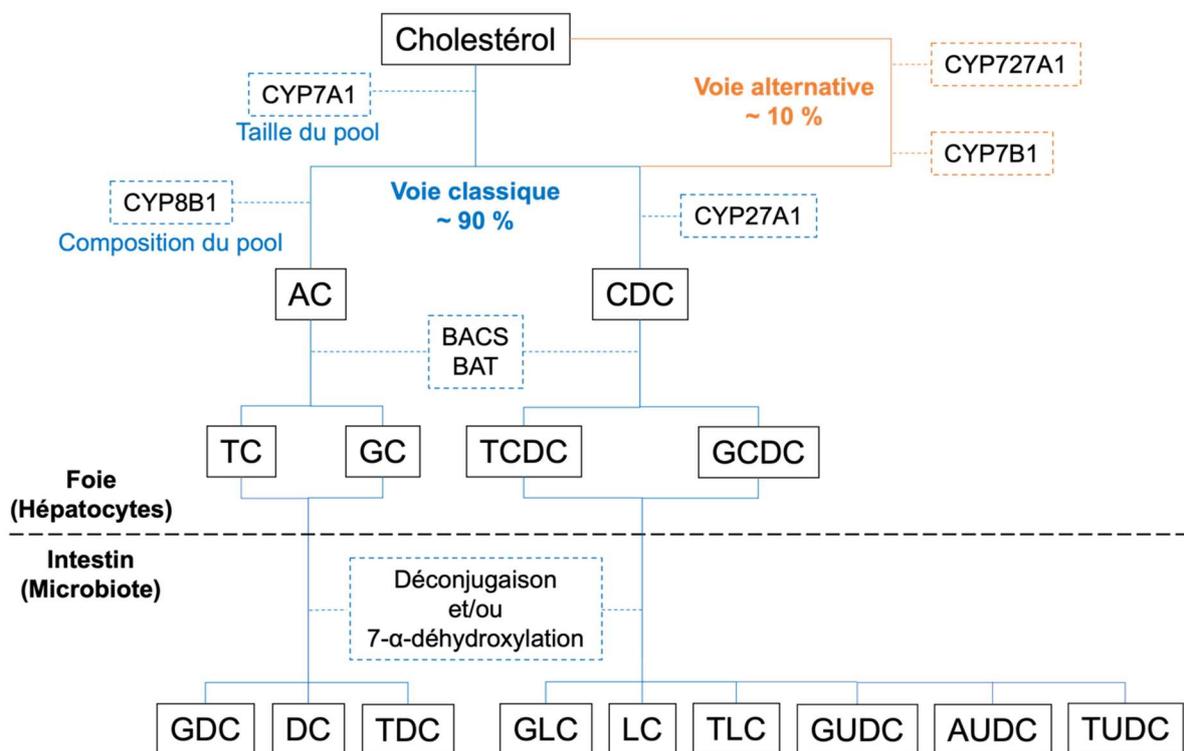


Figure 5 : Biosynthèse des acides biliaires. CDC : chénodésoxycholate, AUDC : ursodésoxycholate, DC : désoxycholate, GUDC : glycoursdésoxycholate, GC : glycocholate, GCDC : glyochénodésoxycholate, GDC : glycodésoxycholate, GLC : glycolithocholate, LC : lithocholate, TUDC : tauroursodésoxycholate, TC : taurocholate, TCDC : taurochénodésoxycholate, TDC : taurodésoxycholate et TLC : Tauroolithocholate. Adapté de Chiang 2009.

Dans l'espèce humaine, la biosynthèse des ABs est responsable du renouvellement quotidien d'une fraction importante du cholestérol. Cependant, seulement 200 à 600 mg d'ABs sont produits par jour soit environ 5 % du pool total d'ABs circulants (Chiang 2013). En effet, près de 95% des ABs sécrétés sont réabsorbés par un processus appelé « cycle entérohépatique » (Figure 6). Les ABs sont transportés jusqu'au CB par diffusion passive, par des transporteurs cytosoliques (*Ileal Bile-Acid*

Binding Protein, IBABP ou FABP6) ou par des vésicules golgiennes (Kipp *et al.* 2002, Boyer 2013). Ils sont ensuite sécrétés de manière active dans le CB par les transporteurs hépatocytaires ABCB11 (*Bile Salt Export Pump*, BSEP) et ABCC2 (*Multidrug Resistant associated Protein 2*, MRP2). Après avoir rempli leur rôle dans la digestion, les ABs sont réabsorbés dans les entérocytes de l'iléon terminal sous les actions coordonnées de l'*Apical Sodium dependent Bile acid Transporter* (ASBT/SLC10A2) situé à la membrane apicale et de l'*Organic Solute Transporter* (OST α/β) et ABCC3 (MRP3) situés à la membrane basolatérale des entérocytes (Trauner et Boyer 2003, Ballatori *et al.* 2005). Ils sont ensuite acheminés au foie par la veine mésentérique et la veine porte. Les ABs sont extraits efficacement du sang sinusoidal et captés par les hépatocytes grâce à deux transporteurs situés sur la face basolatérale des hépatocytes : le *Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide* (NTCP/SLC10A1) et l'*Organic Anion Transporters* (OATP). NTCP est le principal transporteur basolatéral des ABs. C'est un transporteur actif secondaire de type symport : il utilise l'énergie du gradient de sodium généré par la pompe Na^+/K^+ ATPase pour le transport d'ABs (Trauner et Boyer 2003, Lu *et al.* 2019). Les OATPs transportent quant à eux la bilirubine non conjuguée, les ABs non conjugués et des xénobiotiques (Wolkoff 2014). Les ABs secondaires qui échappent à la réabsorption dans l'intestin grêle sont passivement réabsorbés dans le côlon ou éliminés dans les selles (~ 5 %). Cette perte est compensée par la synthèse de novo d'ABs. Le cycle entérohépatique a lieu 4 à 12 fois par jour et permet une captation rapide et complète des ABs par le foie (Chiang 2013). En cas de surcharge hépatocyttaire en ABs, les transporteurs basolatéraux ABCC3 et ABCC4 (MRP4) exportent les ABs vers le sang (Trauner et Boyer 2003, Boyer 2013).

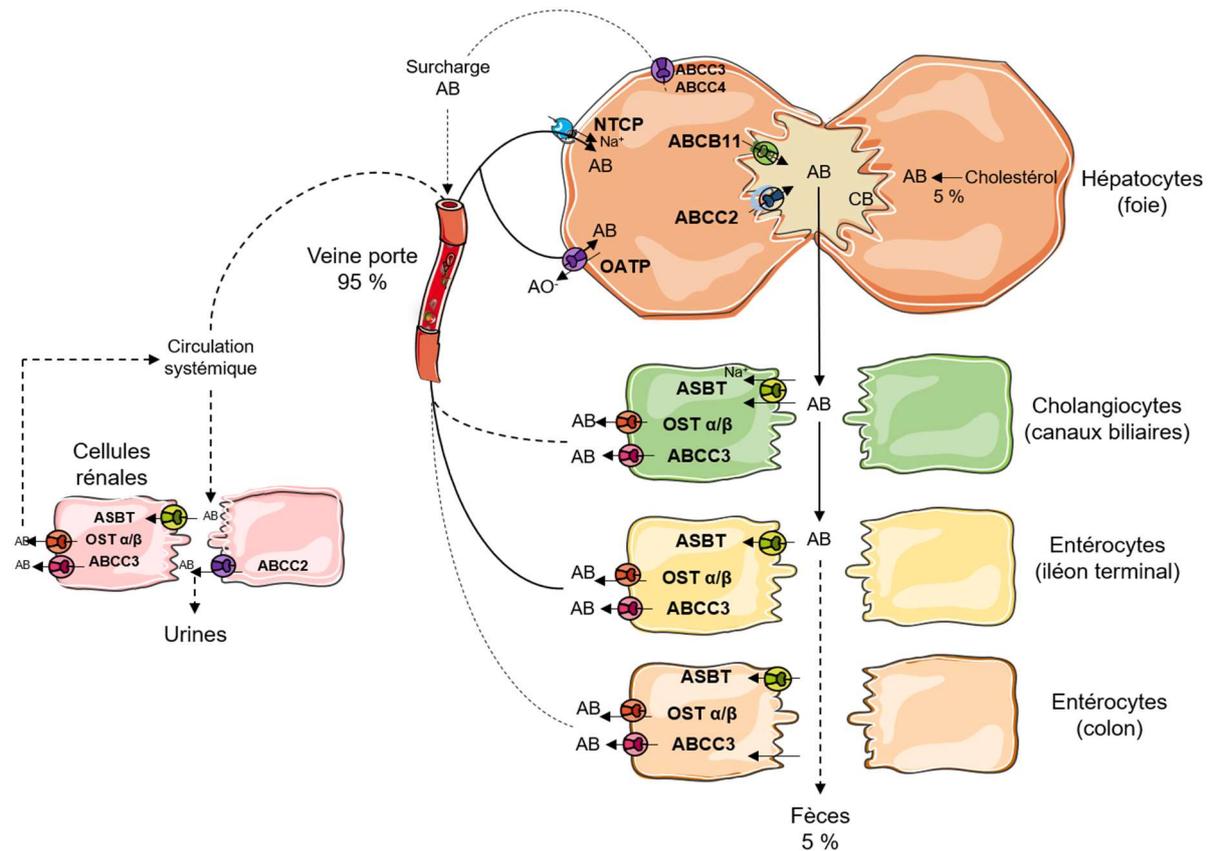


Figure 6 : Cycle entérohépatique. AB : acides biliaires, AO⁻ : Anion Organique, ASBT : Apical Sodium Bile salt Transporter, CB : Canalicule Biliaire, NTCP : Na-Taurocholate Cotransporting Polypeptide, OATP : Organic Anion Transporter, OST α/β : Organic Solute Transporter α et β.

FXR est le principal régulateur de l'absorption intestinale des ABs. Quand la concentration cellulaire en ABs augmente, les ABs se lient et activent FXR qui régule négativement l'expression d'ASBT et positivement celle d'OST α/β (Lee *et al.* 2006). L'activation de FXR réprime également la synthèse d'ABs. D'une part, FXR induit l'expression du *Short Heterodimer Partner* (SHP), qui réprime le *Liver Receptor Homolog-1* (LRH-1) et l'*Hepatocyte Nuclear Factor-4* (HNF-4) impliqués dans l'expression de CYP7A1 et CYP8B1. D'autre part, FXR favorise l'expression et la sécrétion de FGF19 qui réprime CYP7A1 (Holt *et al.* 2003, Figure 7).

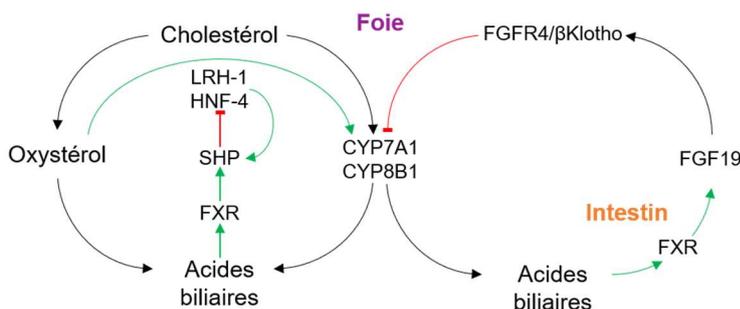


Figure 7 : Régulation de la synthèse des acides biliaires. FGF19 : Fibroblast Growth Factor 19, FGFR4 : Fibroblast Growth Factor 4 Receptor (FGFR4), FXR : Farnesoid X receptor, HNF-4 : Hepatocyte Nuclear Factor-4, LRH-1 : Liver Receptor Homolog 1, SHR : Short Heterodimer Partner (SHP). Modifié de Russell 2009.

I – 2 – 2 – 2 – L'équilibre micellaire

Les ABs seuls exercent des effets détergents sur les membranes de l'épithélium biliaire. Au-delà d'une certaine concentration en ABs (concentration micellaire critique, CMC), les ABs s'associent à une molécule de cholestérol pour former spontanément des micelles simples dans la bile (Wang *et al.* 2009). La PhosphatidylCholine (PC) est le phospholipide majoritaire (95 %) de la bile. Elle s'associe avec les micelles simples pour former des micelles mixtes qui permettent le maintien du cholestérol en solution. Ces micelles préviennent la cristallisation du cholestérol et la formation de calculs biliaires. Les vésicules unilamellaires sont des structures sphériques encore plus grandes permettant de solubiliser encore plus de cholestérol (Figure 8). La formation de ces différentes structures dépend de la concentration en ABs, en PC et en cholestérol. En 1968, Admirand et Small étudient l'aspect de la bile chez des sujets sains et des sujets atteints de pathologies biliaires. Ils définissent ainsi que, pour une solubilisation optimale du cholestérol, la bile doit contenir 80 % d'ABs, 15 % de PC et 5 % de cholestérol (Admirand et Small 1968, Figure 8). Un déséquilibre dans ces proportions entraîne la sécrétion d'une bile pathologique riche en cristaux et calculs cholestéroliques. L'importance de ces micelles est mise en exergue dans la PFIC3, maladie cholestatique liée à un défaut de sécrétion de PC par ABCB4 (*MultiDrug Resistance protein 3*, MDR3) (de Vree *et al.* 1998). La PFIC3 est plus détaillée en section III – 1 – 3, page 34.

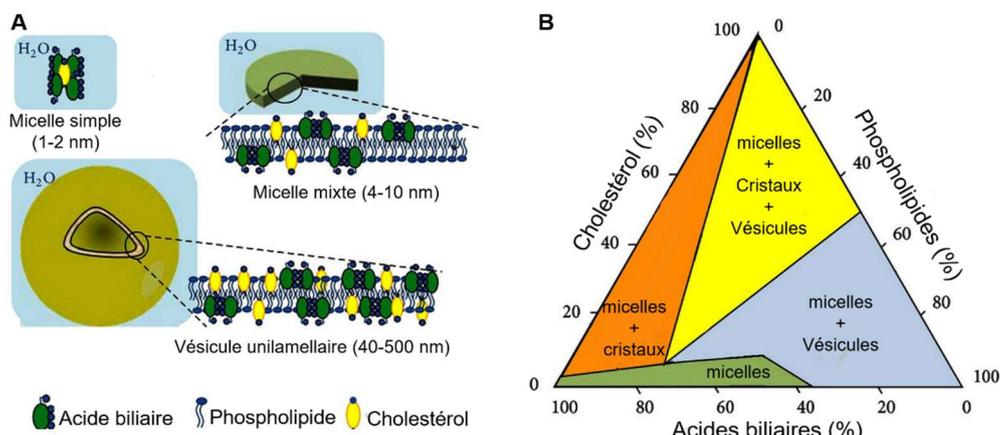


Figure 8 : Formation de micelles et vésicules unilamellaires dans la bile. **A.** Les acides biliaires, les phospholipides et le cholestérol se solubilisent dans la bile grâce à la formation de micelles et vésicules unilamellaires. **B.** Diagramme d'Admirand et Small décrivant les différents aspects de la bile en fonction des proportions en acides biliaires, phospholipides et cholestérol. Adapté de Di Ciaula *et al.* 2013.

1 – 2 – 3 – Formation et sécrétion de la bile

Dans l'espèce humaine, 600 à 800 mL de bile sont produits par jour. On distingue la bile canaliculaire, produite par les hépatocytes, dite initiale ou primaire (75 % du flux biliaire) et la bile ductulaire modifiée par les cholangiocytes (25 % du flux biliaire) (Figure 9). Sperber a été le premier à émettre l'hypothèse de la formation de la bile par la génération d'une force osmotique favorisant les mouvements de sodium et d'eau (Sperber 1959). Cette force est dépendante de la sécrétion de solutés osmotiquement actifs dans la bile par un processus qui requiert de l'énergie.

Au niveau du CB, l'étape limitante qui conditionne cette sécrétion est la force osmotique générée par la sécrétion d'ABs dans la bile (8 à 25 μL de bile par μmol d'ABs). Il persiste cependant un flux biliaire en absence d'ABs. Ce flux est lié à la sécrétion de bicarbonate et de glutathion (GSH) dans le CB par l'*anion exchange protein 2* (AE2/SLC4A2) et ABCC2. On distingue ainsi deux fractions de sécrétion biliaire initiale : une fraction dépendante de la sécrétion d'ABs (*Bile Salt-Dependent bile Flow* – BSDF) et une fraction indépendante des ABs (*Bile Salt-Independent bile Flow* – BSIF) (Boyer 2013). L'importance de ces fractions diffère en fonction des espèces (Figure 9). Dans l'espèce humaine, 50% de la sécrétion biliaire initiale est dépendante de la sécrétion d'ABs. Ainsi, toute anomalie de la sécrétion d'ABs dans la bile entraînera une diminution de la sécrétion biliaire.

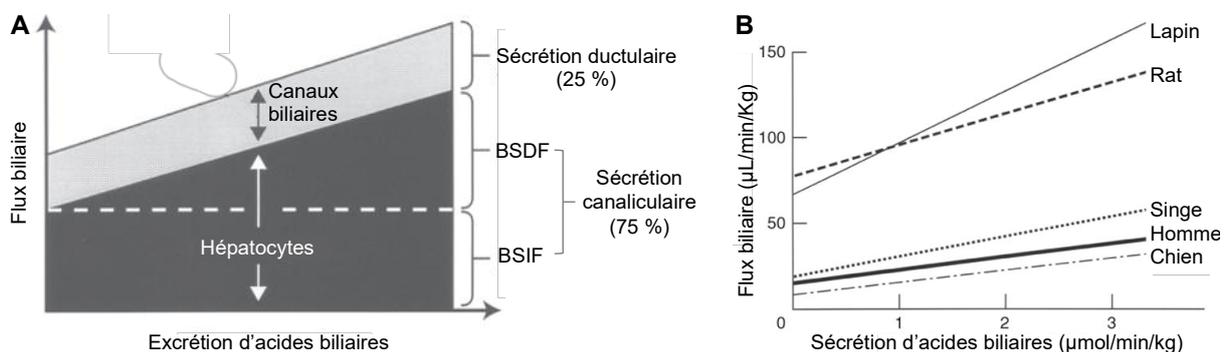


Figure 9 : Les différentes fractions biliaires. A. Le flux biliaire comprend une fraction ductulaire, une fraction canaliculaire dépendante de la sécrétion des acides biliaires (BSDF) et une fraction canaliculaire indépendante de la sécrétion des acides biliaires (BSIF). **B.** Le flux biliaire est dépendant de la sécrétion biliaire des acides biliaires et l'importance de la fraction canaliculaire dépendante de la sécrétion des acides biliaires varie selon les espèces. D'après Boyer 2013.

La sécrétion de la bile initiale est directement conditionnée par la présence de transporteurs actifs à la membrane canaliculaire des hépatocytes (Boyer 2013). ABCB11 sécrète les ABs, ABCB4 transloque la PC et ABCG5/G8 transporte le cholestérol. Ces trois composés sécrétés de façon concomitante forment des micelles mixtes dans l'environnement aqueux de la bile qui préviennent la cristallisation du cholestérol ou la formation de calculs biliaires. En complément, ABCC2 exporte des acides biliaires divalents, des anions organiques et le GSH qui participe au BSIF. ABCB1 (*multidrug resistance protein 1*, MDR1 ou *P-glycoprotein*, Pgp) participe à la détoxification en exportant des cations organiques et une grande variété de xénobiotiques et toxines endogènes et exogènes. Enfin, la flippase ATP8B1 (FIC1), protège la membrane contre l'action détergente des ABs en transloquant la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE) du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane (Paulusma *et al.* 2006). Les défauts de ces transporteurs entraînent des pathologies hépatobiliaires sévères telles que les PFICs, la sitostérolémie, le syndrome de Dubin-Johnson et la résistance aux médicaments anti-cancéreux (Figure 10).

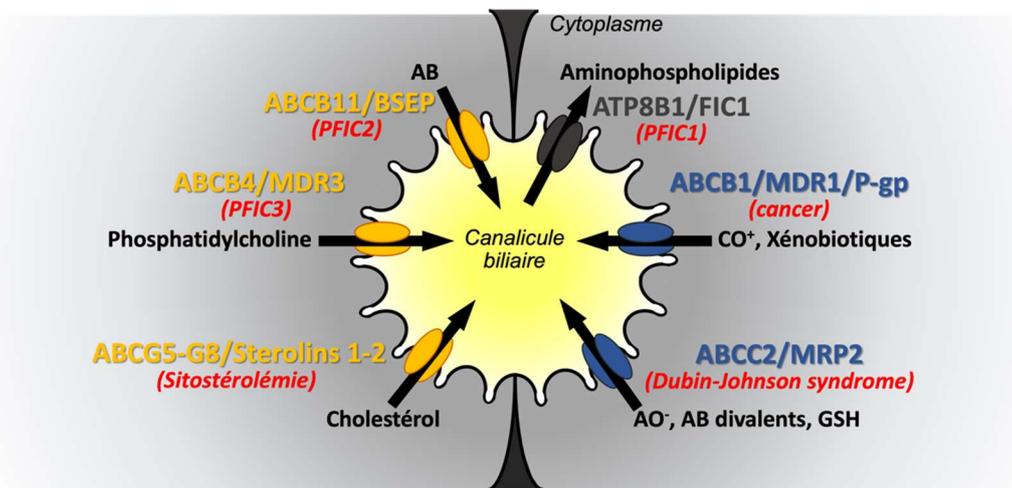


Figure 10 : Transporteurs canaliculaires impliqués dans la sécrétion biliaire. Les acides biliaires (AB) sont sécrétés dans la bile par ABCB11. ABCB4 sécrète la phosphatidylcholine et l'hétérodimère ABCG5-G8 transporte le cholestérol. ABCC2 assure la sécrétion d'anions inorganiques (AO⁻), de glutathion (GSH) et d'AB divalents. ABCB1 exporte les cations organiques (CO⁺) et les xénobiotiques. ATP8B1 est une flippase de phosphatidylsérine et phosphatidyléthanolamine. D'après Ben Saad, Bruneau, Mareux *et al.* 2021.

Le long de sa progression dans l'arbre biliaire, la bile initiale est modifiée par les cholangiocytes selon des processus de sécrétion/réabsorption. Ces processus sont régulés par des stimuli (hormones, calcium intracellulaire, osmolarité) (Banales *et al.*

2019, Figure 11). La sécrétion de bicarbonate, permise par la coopération d'ABCC7 (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*, CFTR) et AE2, génère le gradient osmotique permettant les mouvements d'eau et de sodium. Elle permet également l'alcalinisation de la bile qui évite la réabsorption d'ABs par l'épithélium ductulaire et neutralise l'acidité des sécrétions gastriques. Les ABs non conjugués sont réabsorbés par les cholangiocytes et sont acheminés aux hépatocytes par le plexus vasculaire péri-biliaire, on parle de shunt choléhépatique (depuis les voies biliaires) ou cholécysto-hépatique (depuis la vésicule biliaire) (Lamri *et al.* 1992, Portincasa et Calamita 2012, Debray *et al.* 2012).

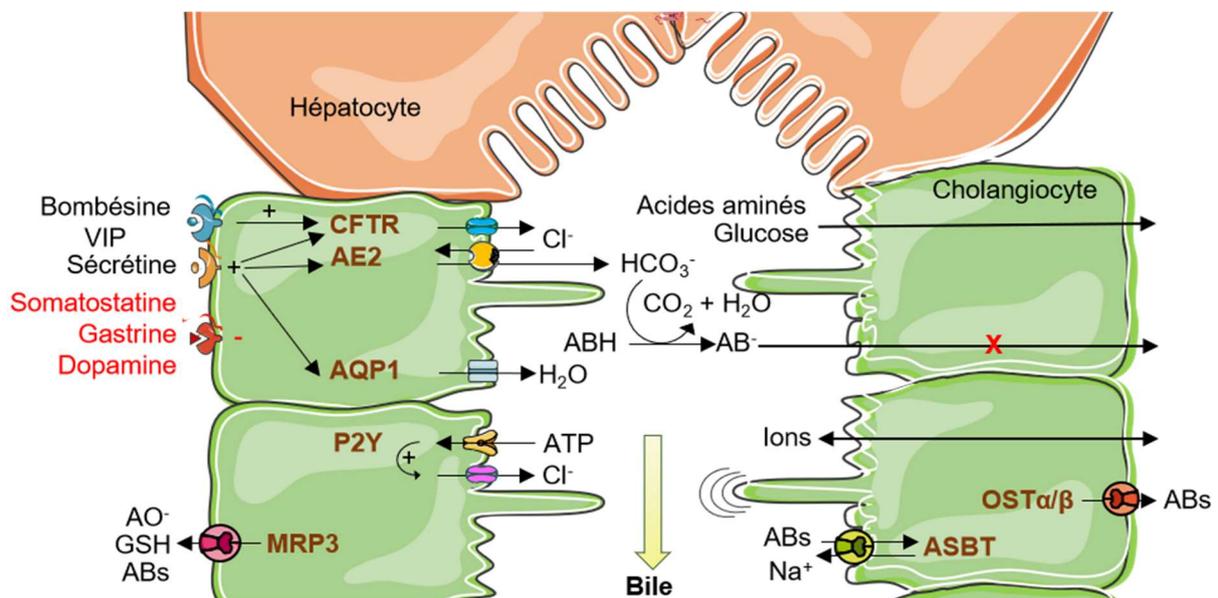


Figure 11 : Modification de la bile par les cholangiocytes. Les cholangiocytes réabsorbent les acides aminés, le glucose, le glutathion (GSH) et les anions organiques (AO⁻). La sécrétion de bicarbonate (HCO₃⁻) est permise par la coopération de CFTR et d'AE2. Le bicarbonate permet la sécrétion d'eau via les aquaporines (AQP1) et évite la réabsorption des acides biliaires protonés (ABH). Ce mécanisme est régulé par des hormones et des voies de signalisation. Le cil est un mécanosenseur, osmosenseur et chemosenseur. Modifié de Banales *et al.* 2019.

Une grande portion (75 %) de la bile est stockée dans la vésicule biliaire. Elle y subit des modifications par les cellules épithéliales de la vésicule biliaire (réabsorption d'eau et sécrétion de bicarbonate et de mucines). Il en résulte une bile vésiculaire plus visqueuse et plus concentrée. Elle sera déversée dans le duodénum en période postprandiale sous l'action d'hormones intestinales telle que la cholécystokinine qui induit le relâchement du sphincter d'Oddi et la contraction de la vésicule biliaire (Housset *et al.* 2016).

Les hépatocytes, cholangiocytes et cellules épithéliales de la vésicule biliaire possèdent également des aquaporines, des pompes Na^+/K^+ ATPase et des Na^+/H^+ Exchanger (NHE) (Esteller 2008, Portincasa et Calamita 2012). Ces transporteurs jouent un rôle primordial dans les mouvements d'eau et le maintien de l'équilibre ionique dans la bile (Marinelli *et al.* 2011).

II – Le transporteur ABCB11

II – 1 – Découverte

En 1991, le transport d'ABs dépendant de l'ATP est décrit pour la première fois dans des vésicules isolées de la membrane canaliculaire du rat (Adachi *et al.* 1991), (Nishida *et al.* 1991). Quelques années plus tard, un gène est partiellement isolé d'une banque d'ADNc de cochon grâce à l'utilisation d'une sonde dérivée d'ABCB1. Ce gène serait issu d'une duplication d'*ABCB1* au cours de l'évolution et est nommé « *sister of P-glycoprotein* » (*s-Pgp*) (Childs *et al.* 1995). Ce n'est qu'en 1998 que se fait le recoupement entre le gène *s-Pgp* et la fonction de transport d'ABs ATP dépendant. L'ADNc complet de *s-Pgp* est isolé à partir de foies de rats. Son expression dans des oocytes de Xénope ou des vésicules issues d'insectes Sf9 induit un transport d'ABs dépendant de l'ATP (Gerloff *et al.* 1998). *s-Pgp* est alors renommée « *Bile Salt Export Pump* » (BSEP/ABCB11). Plus tard, des variants du gène *ABCB11* humain sont associées à une forme de maladie cholestatique sévère altérant la sécrétion biliaire d'ABs (Strautnieks *et al.* 1998). Cette maladie sera nommée « *Progressive Familiale Intrahepatic Cholestasis Type 2* » (PFIC2) et est détaillée en section III – 1 – 3, page 35.

II – 2 – Expression cellulaire et distribution tissulaire

Le gène *ABCB11* est relativement conservé dans l'évolution (Cai *et al.* 2001). Ses orthologues rongeurs (rat et souris) présentent environ 80 % d'identité avec *ABCB11* humain. Dans l'espèce humaine, le gène *ABCB11* est localisé sur le bras long du chromosome 2 (2q24-31). La région génomique est de 108 kb et consiste en 28 exons codants, le premier n'étant pas traduit (Kubitz *et al.* 2012). Trois isoformes ont été détectées dans une banque d'ADNc hépatique, l'isoforme A étant considérée comme

référence (Kubitz *et al.* 2014). L'isoforme B possède une insertion de 42 pb dans l'intron situé entre les exons 1 et 2. L'isoforme C possède une insertion de 27 pb dans l'intron situé entre les exons 15 et 16 (Figure 12). L'isoforme B est détectée à des degrés variables dans des échantillons de foie humain. La fonction de ces isoformes n'est pas déterminée à ce jour.

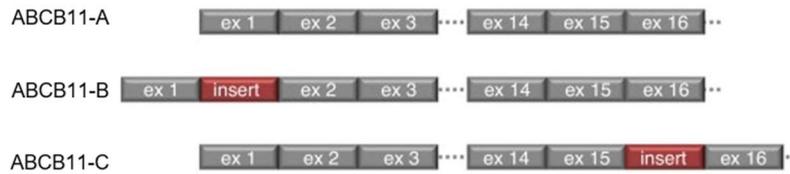


Figure 12 : Variants d'épissage d'ABCB11 humain. Trois isoformes d'ABCB11 ont été détectées. L'isoforme A est celle de référence (NM_003742.2). Adapté de Kubitz *et al.* 2014.

Dans l'espèce humaine, une forte expression de l'ARNm d'ABCB11 est détectée dans le foie et à moindre niveau dans les testicules et les glandes surrénales (de fonction inconnue). De faibles traces ont été retrouvées dans la trachée, la prostate, les poumons, le thymus, le rein et le colon. Cependant, mise à part dans les testicules, la protéine n'a pu être mise en évidence dans les tissus extrahépatiques (Stieger 2011, Figure 13).

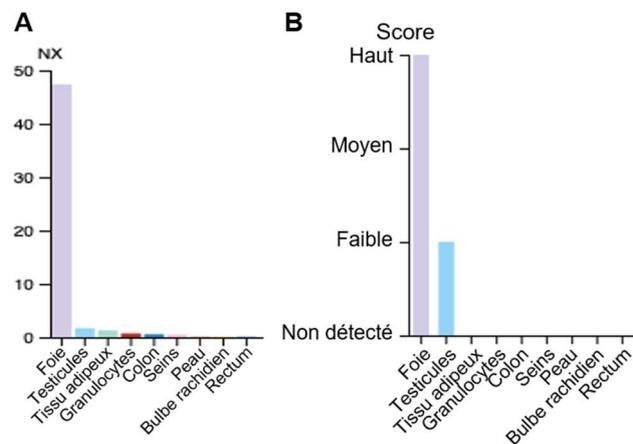


Figure 13 : Expression d'ABCB11 dans l'espèce humaine. **A.** Niveaux consensuels d'expression de l'ARNm normalisée (NX) pour 55 types de tissus et 6 types de cellules sanguines, créés en combinant les données des trois ensembles de données transcriptomiques (HPA, GTEx et FANTOM5). **B.** Niveaux d'expression protéique. Données disponibles via The human protein atlas (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000073734-ABCB11/tissue>).

La protéine humaine traduite est composée de 1321 acides aminés et a un poids moléculaire de 160 kDa. Dans le foie, l'expression de la protéine est restreinte aux CBs des hépatocytes. Dans des conditions basales, un sixième d'ABCB11 réside dans la membrane canaliculaire, le reliquat est localisé dans des vésicules sous-apicales de réserve d'où il peut être mobilisé rapidement à la surface cellulaire (Kipp *et al.* 2001). La redistribution entre le pool intracellulaire de réserve et la surface cellulaire permet de répondre ponctuellement à la demande de l'organisme. Elle est perturbée dans la plupart des maladies cholestatiques.

II – 3 – Fonction

Par sa fonction de transport d'ABs, ABCB11 est l'acteur majeur du BSDF (Gerloff *et al.* 1998). C'est le transporteur des ABs monovalents, de l'hépatocyte vers le CB, contre un fort gradient de concentration. Ce transport est strictement dépendant de l'hydrolyse de l'ATP et n'est pas stimulé par d'autres nucléotides (Adachi *et al.* 1991, Nishida *et al.* 1991, Stieger *et al.* 1992). Une légère différence dans l'affinité des ABs transportés est observée selon les espèces : l'orthologue humain transporte le TCDC > GCDC > TC > GC > cholate alors que l'orthologue de rat transporte le TCDC > GCDC/TC > GC (Hayashi *et al.* 2005b).

Au niveau de la membrane canaliculaire, ABCB11 est localisé dans des microdomaines riches en cavéoline-1 (Cav-1) et en cholestérol. D'une part, ces domaines protégeraient ABCB11 de l'effet détergeant des ABs. D'autre part, Cav-1 et le cholestérol sont requis pour la fonction d'ABCB11. La surexpression de Cav-1 chez la souris augmente la sécrétion biliaire d'ABs, suggérant un rôle positif de Cav-1 dans l'activité de transport ABCB11 (Moreno *et al.* 2003). Dans des vésicules d'insecte Sf9 exprimant ABCB11, l'addition de cholestérol est corrélée à une augmentation du transport d'ABs (Kis *et al.* 2009). De plus, des expériences de déplétion/addition de cholestérol dans des vésicules de membranes de foie de souris montrent une corrélation directe entre le contenu membranaire en cholestérol et l'activité d'Abcb11 (Paulusma *et al.* 2009).

ABCB11 transporte également des composés autres que les ABs. En effet, il a été démontré que Abcb11 souris exprimé dans des cellules LLC-PK1 transporte la vinblastine et la calcéine AM, substrat fluorescent d'Abcb1 (Lecreur *et al.* 2000). De plus, un transport de pravastine a été mis en évidence pour ABCB11/Abcb11 humain et rat (Hirano *et al.* 2005). La cyclosporine A (CsA), le glibenclamide et la rifampicine interagissent également avec ABCB11 sans en être pour autant des substrats. Ces interactions inhibent ABCB11 et pourraient expliquer l'hépatotoxicité observée dans les cholestases médicamenteuses (Stieger *et al.* 2000).

II – 4 – ABCB11 est un transporteur ABC

II – 4 – 1 – La superfamille des transporteurs ABC

ABCB11 appartient à une des plus grandes familles de protéines transmembranaires : la superfamille des transporteurs *ATP-binding cassettes* (ABC). Les membres de cette famille sont retrouvés dans toutes les espèces, tant procaryotes qu'eucaryotes. Dans l'espèce humaine, on compte 48 transporteurs regroupés en 7 sous-familles (ABCA à ABCG) selon leurs spécificités de séquence (Tableau 1). Ils sont exprimés dans tout l'organisme et permettent le transfert à travers les membranes cellulaires de substrats variés (acides aminés, peptides, protéines, ions organiques et inorganiques, toxines, antibiotiques) contre leur gradient de concentration en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (Dean *et al.* 2001).

Les transporteurs ABC partagent une architecture commune. Ils sont généralement constitués de deux séquences en tandem (hémi-transporteurs), composée chacune d'un *Membrane Spanning Domain* (MSD) et d'un *Nucleotide Binding Domain* (NBD). Les deux hémi-transporteurs sont reliés par une séquence cytoplasmique appelée domaine « *linker* », impliquée dans le trafic intracellulaire, la stabilité membranaire, la dégradation ou la régulation de l'activité des transporteurs ABC (Kolling et Losko 1997, Ferreira *et al.* 2013, Macalou *et al.* 2016). Chaque MSD est formé de 6 hélices α transmembranaires (TMs) qui permettent la reconnaissance et la translocation du substrat. Les TMs sont reliés entre elles par des boucles intracellulaires (*IntraCellular Loops* - ICLs) et extracellulaires (*ExtraCellular Loops* - ECLs). Les boucles intracellulaires permettent de positionner les NBDs à distance de la membrane et la transmission des réarrangements conformationnels des NBDs/MSDs (Doshi *et al.* 2013). Les NBDs sont situés dans le cytoplasme et permettent la liaison et l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire au transport. Ils arborent des motifs conservés cruciaux indispensables à la liaison et l'hydrolyse de l'ATP et la communication NBDs/NBDs et NBDs/MSDs (Szollosi *et al.* 2018, Stockner *et al.* 2020, Figure 14). Il s'agit

des *Walker A* (WA) (GxxGxGK-S/T)¹, *Walker B* (WB) (hhhhDE)², motif signature (LSGGQ), *A-loop* (F/K-xY), *D-loop* (SALD), *H-loop* (hAHRL), *Q-loop* (hV-S/P-Q) et *X-loop* (TRVGDKGTQ). Les deux sites de liaison à l'ATP (Nucleotide Binding Sites, NBSs) se forment à l'interface entre les deux NBDs, chacun constitué du WA, WB, A-, Q- et H-loop d'un NBD et de la signature ABC et la X-loop de l'autre NBD.

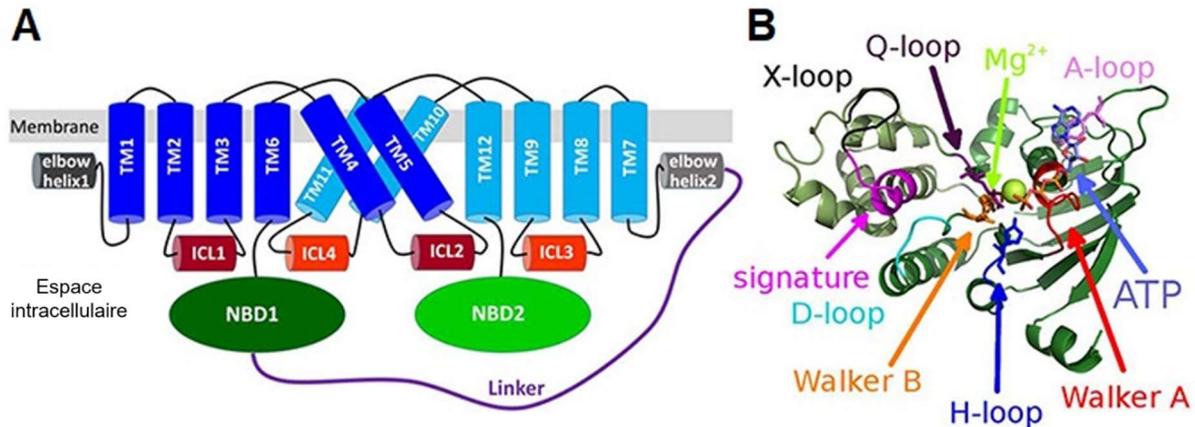


Figure 14 : Structure d'un transporteur ABC. **A.** Modèle topologique du repliement de la sous-famille ABCB. ICL : Intracellular loop, NBD : Nucleotide binding domain et TM : Transmembrane domain. **B.** Le site de liaison à l'ATP se forme à l'interface entre les deux NBDs. Il est constitué de motifs conservés cruciaux pour la formation et la stabilisation ainsi que pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Adapté de Szollosi *et al.* 2018.

Des spécificités existent parmi les membres de cette famille (Tableau 1). Certains transporteurs de la sous-famille ABCC possèdent un MSD supplémentaire en N-terminal (MSD0) nécessaire au trafic et à la régulation de l'activité (Deeley *et al.* 2006). CFTR est un canal et possède un domaine régulateur « R » qui permet de moduler son ouverture (Csanady *et al.* 2019). Le NBS-a de certains transporteurs tels qu'ABCB11 et CFTR est dit « dégénéré » car il contient des résidus non-consensus qui entravent fortement l'hydrolyse de l'ATP dans ce site (Stockner *et al.* 2020). Les membres de la sous-famille ABCG sont des héli-transporteurs qui nécessitent une dimérisation pour assurer leur fonction. Enfin, les transporteurs des sous-familles ABCE et ABCF n'ont pas de MSDs et sont solubles (Dean et Annilo 2005).

¹ x représente un résidu quelconque

² h représente un résidu hydrophobe

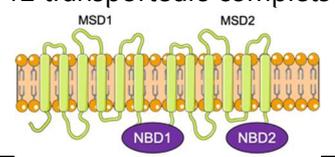
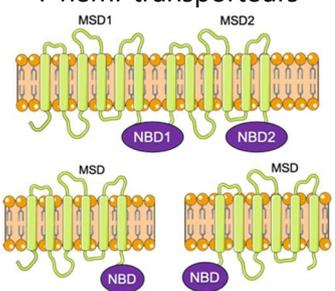
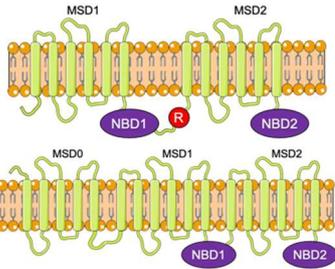
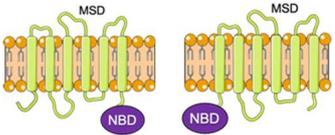
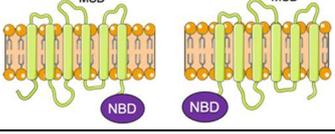
Sous-famille	Topologie	Substrats	Localisation subcellulaire	Pathologies associées
ABCA	12 transporteurs complets 	Cholestérol Lipides	- Membrane - Lysosomes - Corps lamellaires	Maladie de Tangier (ABCA1) Alzheimer (ABCA2) Défiance respiratoire néonatale (ABCA3) Maladie de Stargardt (ABCA4)
ABCB	4 transporteurs complets et 7 héli-transporteurs 	Acides biliaires Phospholipides Peptides Drogues	- Membrane - RE - Lysosomes - Mitochondries - BHE	PFIC2, BRIC2, ICP (ABCB11) PFIC3, LPAC, ICP (ABCB4)
ABCC	12 transporteurs complets 	Phospholipides Acides biliaires Drogues Toxines Ions Bilirubine	Membrane	SDJ (ABCC2) PXE (ABCC6) Mucoviscidose (ABCC7/CFTR) Diabète de type 2 (ABCC8)
ABCD	4 héli-transporteurs 	Acides gras	- RE (ABCD4) - Peroxysomes	X-ALD (ABCD1)
ABCE	1 membre 	Fonction de régulation	Cytoplasme	/
ABCF	3 membres 	Inconnue	Cytoplasme	/
ABCG	5 héli-transporteurs 	Cholestérol Lipides Urée Drogues Stéroïdes	- Membrane - Endosomes	Goutte (ABCG2) Sitostérolémie (ABCG5/8)

Tableau 1 : Caractéristiques des transporteurs ABC. BHE : Barrière Hémato-Encéphalique, BRIC : Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis, CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, ICP : Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy, MSD : Membrane-Spanning Domain, LPAC : Low-Phospholipid Associated Cholelithiasis, NBD : Nucleotide-Binding Domain, PFIC : Progressive Familiale Intrahepatic Cholestasis, PXE : PseudoXanthome Élastique, R : Regulatory domain, RE : Reticulum Endoplasmique, SDJ : Syndrome de Dubin-Johnson et X-ALD : AdrénoLeucoDystrophie liée à X. Sources : Dean *et al.* 2001, Stefkova *et al.* 2004, Dean et Annilo 2005, Kapitulnik *et al.* 2009.

Malgré les différences de spécificité entre transporteurs ABC, un mécanisme général de transport peut être proposé (Stockner *et al.* 2020, Figure 15). Le cycle de transport commence avec un transporteur orienté vers l'intérieur (*inward-facing*) qui est lié à un ATP provenant du cycle de transport précédent. Cet ATP réside dans le NBS-a pour les transporteurs ayant un site dégénéré. La liaison du substrat aux MSDs permet la fixation d'un ATP dans le NBS libre. Cette fixation induit des réarrangements conformationnels : le transporteur est d'abord fermé vers l'intérieur et l'extérieur (état « *occluded* »), puis s'oriente vers l'extérieur (*outward-facing*) avec une affinité pour le substrat plus faible induisant sa libération. Enfin, l'hydrolyse de l'ATP induit la séparation des NBDs. Pour les transporteurs avec un NBS dégénéré, ce processus est asymétrique car seul le NBS-b est capable d'hydrolyser l'ATP. Il semble que ce processus soit également asymétrique chez les transporteurs canoniques pour lesquels l'hydrolyse de l'ATP se ferait alternativement entre le NBS-a et le NBS-b.

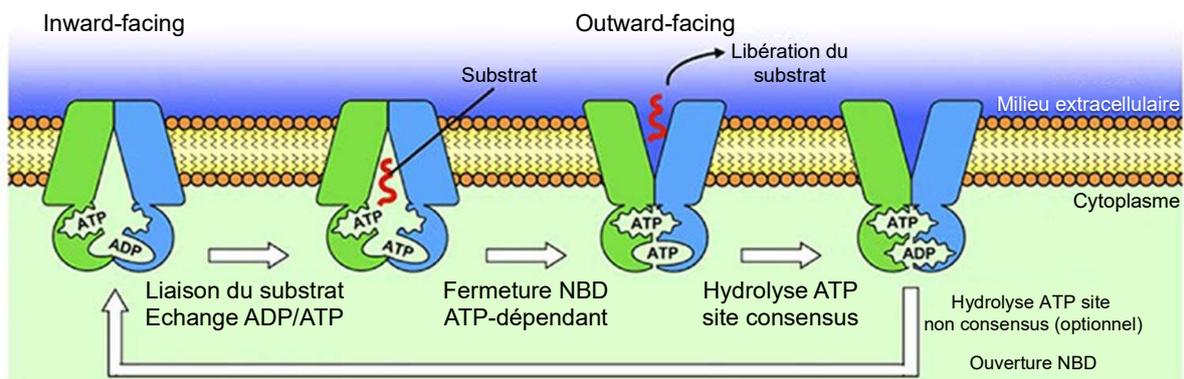


Figure 15 : Modèle illustrant le mécanisme de fonctionnement des transporteurs ABC. A l'état de repos, les NBDs sont ouverts, et le site de liaison au substrat fait face au cytoplasme. La liaison du substrat déclenche l'échange de l'ADP par l'ATP dans un NBS consensus et la fermeture du NBD. La cavité de liaison au substrat s'oriente vers le milieu extracellulaire pour libérer le substrat. L'hydrolyse dans le NBS consensus fermé affaiblit les contacts qui maintiennent le dimère NBDs (indiqué par la transition d'un contour lisse à un contour crénelé autour du nucléotide). Si le NBS est dégénéré, il est déjà déficient pour maintenir le dimère NBDs fermé, et donc le dimère NBD peut se dissocier sans hydrolyse supplémentaire. Adapté de Procko *et al.* 2009.

Les structures d'ABCB1, ABCB4 et ABCB11 ont récemment été résolues par cryo-microscopie électronique (cryo-EM) dans différentes conformations : ABCB1 en conformation « *outward-facing* », ABCB4 en conformation « *occluded* » et ABCB11 en conformation « *inward-facing* » (Kim et Chen 2018b, Olsen *et al.* 2020, Wang *et al.* 2020). ABCB11 partage 50 % d'identité et 67 % de similarité avec ABCB4 et 51 %

d'identité et 70 % de similarité avec ABCB1. La résolution des trois structures dans les différentes conformations pourrait donc permettre de mieux comprendre les mécanismes inhérents au fonctionnement de ces trois transporteurs.

II – 4 – 2 – Spécificité d'ABCB11

ABCB11 est un transporteur complet de la sous-famille ABCB. De ce fait, il est constitué de deux MSDs et deux NBDs. Abcb11 de rat possède quatre sites de N-glycosylation sur la première boucle extracellulaire (N109, N116, N122 et N125). Selon son état de glycosylation, ABCB11 peut être détecté sous deux formes : une forme immature à 140 kDa partiellement glycosylée généralement retenue dans le RE et une forme mature de 160 kDa entièrement glycosylée et adressée aux CBs (Mochizuki *et al.* 2007). Le NBS-a d'ABCB11 contient des résidus non canoniques essentiels à la fonction du transporteur. En effet, le remplacement des séquences dégénérées dans le NBS-a en séquences canoniques supprime l'activité ATPasique et la fonction de transport d'ABCB11 (Sohail *et al.* 2017). Le rôle de ce site dégénéré n'est pas complètement élucidé, mais la liaison à l'ATP dans ce site pourrait maintenir les NBDs dans une conformation suffisamment proche pour permettre plusieurs cycles de transport (Stockner *et al.* 2020). Les extrémités N- et C-terminales sont localisées dans le cytoplasme. Un motif tyrosine en C-terminale d'ABCB11 (YYKLV) est très conservé dans la sous-famille ABCB. La mutation des deux résidus tyrosines qui le composent bloque l'internalisation d'ABCB11 ce qui suggère un rôle de ce motif dans la stabilité de la protéine (Lam *et al.* 2012). Enfin, une analyse de la séquence protéique d'ABCB11 a permis de prédire plusieurs sites potentiels de phosphorylation sur des résidus sérines et thréonines qui pourraient jouer un rôle dans sa régulation (Noe *et al.* 2001).

Avant la publication de la structure d'ABCB11 par cryo-EM, plusieurs modèles d'homologie du transporteur ont été proposés en utilisant la structure de Sav1866 (PDB : 2HYD et 2ONJ) ou d'ABCB1 de souris corrigé (PDB : 4M1M) (Kubitz *et al.* 2012, Giovannoni *et al.* 2015, Droge *et al.* 2017, Jain *et al.* 2017, Sohail *et al.* 2017). Ces modèles concordent avec la structure d'ABCB11 récemment résolue par cryo-EM (PDB : 6LR0, Wang *et al.* 2020, Figure 16). La structure a une résolution de 3,5 Å, avec

les MSDs résolus à 3,3 Å. La protéine est dans une conformation « *inward-facing* », en absence de nucléotides ou d'autres petites molécules. Il est intéressant de noter qu'à l'intérieur de la cavité de translocation, une densité électronique a été trouvée, dans laquelle l'extrémité N-terminale de la protéine peut être insérée. Cependant, aucune donnée actuelle ne montre une auto-inhibition d'ABCB11 par son extrémité N-terminale (Wang *et al.* 2020).

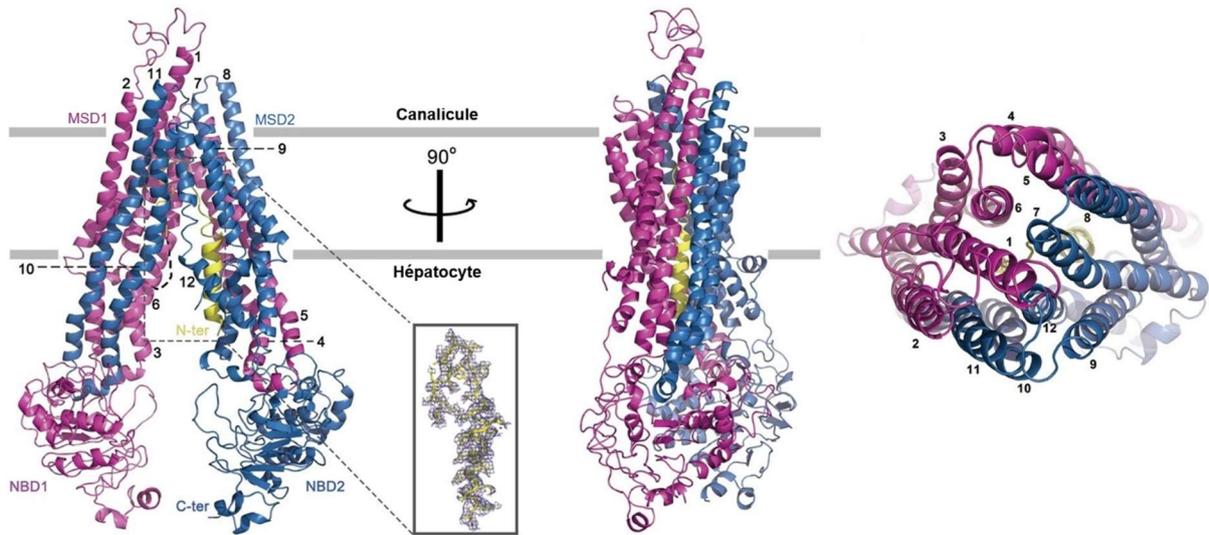


Figure 16 : Structure d'ABCB11 humain en conformation « inward-facing ». La structure résolue à 3,5 Å est montrée dans deux vues perpendiculaires et une vue du dessus. Les TM1 à TM6 sont colorés en magenta, et les TM7 à TM12 en bleu. L'hélice N-terminale est colorée en jaune et les détails de sa densité électronique sont représentés dans le rectangle. Tous les TMs sont indiqués par des numéros. D'après Wang *et al.* 2020.

II – 5 – ABCB11 de sa biosynthèse à sa dégradation

II – 5 – 1 – Biosynthèse et maturation

La biosynthèse des transporteurs ABC destinés aux CBs se fait dans le RE. Le repliement et la maturation des protéines naissantes s'y font de manière co-translationnelle. Durant leur maturation dans le RE, les transporteurs ABC acquièrent des modifications post-traductionnelles (glycosylation, palmitoylation, ponts disulfures, ubiquitination, phosphorylation) qui sont impliquées dans le trafic intracellulaire, l'activité, le repliement et le recyclage des transporteurs (Czuba *et al.* 2018). La N-glycosylation est essentielle au repliement des protéines. Elle permet la reconnaissance des protéines mal repliées qui seront ubiquitinées puis dégradées dans le cytosol via le système *ER-Associated Degradation* (ERAD) (Jayaprakash et Surolia

2017, Printsev *et al.* 2017). La délétion des sites de N-glycosylation induit une rétention d'Abcb11 dans le RE (Wang *et al.* 2008). Certains variants d'ABCB11 (G238V, D482G, G982R, R1153C et R1268Q) ont un défaut de repliement et sont peu ou pas glycosylés. L'expression de différentes E3 ubiquitine ligases (E3 ubl) associées au système ERAD (Rma1, TEB4 et HRD1) induit une dégradation accrue de ces variants (Wang *et al.* 2008). A l'inverse, la diminution de l'expression de ces E3 ubl par des ARN interférents (ARNsi) ou l'inhibition du protéasome stabilise certains de ces variants (Wang *et al.* 2002, Hayashi *et al.* 2005a). Ces résultats montrent que dans le RE, le protéasome via le système ERAD joue un rôle majeur dans la dégradation d'ABCB11.

Dans l'appareil de Golgi, les protéines transmembranaires subissent leur maturation finale, notamment des modifications dans leurs chaînes oligosaccharidiques. Ces glycosylations sont essentielles pour l'adressage et la stabilité à la membrane d'ABCB11. Des expériences de mutations progressives des asparagines glycosylables en glutamines non glycosylables dans une protéine de fusion Abcb11-GFP ont mis en évidence qu'au moins deux glycosylations sur les asparagines en position 109, 116, 122 et/ou 125 sont essentielles à l'adressage, la stabilité et la fonction d'ABCB11 (Mochizuki *et al.* 2007).

II – 5 – 2 – Trafic intracellulaire et endocytose

En sortant de l'appareil de Golgi, la majorité des protéines transmembranaires hépatocytaires sont adressées vers la membrane basolatérale avant de rejoindre la membrane apicale par transcytose. À la différence de ce modèle, des expériences de « pulse chase » chez le rat montrent que Abcb1, Abcb4 et Abcb11 sont adressés directement aux CBs. Abcb1 et Abcb4 sont adressés à la membrane canaliculaire alors qu'Abcb11 est adressé dans un compartiment sous-apical de réserve, où il réside dans des endosomes positifs pour la protéine *Ras-related in brain 11* (Rab11) (Kipp et Arias 2000a et 2000b, Wakabayashi *et al.* 2004). La demi-vie d'ABCB11 à la membrane est de 4 à 6 jours et il transite constitutivement de la membrane canaliculaire aux endosomes positifs pour Rab11 (Figure 17). Cette redistribution permet de répondre ponctuellement à la demande de l'organisme. La perturbation du cytosquelette

d'actine ou des microtubules inhibe ce cycle (Wakabayashi *et al.* 2004). L'association de Rab11 et de la Myosine Vb (MYO5B) permet le transport d'ABCB11, le long de microfilaments d'actine, des endosomes vers la membrane canaliculaire (Lapierre *et al.* 2001, Wakabayashi *et al.* 2005). L'expression de dominants négatifs de Rab11 ou de la MYO5B dans les cellules WIF-B9 (lignée hépatocytaire) induit un ralentissement de l'adressage canaliculaire d'Abcb11. La protéine motrice *myosin regulatory light chain 2* (MLC2) joue également un rôle dans le trafic d'ABCB11 le long des microfilaments d'actine entourant le canalicule (Chan *et al.* 2005). MLC2 interagit avec le domaine « *linker* » d'Abcb1, Abcb4 et Abcb11. L'expression d'un dominant négatif de MLC2 réduit l'expression d'Abcb11 à la membrane apicale de cellules MDCK sans modifier son expression totale. Un résultat similaire est observé lors d'un traitement avec la blebbistatine (inhibiteur de MLC2) (Chan *et al.* 2005).

L'endocytose d'ABCB11 est dépendante de la clathrine et fait intervenir l'*hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 associated protein X-1* (HAX-1) (Ortiz *et al.* 2004). Cette protéine, fortement exprimée au niveau du compartiment sous apical des hépatocytes interagit avec la cortactine et les domaines « *linker* » d'Abcb1, Abcb4 et Abcb11 de rat. Bien que son rôle n'ait pas encore été élucidé pour ABCB1 et ABCB4, il a été montré que la diminution de l'expression de HAX-1 par des ARN interférents induit une augmentation de l'expression et de la stabilité d'Abcb11 à la membrane apicale des cellules MDCK. Des résultats similaires sont observés après expression d'un dominant négatif de la cortactine ou de l'*Epidermal growth factor receptor substrate 15* (EPS15), protéines impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine (Ortiz *et al.* 2004). Par ailleurs, EPS15 interagit avec l'*Adaptator protein complex 2* (AP-2). Cette protéine est impliquée dans l'endocytose clathrine dépendante d'ABCB11 via son interaction avec le motif tyrosine en C-terminal d'ABCB11 (Hayashi *et al.* 2012).

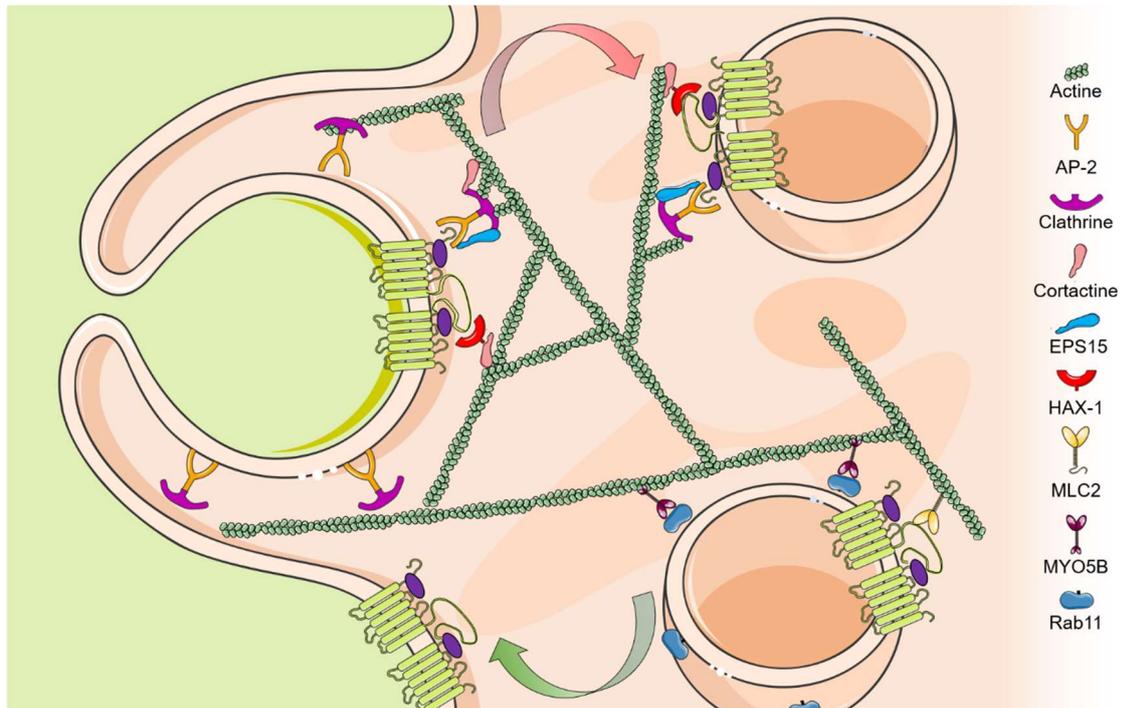


Figure 17 : Protéines impliquées dans le trafic d'ABCB11. Le recyclage d'ABCB11 à la membrane canaliculaire est un processus dépendant de la clathrine qui implique des partenaires. AP-2 : Adaptor Protein 2, EPS15 : Epidermal growth factor receptor substrate 15, HAX-1 : Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 Associated protein X-1, MLC2 : Myosin regulatory Light Chain 2, MYO5B : Myosine Vb et Rab11 : Ras-related in brain 11.

II – 5 – 3 – Dégradation

Suivant son internalisation, ABCB11 est soit réadressé à la membrane canaliculaire, soit dégradé. L'ubiquitination à chaîne courte d'ABCB11 joue un rôle dans ce processus. En effet, les variants les plus fréquents d'ABCB11 (E297G et D482G), sont fortement ubiquitinés. Des expériences de biotinylation de surface dans des cellules MDCK II montrent que la dégradation de ces deux variants ou d'une protéine de fusion ABCB11-ub est plus importante que celle de la protéine sauvage (Hayashi et Sugiyama 2009). Alors que l'ubiquitination induit la dégradation d'ABCC2 déjà internalisé, elle facilite l'endocytose d'ABCB11 médiée par la clathrine (Aida *et al.* 2014).

Les cellules utilisent principalement deux voies pour la dégradation des protéines : le système lysosomal et le système protéasomal. La demi-vie d'Abcb11 à la membrane n'est pas affectée par un traitement avec un inhibiteur lysosomal, mais est au contraire augmentée avec un inhibiteur du protéasome (Kagawa *et al.* 2008). Cela suggère que la dégradation d'Abcb11 membranaire est médiée par le protéasome.

II – 6 – Régulation d'ABCB11

II – 6 – 1 – Régulation à court terme

Dans des conditions physiologiques, le pool apical de réserve d'ABCB11 est strictement régulé par la demande d'excrétion en ABs et permet une adaptation rapide aux besoins de l'organisme (Kipp *et al.* 2001, Kipp *et al.* 2002). Les ABs (TC, TUDC et AUDC) et l'AMPc régulent positivement l'adressage canaliculaire d'ABCB11 par des mécanismes de phosphorylations.

Le TUDC via l'activation de la voie des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) ou de la *protéine kinase C* (PKC), stimule l'adressage d'ABCB11/Abcb11 aux CBs (Kubitz *et al.* 2004). En effet, la stimulation par le TUDC augmente la sécrétion de TC dans la bile due à un recrutement et une insertion d'ABCB11 à la membrane canaliculaire des cellules HepG2 (lignée hépatocytaire). Cette hausse est bloquée par un inhibiteur de la p38^{MAPK} ou un inhibiteur de plusieurs isoformes de PKC (Schliess *et al.* 1997, Kurz *et al.* 2001, Kubitz *et al.* 2004). Par ailleurs, la voie des MAPK est impliquée dans l'expression d'ABCB11 induite par des changements d'osmolarité. Dans une perfusion de foie de rats, l'hypo-osmolarité augmente la sécrétion d'ABs par l'activation de la voie des MAPK alors que l'hyperosmolarité induit l'internalisation d'Abcb11 et Abcc7 (Noe *et al.* 1996, Cantore *et al.* 2011). L'endocytose est médiée par la Src kinase Fyn qui déstabilise les microfilaments d'actine en phosphorylant la cortactine (Cantore *et al.* 2011).

Le TC et l'AMPc sont impliqués dans la mobilisation des endosomes sous-canaliculaires (Gatmaitan *et al.* 1997). Dans des sandwichs d'hépatocytes en culture, le TC stimule l'adressage canaliculaire d'ABCB11 via la *liver kinase B1* (LKB1) (Homolya *et al.* 2014). LKB1 est un activateur de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK). Son inactivation (*LKB1*^{-/-}) chez la souris induit une forte diminution de l'adressage canaliculaire d'Abcb11 et une altération de la sécrétion biliaire (Woods *et al.* 2011, Homolya *et al.* 2014). Dans des sandwichs d'hépatocytes *LKB1*^{-/-}, la fraction d'AMPK phosphorylée (active) est diminuée, mais pas son expression totale (Homolya *et al.* 2014). Dans ces cellules, la stimulation par l'AMPc restaure l'adressage d'Abcb11 à la membrane à travers l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Homolya *et al.* 2014). La

Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) est également activée par le TC et l'AMPc. Dans une perfusion de foie de rat, l'inhibition de la PI3K altère la sécrétion d'ABs stimulée par le TC et l'AMPc. De manière intéressante, l'inhibition de la PI3K induit une diminution de l'expression d'Abcb11 et Abcc2 aux CBs suivant une stimulation par le TC mais pas par l'AMPc (Misra *et al.* 2003).

Le *type II Inositol 1,4,5-triphosphate Receptor* (InsP3R2) est impliqué dans le relargage du calcium péricanaliculaire. Ce récepteur colocalise avec Abcb11 au niveau du CB et la diminution de son expression par des ARN interférents induit une internalisation d'Abcb11 dans des cultures d'hépatocytes de rats avec pour conséquence une diminution de la sécrétion d'ABs (Kruglov *et al.* 2011). L'expression de ce récepteur est perdue dans des modèles animaux de cholestases induites par l'œstradiol ou des lipopolysaccharides (Kruglov *et al.* 2011). Dans ces modèles, une augmentation de l'internalisation d'Abcb11 et Abcc2 est observée (Crocenzi *et al.* 2003a, Crocenzi *et al.* 2003b, Roman *et al.* 2003, Elferink *et al.* 2004). Un traitement avec le TLC ou la cyclosporine A induit des effets similaires. Un traitement par l'AUDC, l'activation de l'AMPc ou l'inhibition de la PKC préviennent l'internalisation d'Abcb11 dans ces modèles (Dumont *et al.* 2002, Beuers *et al.* 2003, Crocenzi *et al.* 2003a, Crocenzi *et al.* 2003b, Dombrowski *et al.* 2006, Crocenzi *et al.* 2008, Boaglio *et al.* 2010, Zucchetti *et al.* 2011).

II – 6 – 2 – Régulation à long terme

Au niveau transcriptionnel, l'expression d'*ABCB11* est régulée par des hormones et des facteurs nucléaires (Figure 18). FXR est le principal senseur des ABs dans les hépatocytes et le régulateur majeur de leur concentration hépatocellulaire via le contrôle coordonné de l'expression et de l'activité des transporteurs d'ABs (Makishima *et al.* 1999, Parks *et al.* 1999). Son rôle dans l'expression d'*ABCB11* est démontré par l'expression basale faible d'Abcb11 chez la souris *Fxr*^{-/-} et l'absence de réponse à la stimulation de la sécrétion biliaire par les ABs. Les ABs (CDC, DC et cholate) sont des ligands endogènes de FXR. Leur liaison à FXR induit son hétérodimérisation avec le *Retinoid X Receptor* (RXR) qui se fixe sur le promoteur d'*ABCB11* au niveau de *FXR*

Response Elements (FXRE) et active la transcription d'*ABCB11* (Plass *et al.* 2002). Ainsi les ABs, par l'intermédiaire de FXR, préviennent les hépatocytes d'une surcharge d'ABs en augmentant leur sécrétion par *ABCB11*. L'activation complète du promoteur d'*ABCB11* par FXR nécessite le recrutement de l'*activating signal cointegrator-2-containing complex* (ASCOM), *Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1* (CARM1) et *Steroid Receptor Coactivator-2* (SRC2) (Ananthanarayanan *et al.* 2011, Ananthanarayanan *et al.* 2004, Chopra *et al.* 2011).

LRH-1 et *Nuclear erythroid 2 p45-regulated factor 2* (Nrf2) sont deux autres facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression d'*ABCB11*. L'inactivation de LRH-1 chez la souris induit une diminution de l'expression d'*Abcb11* (Song *et al.* 2008). Nrf2 joue un rôle majeur dans la réponse au stress oxydant en se fixant sur des éléments de réponse aux antioxydants (*Maf recognition element*, MARE) situés dans le promoteur d'*ABCB11* (Weerachayaphorn *et al.* 2009).

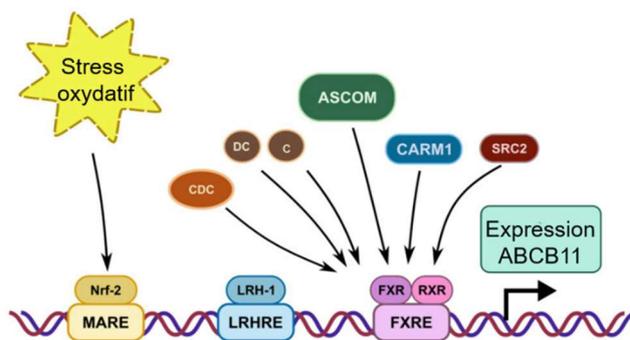


Figure 18 : Régulation transcriptionnelle d'*ABCB11*. ASCOM : activating signal cointegrator-2-containing complex, C : Cholate, CDC : Chénodésoxycholate, CARM1 : Co-Activator-associated Arginine Methyltransferase 1, DC : DésoxyCholate, FXR : Farnesoid X Receptor, FXRE : FXR Response Element, LRH-1 : Liver Receptor Homolog-1, LRHRE : LRH Response Element, MARE : Maf Recognition Element, Nrf2 : Nuclear erythroid 2 p45-regulated factor 2, RXR : Retinoid X Receptor, SRC2 : Steroid Receptor Co-activator 2. Adapté de Sohail *et al.* 2021.

Ces facteurs de transcriptions peuvent être régulés par différents mécanismes. En effet, l'inhibition de PKC induit une diminution de la translocation de FXR dans le noyau empêchant son action (Chen *et al.* 2010). Par ailleurs, la transcription d'*Abcb11* est réprimée en fin de gestation chez la souris. Cette répression est levée directement après la parturition et est inversement corrélée avec le niveau de 17β -œstradiol (E2) dans le sérum. E2 réprime l'expression d'*Abcb11* dans la lignée hépatocytaire Huh7 et chez les souris gestantes via une interaction directe du complexe E2/récepteur E2 avec FXR *in vivo* et *in vitro* (Song *et al.* 2014).

III – Pathologies et traitements des déficits en ABCB11

III – 1 – Les pathologies associées à des déficits en ABCB11

ABCB11, par sa fonction de sécrétion d'ABs, est l'acteur majeur du BSDF. Les variants de ce transporteur peuvent perturber la stabilité de l'ARNm ou le repliement, l'adressage, la stabilité ou la fonction du transporteur entraînant une diminution voire une absence totale d'ABs dans la bile. Il en résulte une diminution de la sécrétion biliaire et du flux biliaire et une accumulation d'ABs toxiques dans les hépatocytes. Les déficits en ABCB11 se caractérisent par des épisodes de cholestase parfois ictérique responsable d'un prurit sévère sans obstruction des voies biliaires extra-hépatiques. En fonction du type de variants et du nombre d'allèles mutés, différents phénotypes sont observés, le plus sévère étant la PFIC2.

III – 1 – 1 – Les cholestases gravidique et médicamenteuse

La cholestase gravidique (*Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy – ICP*), est une forme transitoire de maladie cholestatique du foie apparaissant généralement lors du 3^{ème} trimestre de grossesse. Elle se caractérise par une augmentation des ABs sériques, un prurit variable, une détresse foetale et un risque accru d'accouchements prématurés. C'est la maladie du foie la plus courante chez les femmes enceintes ; sa fréquence varie de 0,1 à 25 % selon l'origine ethnique (Glantz *et al.* 2004). Bien que plusieurs facteurs génétiques soient associés à l'ICP, au moins 5 % des femmes ayant développé une ICP présentaient un variant hétérozygote d'*ABCB11* (Dixon et Williamson 2016). Les niveaux élevés d'œstrogène et de progestérone circulants dans le dernier trimestre de grossesse sont potentiellement responsables de la répression transcriptionnelle d'*ABCB11* chez ces femmes (Vallejo *et al.* 2006, Song *et al.* 2014). Les femmes sujettes à l'ICP ont également une susceptibilité accrue de développer une cholestase lors d'un traitement hormonal (Meier *et al.* 2008).

En dehors de l'œstrogène et de la progestérone, près du tiers des médicaments communs, approuvés par la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) sont inhibiteurs de la fonction d'ABCB11 (Pedersen *et al.* 2013). Ainsi, les patients porteurs de variants

hétérozygotes d'*ABCB11* ont une susceptibilité accrue de développer une hépatotoxicité induite par les médicaments (*Drug-Induced Liver Injury*, DILI). Les DILI sont particulièrement préoccupantes, car elles sont une cause majeure d'abandon lors de la découverte et du développement de médicaments, de retrait de médicaments après leur commercialisation et de maladies graves chez l'humain (Abboud et Kaplowitz 2007).

III – 1 – 2 – La cholestase intrahépatique récurrente bénigne de type 2

La cholestase intrahépatique récurrente bénigne (BRIC) se caractérise par des épisodes récurrents de cholestase qui se résolvent spontanément en quelques semaines/mois sans dommage hépatique. D'un point de vue biologique, une élévation des transaminases et de la bilirubine avec des niveaux de γ -GlutamylTransférases (γ -GT) normaux sont observés (van Mil *et al.* 2004). Son incidence est estimée entre 1/50 000 à 1/100 000 naissances. Il existe une similarité entre les phénotypes des patients atteints de BRIC1 (due à un défaut d'*ATP8B1*) et de BRIC2 (due à un défaut d'*ABCB11*) (van Mil *et al.* 2004). Les patients atteints de BRIC2 présentent des variants à l'état hétérozygote, hétérozygote composite ou homozygote. Chez les patients hétérozygotes composites et homozygotes, un phénotype BRIC2 ou PFIC2 peut se développer en fonction de la sévérité des variants (Lam *et al.* 2007, Kagawa *et al.* 2008, van Wessel *et al.* 2020).

III – 1 – 3 – La cholestase intrahépatique progressive familiale de type 2

III – 1 – 3 – 1 – Les cholestases intrahépatiques progressives familiales

Les PFICs se réfèrent à un groupe hétérogène de maladies autosomiques récessives du foie. Elles se caractérisent par une cholestase d'origine hépatocytaire apparaissant dans les premiers mois de vie. Leur prévalence est estimée entre 1/50 000 à 1/100 000 naissances. Elles sont dues à des variants de gènes impliqués dans la sécrétion biliaire (Jacquemin 2000). Depuis la description clinique de la PFIC1 en 1969, 5 autres PFICs ont été décrites (Amirneni *et al.* 2020, Figure 19).

La PFIC1 est due à un défaut d'*ATP8B1*, une flippase de PE/PS exprimée à la membrane canaliculaire essentielle à la préservation de la bicouche lipidique contre

l'action détergente des ABs (Paulusma *et al.* 2006). Le mécanisme n'est pas complètement élucidé, mais plusieurs pistes sont explorées. D'une part, l'inactivation d'Atp8b1 chez la souris augmente la sensibilité à l'extraction du cholestérol membranaire par les ABs, or le cholestérol est indispensable à la fonction d'ABCB11 (Paulusma *et al.* 2009). D'autre part, une dérégulation de FXR est observée chez les patients atteints de PFIC1 (Alvarez *et al.* 2004).

La PFIC2 est due à un défaut d'ABCB11. Elle apparaît de façon plus précoce et évolue plus sévèrement que les autres formes de PFICs. Elle sera détaillée dans la section suivante (page 35).

La PFIC3 est due à un défaut d'ABCB4, une floppase de PC exprimée presque exclusivement aux CBs. Un défaut de sécrétion de PC dans la bile entrave la formation de micelles mixtes ce qui favorise la formation de cristaux de cholestérol dans la bile à l'origine de lithiases pouvant obstruer les voies biliaires (Lipinski et Jankowska 2018). D'autre part, les ABs libres, par leur action détergente, sont à l'origine d'une toxicité ductulaire, responsable d'une inflammation des voies biliaires et d'une prolifération cholangiocytaire (Jacquemin 2012).

La PFIC4 est due à un défaut de la protéine des jonctions serrées 2 (*Tight Junction Protein 2*, TJP2 ou *Zonula Occludens 2*, ZO-2). Le défaut de cette protéine entraîne une localisation anormale des claudines à l'origine d'une fuite paracellulaire de la bile vers le parenchyme hépatique. L'inactivation de TJP2 chez la souris induit une mort embryonnaire (Sambrotta et Thompson 2015).

La PFIC5 est due à un défaut de FXR, régulateur transcriptionnel majeur des enzymes impliqués dans la synthèse des ABs et des transporteurs hépatobiliaires impliqués dans la sécrétion biliaire. Un défaut de ce facteur de transcription détériore fortement le métabolisme des ABs (Makishima *et al.* 1999, Parks *et al.* 1999, Gomez-Ospina *et al.* 2016).

Enfin, la PFIC6 est due à un défaut de la MYO5B, protéine motrice impliquée dans le transport intracellulaire de protéines membranaires dont ABCB11. Un défaut

de cette protéine perturbe l'expression d'ABCB11 au CB. En résulte un phénotype proche de celui de la PFIC2 (Gonzales *et al.* 2017, Overeem *et al.* 2020).

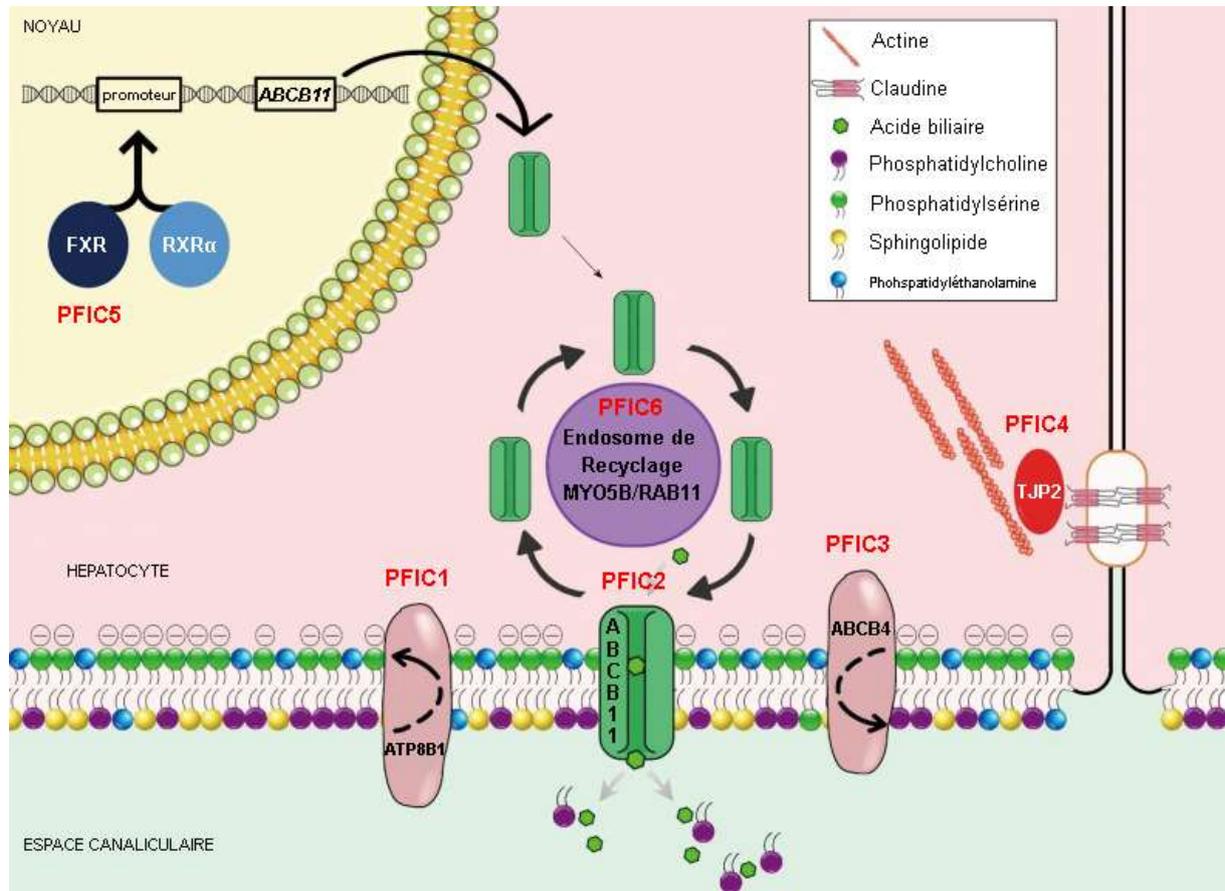


Figure 19 : Les différentes formes de PFICs. Six formes de PFICs ont été décrites en fonction de la protéine défectueuse ; ATP8B1 dans la PFIC1, ABCB11 dans la PFIC2, ABCB4 dans la PFIC3, TJP2 dans la PFIC4, FXR dans la PFIC5 et MYO5B dans la PFIC6. Adapté de Henkel *et al.* 2019.

III – 1 – 3 – 2 – La cholestase intrahépatique progressive familiale de type 2

Initialement décrite sous le nom de syndrome de Byler, la PFIC2 est la forme la plus sévère des pathologies liées à un déficit en ABCB11. Elle se manifeste dès le premier mois de vie par une cholestase sévère responsable d'un prurit réfractaire, d'un ictère (jaunisse), d'une malabsorption entraînant un retard de croissance (Bull *et al.* 1997, Jacquemin 2000). Elle évolue rapidement vers une insuffisance hépatique, une cirrhose avec hypertension portale. Il existe un risque majeur de carcinome hépatocellulaire, en particulier dans les formes sévères, qui peut être observé dès la première année de vie (Strautnieks *et al.* 2008).

D'un point de vue biologique, elle se caractérise par une élévation des transaminases (ASAT/ALAT), des ABs et de la bilirubine sériques, mais une

cholestérolémie et des niveaux de γ -GT normaux. Les ABs dans la bile sont fortement diminués (< 1 mM, $N > 10$) (Davit-Spraul *et al.* 2010). L'histologie hépatique montre une architecture fortement perturbée avec une cholestase canaliculaire, une absence de prolifération ductulaire, une métaplasie périportale associée à des foyers inflammatoires et fibrotiques. Une transformation gigantomégaclaire des hépatocytes est souvent présente (Jacquemin 2000).

L'évolution de la pathologie dépend de la sévérité des variants portés par le patient. L'âge moyen de survie des patients avec leur foie natif est de 3,5 ans pour les variants les plus sévères (van Wessel *et al.* 2020). L'évolution de la pathologie est mal contrôlée principalement due au manque d'informations concernant la conséquence de chaque variant. Des recherches sont donc à mener afin de développer de nouvelles stratégies de prédiction.

III – 1 – 4 – Autres pathologies associées à des déficits en ABCB11

Les variants d'*ABCB11* ont également été associées à d'autres pathologies hépatiques dont la Cirrhose Biliaire Primitive (CBP), la cholangite sclérosante primitive (CSP), des calculs intrahépatiques primaires, des pathologies liées aux calculs biliaires et des cholestases néonatales (Hirschfield *et al.* 2013, Chen *et al.* 2014, Pan *et al.* 2015). Dans ces pathologies, le rôle exact des variants d'*ABCB11* est à établir.

III – 2 – Modèles d'études des pathologies associées à des déficits en ABCB11

L'étude de modèles animaux permet de mieux comprendre la physiopathologie des déficits sévères en *ABCB11*. À l'heure actuelle, il existe deux types de modèles animaux inactivés pour *Abcb11*. Les modèles rongeurs (rat et souris) présentent une cholestase intrahépatique, mais avec une gravité nettement moindre que les patients atteints de PFIC2 (Wang *et al.* 2001, Cheng *et al.* 2016a, Pankowicz *et al.* 2018). Ceci peut s'expliquer par le fait que le pool d'ABs est moins hydrophobe chez la souris ce qui facilite leur excrétion urinaire (Fuchs *et al.* 2017). De plus, l'expression augmentée d'*Abcb1* chez ces souris préviendrait le développement de la pathologie (Lam *et al.* 2005). En revanche, la supplémentation de cholate dans l'alimentation de ces souris induit une cholestase sévère caractérisée par une jaunisse, une perte de poids, une

élévation des ABs et des transaminases sériques, une cholangiopathie, une nécrose hépatique, une mortalité élevée et des modifications importantes de l'expression de l'ARNm des principaux gènes hépatiques (Wang *et al.* 2003). Le modèle poisson zèbre inactivé pour *Abcb11b* (orthologue d'*ABCB11* humain) présente quant à lui des lésions hépatocytaires morphologiquement similaires à celles observées chez les patients atteints de PFIC2. La transparence de ces poissons permet de suivre le flux biliaire dans l'animal avec des analogues de sels biliaires marqués par fluorescence (Ellis *et al.* 2018).

Les études *in vitro* permettent de caractériser les variants et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les déficits en ABCB11. Plusieurs systèmes peuvent être utilisés. Les lignées hépatocytaires (Can 10, HepG2, WIF-B9) permettent l'étude de l'expression et l'adressage canaliculaire d'ABCB11/Abcb11. L'activité ATPasique et la fonction sont quant à elles étudiées soit dans des vésicules de membranes de cellules d'insectes (Sf9 et Sf21) ou de mammifères (CHO, Hela, MDCK, LLC-PK1 et HEK), soit dans des lignées polarisées (MDCK, LLC-PK1) co-transfectées avec NTCP/Ntcp (transporteur basolatéral permettant l'entrée des ABs dans la cellule) (Cheng *et al.* 2016b, Telbisz et Homolya 2016, Stieger et Mahdi 2017). Dans ces modèles, le substrat le plus adéquat semble être le TC. En effet, il a été montré que dans les cellules LLC-PK1 transfectées avec ABCB11 et NTCP humains, le transport d'analogues fluorescents d'ABs est significativement plus faible que celui de TC tritié ($[^3\text{H}]\text{TC}$) (Mita *et al.* 2006). L'ensemble de ces systèmes permettent d'évaluer l'influence des variants et des molécules thérapeutiques sur la structure et la fonction d'ABCB11. Lorsque ces molécules prouvent leur potentiel dans les modèles cellulaires, il est possible d'envisager leurs transpositions dans un contexte clinique.

III – 3 – Traitements des déficits en ABCB11

III – 3 – 1 – Traitements existants

III – 3 – 1 – 1 – Traitements non chirurgicaux

Parallèlement à la supplémentation classique en vitamines liposolubles pour prévenir les carences, deux médicaments sont fréquemment utilisés : l'AUDC et la rifampicine. Il y a plus de mille ans, la bile d'ours noir séchée était recommandée dans

le traitement de la jaunisse à l'époque de la dynastie Tang en Chine. L'AUDC représente près de 60 % des ABs totaux chez cet ours (Wang et Carey 2014). Dans l'espèce humaine, l'AUDC est l'AB ayant l'indice d'hydrophobicité le plus faible, mais il représente moins de 3 % du pool d'ABs total. Aujourd'hui, l'AUDC (Chlolorso[®], Ursolvan[®], Delursan[®], Ursofalk[®]) est l'un des agents les plus couramment utilisés pour le traitement des maladies cholestatiques, dont l'ICP, la BRIC2 et la PFIC2. Il est prescrit aux enfants atteints de cholestases chroniques à la dose de 600 mg/m²/jour. D'un point de vue clinique et biologique, l'AUDC réduit significativement le prurit et améliore les paramètres biologiques (transaminases, ABs sériques). Le mécanisme d'action serait multifactoriel (Beuers 2006, Poupon 2012). L'AUDC, en diminuant l'hydrophobicité du pool d'ABs circulants, protège les hépatocytes des lésions induites par la toxicité des ABs libres (Kim *et al.* 2018a). De plus, il stimule la sécrétion biliaire d'une part via un shunt choléhépatique (Marteau *et al.* 1990, Beuers *et al.* 1998) et d'autre part via la stimulation de la transcription, de l'expression et de la stabilité d'ABCB11 à la membrane (Kagawa *et al.* 2014). Enfin il inhibe l'apoptose hépatocytaire (Guicciardi et Gores 2002). Cependant, l'AUDC est moins efficace sur les patients porteurs de variants sévères (peu ou pas de fonction résiduelle d'ABCB11). Ainsi, seulement 1/3 des patients atteints de PFIC1 et PFIC2 ont une amélioration de leurs paramètres cliniques et biologiques lors d'un traitement avec l'AUDC (Davit-Spraul *et al.* 2010).

La rifampicine (Rifadine[®]) quant à elle est préconisée dans le traitement du prurit cholestatique. Elle est initialement prescrite à une dose de 5 mg/kg/jour. Via l'activation du *Pregnan X Receptor* (PXR), la rifampicine est un inducteur enzymatique du cytochrome P450, en particulier le CYP3A4. Ainsi, elle favoriserait l'hydroxylation et la détoxification des ABs endogènes permettant l'atténuation du prurit (Wietholtz *et al.* 1996, Yerushalmi *et al.* 1999).

III – 3 – 1 – 2 – Traitements chirurgicaux

Lorsque les traitements médicamenteux ne permettent pas une amélioration suffisante des paramètres cholestatiques, des thérapies plus invasives sont envisagées. La dérivation biliaire externe partielle consiste à créer un conduit entre la vésicule

biliaire et une stomie externe reliée à une poche. Elle est généralement bien tolérée chez les patients non cirrhotiques et pour lesquels il existe une fonction résiduelle d'ABCB11. Chez certains de ces patients avec génotypes favorables, elle améliore le prurit et les paramètres biologiques (ABs sériques, transaminases, bilirubine) (Ismail *et al.* 1999, Kurbegov *et al.* 2003, Arnell *et al.* 2010, Ellinger *et al.* 2017, van Wessel *et al.* 2020). Cependant, la poche de stomie, par son aspect contraignant, peut entraîner des troubles psychologiques chez les patients. Par conséquent, des méthodes alternatives ont été explorées pour prévenir la présence d'une stomie, notamment l'exclusion iléale et la diversion biliaire interne partielle. À l'heure actuelle, seuls quelques rapports décrivant les résultats à long terme de ces procédures sont disponibles (Kalicinski *et al.* 2003, Ramachandran *et al.* 2014). Le mécanisme précis par lequel ces techniques diminuent la cholestase chez certains patients n'est pas précisément connu à ce jour. Il est proposé que la dérivation biliaire, en interrompant la circulation entéro-hépatique des ABs, entraîne une diminution du pool circulant d'ABs et de la surcharge hépatocytaire en ABs.

La transplantation hépatique est souvent la seule option curative pour les patients atteints de déficits sévères en ABCB11. En effet, seulement un tiers des patients atteints de PFIC2 parviennent à l'âge adulte avec leur foie natif. Pour les patients avec les génotypes les plus sévères, la survie moyenne avec un foie natif est estimée à 3,5 ans (van Wessel *et al.* 2020). Une amélioration des paramètres cliniques et biologiques est généralement observée chez les patients transplantés. Cependant, des symptômes cholestatiques peuvent réapparaître due à une réaction immune. En effet, près de 8 % des patients ayant un déficit sévère en ABCB11 développent des allo-anticorps contre la première boucle extracellulaire d'ABCB11. La majorité de ces patients étaient porteurs de variants induisant une absence totale d'ABCB11 aux CBs (Keitel *et al.* 2009, Kubitz *et al.* 2015, Stindt *et al.* 2016). Du fait des complications chirurgicales, du manque de donneurs d'organes et de l'allo-immunisation potentielle, le développement de nouvelles thérapies est crucial pour les patients ayant des déficits sévères en ABCB11.

III – 3 – 2 – Recherche de nouvelles thérapies

Des options thérapeutiques moins invasives qui peuvent réduire l'accumulation d'ABs dans le foie et potentiellement soulager le prurit et la cholestase, limiter la progression de la maladie hépatique et améliorer le pronostic à long terme seraient précieuses.

III – 3 – 2 – 1 – Les dérivés des traitements existants

Le nor-AUDC, un dérivé de l'AUDC augmente l'hydrophilie du pool d'ABs, stimule le flux biliaire et induit des voies de détoxification et d'élimination des d'ABs de manière plus importante que l'AUDC dans le modèle des souris inactivées pour *abcb4* (Hofmann *et al.* 2005, Fickert *et al.* 2006). Cependant, il a été montré que les effets du nor-AUDC sur *Abcb11* étaient similaires à ceux de l'AUDC (Kagawa *et al.* 2014).

Les inhibiteurs d'ASBT font actuellement l'objet d'essais cliniques de phases II et III dans le traitement du syndrome d'Alagille et de la PFIC. Ils représentent une approche pharmacologique de la dérivation biliaire. En effet, ASBT est un acteur majeur du cycle entéro-hépatique en permettant la réabsorption active des ABs présents au niveau du tube digestif. Les inhibiteurs d'ASBT, en prévenant la réabsorption iléale des ABs, permettent l'élimination des ABs. L'odevixibat® est un inhibiteur d'ASBT récemment approuvé par l'EMA pour le traitement de la PFIC1 et de la PFIC2 due à certains variants faux sens (Deeks 2021). Une diminution des ABs sériques et du prurit a été observée chez des patients porteurs de variants faux sens d'*ABCB11* traités par l'odevixibat® dans un essai clinique de phase II. Chez un patient atteint de PFIC2, les symptômes sont revenus lorsque l'essai a pris fin. Par la suite, le patient a subi une dérivation biliaire entraînant des effets similaires à ceux obtenus avec l'odevixibat®, ce qui suggère que chez ce patient, l'inhibition d'ASBT était aussi efficace que la dérivation biliaire pour traiter la cholestase (Slavetinsky et Sturm 2020).

La transplantation d'hépatocytes humains a été proposée en alternative à la transplantation hépatique. Les hépatocytes injectés devraient en théorie avoir un avantage de croissance sélectif par rapport aux hépatocytes défectueux du patient et devraient (partiellement) repeupler le foie natif. Malheureusement, il n'y a pas eu de

bénéfices pour les deux patients atteints de PFIC2 traités jusqu'à présent, probablement en raison d'une fibrose préexistante qui a empêché une greffe correcte des hépatocytes dans le foie (Dhawan *et al.* 2006, Quaglia *et al.* 2008).

III – 3 – 2 – 2 – Les modulateurs transcriptionnels

Nous avons vu précédemment que FXR est le principal activateur de la sécrétion biliaire d'ABs et de l'expression des transporteurs biliaries, dont ABCB11. Son expression et son activité sont fortement réduites dans des cholestases notamment la PFIC1 et l'ICP (Chen *et al.* 2004, Milona *et al.* 2010, Song *et al.* 2014). L'obéticholate (OC) est un agoniste puissant de FXR. Il a été approuvé cliniquement dans le traitement de la cholangite biliaire primitive (CBP) (Nevens *et al.* 2016, Trauner *et al.* 2019). Le traitement de rats par 17 α -éthinyloestradiol (E₂17 α) est un modèle d'études de l'ICP. Dans ce modèle, l'administration d'OC augmente l'expression d'Abcb4, Abcb11 et Abcc2 dans le foie (Fiorucci *et al.* 2005). Ses effets chez l'humain dans le cadre de cholestases génétiques n'ont pas été étudiés à ce jour.

III – 3 – 2 – 3 – La thérapie génique

De grands espoirs de guérison sont nés avec l'apparition du concept de la thérapie génique. En effet, la voie logique pour restaurer l'activité normale d'un gène défectueux est de le remplacer ou le réparer. Pour cela, un nombre suffisant de copies du gène fonctionnel doivent être apportées dans les cellules malades via un vecteur (viral ou lipidique). De plus, le produit de l'expression de ce gène doit avoir une durée de vie suffisamment longue pour remplacer l'expression du gène défectueux dans toutes les cellules. La faisabilité de la thérapie génique utilisant des vecteurs adénoviraux (AAV) a été montrée dans la PFIC3 (Aronson *et al.* 2019, Siew *et al.* 2019, Weber *et al.* 2019). Cette approche semble plus compliquée à mettre en œuvre dans la PFIC2 car nécessiterait que tous les hépatocytes soient corrigés. En effet, l'hépatotoxicité liée aux ABs dans la PFIC2 induit une prolifération hépatocytaire accrue qui induirait la perte du vecteur AAV. La thérapie génique a donc peu de chances de fonctionner en une seule fois.

III – 3 – 3 – La pharmacothérapie ciblée

L'étude moléculaire des transporteurs ABC est apparue d'une grande importance, non seulement pour comprendre leur rôle et leur régulation, mais également dans le but de développer des thérapies ciblées. La pharmacothérapie ciblée consiste à corriger spécifiquement les défauts moléculaires induits par les variants identifiés chez le patient. La caractérisation de ces variants permet de les classer en fonction du défaut induit afin d'établir la stratégie thérapeutique la plus adaptée.

III – 3 – 3 – 1 – Anomalies moléculaires impliquées dans les déficits en ABCB11

Près de 400 variations et polymorphismes ont été identifiés dans la séquence du gène *ABCB11* incluant des variants faux sens, non-sens, insertions/délétions et épissages (Annexe 1, Figure 20). Toutes les régions du gène peuvent être affectées.

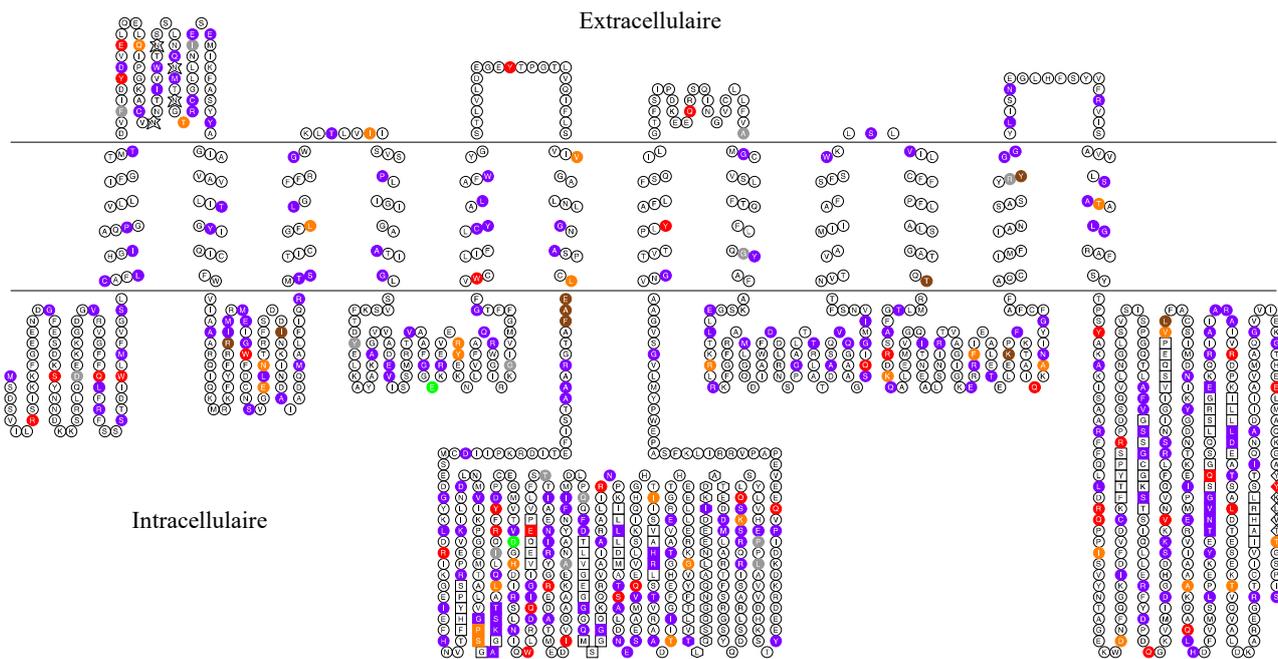


Figure 20 : Cartographie des variations d'ABCB11. Les variants synonymes sont représentés en gris, les variants faux sens en violet, les délétions en marron, les variants non-sens en rouge, les décalages du cadre de lecture en orange et les variants E297G et D482G en vert. Les étoiles représentent les sites de glycosylation, les carrés les motifs consensus des NBDs, les hexagones le site de liaison de HAX-1 et les losanges le site de liaison d'AP2. La figure a été réalisée à l'aide du logiciel TOPO2 (<http://sacs.ucsf.edu/TOPO-run/wtopo.pl>).

La fréquence de ces variants et polymorphismes dépend de l'ethnie. En Europe, les variants E297G et D482G sont présents chez 58 % des patients atteints de PFIC2 (Strautnieks *et al.* 2008). Dans la population générale, le polymorphisme V444A est

présent sur 56,9 % des allèles (Droge *et al.* 2017). Sa prévalence dans les ICP et les DILI est augmentée (Lang *et al.* 2007, Meier *et al.* 2008, Dixon *et al.* 2009). De plus, la présence de ce polymorphisme semble aggraver le phénotype d'ICP chez des femmes porteuses de variants d'*ABCB4* (Keitel *et al.* 2006, Zimmer *et al.* 2012).

Récemment, Van Wessel *et al.* ont proposé une classification des patients en fonction de la sévérité du phénotype induit par les variants d'*ABCB11* (van Wessel *et al.* 2020). Selon cette classification, les patients présentant au moins une copie des variants E297G ou D482G sont classés dans la catégorie « BSEP1 » et ont un phénotype moins grave. Les patients dans la catégorie « BSEP2 » présentaient au moins un variant faux sens autre que E297G ou D482G. Les patients de la catégorie « BSEP3 » sont porteurs des variants les plus sévères, connues ou prédites pour induire une protéine non fonctionnelle ou à une absence d'expression d'*ABCB11*. La catégorie « BSEP2 » compte 73 % des variants identifiés chez *ABCB11* donc nécessiterait une classification plus poussée. Une classification en fonction de l'effet des variants, comme décrite pour la première fois par Welsh et Smith, pourrait constituer une solution (Welsh et Smith 1993). Les variants d'*ABCB11* pourraient ainsi être subdivisées en quatre classes par analogie à la classification proposée pour les variants d'*ABCB4* (Delaunay *et al.* 2016).

Les variants de classe I comprennent les variants non-sens, les anomalies du site d'épissage, les insertions et des délétions. Ils induisent l'apparition d'un codon stop prématuré ou un décalage du cadre de lecture conduisant à la production d'un ARNm instable rapidement dégradé par la voie *Nonsense Mediated mRNA Decay* (NMD) et une absence totale ou partielle d'expression de la protéine. Lorsqu'elle est produite, la protéine est tronquée, le plus souvent instable et non fonctionnelle. Ces variants représentent environ 23 % des variants identifiées dans la séquence d'*ABCB11* et 27 % des variants identifiées chez les patients atteints de PFIC2 (Annexe 1, Figure 20). Les variants de classe II altèrent la maturation et/ou l'adressage d'*ABCB11* aux CBs. Ils entraînent un mauvais repliement de la protéine qui est alors retenue dans le RE puis dégradée via le système ERAD. Les variants de classe III induisent la production d'un transporteur correctement exprimé aux CBs, mais non fonctionnel. Ces variants

peuvent perturber la reconnaissance, la liaison ou la translocation du substrat aussi bien que la dimérisation des NBDs, la liaison et l'hydrolyse de l'ATP ou l'interaction avec des partenaires moléculaires. Enfin, les variants de classe IV induisent un défaut de stabilité du transporteur à la membrane canaliculaire. Ils touchent des résidus impliqués dans l'ancrage à la membrane ou l'interaction avec des partenaires moléculaires. À la différence de la classification de Delaunay *et al.*, j'ai pris le parti de ne pas intégrer de classe V. En effet, cette dernière comprend les variants dont les effets ne sont pas détectables dans leur système d'étude et dont la pathogénicité reste incertaine. Or, plus de deux tiers des variants d'ABCB11 ne sont pas encore caractérisés (Annexe 1).

Cette classification peut être complexe compte tenu du fait qu'un même variant peut appartenir à plusieurs classes. En effet, certains variants faux sens ou synonymes, notamment ceux localisés au milieu d'un exon, associent un défaut de classe II, III et/ou IV avec une altération de l'épissage (Byrne *et al.* 2009).

III – 3 – 3 – 2 – Stratégies de pharmacothérapie ciblée

Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été déployés sur la recherche de thérapies dans la mucoviscidose. L'émergence des techniques de screening haut débit de molécules pouvant permettre de corriger les défauts moléculaires de CFTR a permis la mise en évidence d'une grande variété de composés chimiques à haut potentiel thérapeutique. Dans une optique de repositionnement de médicaments, ces composés ouvrent de nouvelles perspectives de traitements dans d'autres pathologies, notamment chez les patients atteints de déficits en ABCB11. On distingue différents types de molécules en fonction du défaut moléculaire à corriger (Figure 21).

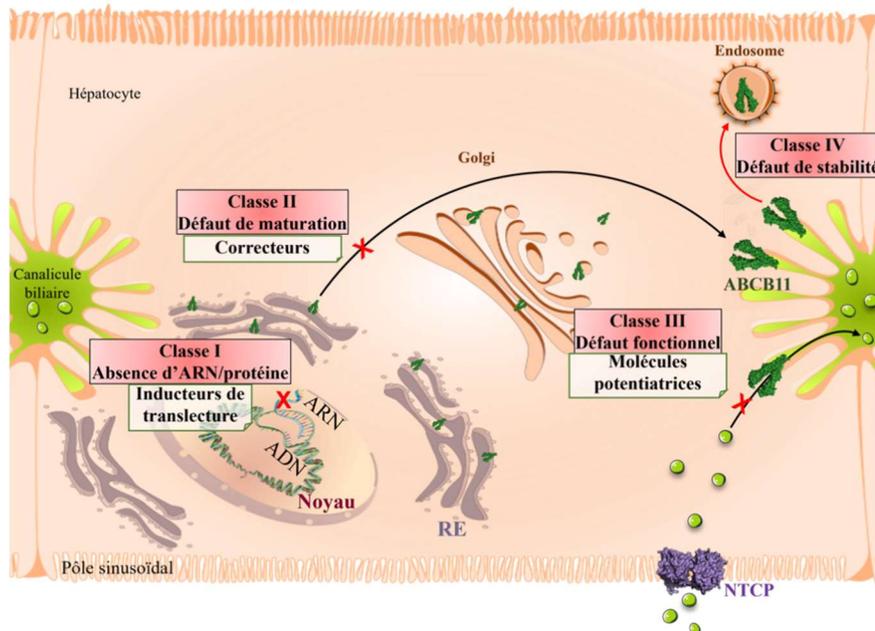


Figure 21 : Classification des variants d'ABCB11 et pharmacothérapie ciblée des déficits en ABCB11. NTCP : Na-Taurocholate Cotransporting Polypeptide, RE : réticulum endoplasmique.

a. Les inducteurs de translecture

Les inducteurs de translecture apparaissent comme une stratégie intéressante pour certains variants de classe I. Ces molécules affectent la fidélité de la traduction, facilitant ainsi l'incorporation d'un acide aminé à la place du codon stop prématuré ce qui permet la poursuite de la traduction (Pranke *et al.* 2018). L'efficacité de la translecture dépend du type de codon stop prématuré, de l'environnement nucléotidique du codon stop et de l'activité de la voie *Nonsense Mediated mRNA Decay* (NMD).

Il a été montré que les aminosides (ou aminoglycosides), outre leur activité anti-microbienne, permettent la translecture d'un codon stop prématuré dans la séquence codante de CFTR (Bedwell *et al.* 1997). Ils augmentent l'affinité et diminuent la spécificité de l'ARNt par leur fixation sur la petite sous-unité ribosomale impliquée dans la reconnaissance des ARNt. Le codon stop UGA est celui qui répond le plus favorablement à ce traitement. Notre équipe a récemment montré qu'un aminoside, la gentamicine, induit la translecture de six variants non-sens d'*ABCB11* *in vitro* (Y354X, R415X, R470X, R1057X, R1090X et E1302X). La réponse la plus forte était observée pour le variant R1090X, pour lequel il y avait une restauration partielle de l'expression d'Abcb11 aux CBs dans deux lignées hépatocytaires (Can 10 et HepG2). La protéine générée avait une activité résiduelle. L'expression de ce variant aux CBs pouvait être

augmentée par une combinaison de traitements alliant gentamicine et une molécule chaperonne, le 4-phenylbutyrate de sodium (4-PB, Ammonaps®) (Amzal *et al.* 2021).

Cependant, les aminosides possèdent une ototoxicité et une néphrotoxicité les rendant incompatibles avec un traitement à long terme. Il est donc nécessaire de rechercher d'autres molécules possédant un effet thérapeutique au moins identique avec une toxicité plus faible, voire nulle. Dans cette optique, PTC therapeutics a développé l'ataluren® (PTC124), un inducteur de translecture non-aminoside. Cependant, les essais cliniques dans la mucoviscidose se sont arrêtés en phase III car aucun bénéfice thérapeutique n'a été observé chez les patients (Konstan *et al.* 2020). Plus récemment, un nouveau système de criblage a permis de mettre en évidence « l'extrait H7 » provenant d'un champignon comestible commun. Cet extrait semble corriger très efficacement les codons non-sens UGA et UAA indiquant un mode d'action différent de celui des aminosides (Benhabiles *et al.* 2017). Les deux composés actifs de cet extrait seraient la clitocine et la 2,6-Diaminopurine (DAP). Ces deux composés seuls montrent une correction des variants non-sens de manière plus importante que l'aminoside G418 (Trzaska *et al.* 2020). Des études évaluant l'effet de l'extrait H7 et de ces deux principes actifs sur les variants non-sens d'*ABCB11* sont en cours dans notre équipe.

b. Les correcteurs d'adressage

Dans la mucoviscidose, la délétion de la phénylalanine au niveau du résidu 508 ($\Delta F508$) induit un défaut de repliement de la protéine qui, par conséquent, n'est pas adressée à la membrane plasmique. Ce variant est présent chez 70 % des allèles mutés et 90 % des patients ce qui en fait un modèle pour l'étude des variants de classe II. Il a été mis en évidence qu'un abaissement de la température à 26°C restaure le trafic et l'expression membranaire du variant CFTR- $\Delta F508$ (Denning *et al.* 1992). De la même façon, l'abaissement de la température rétablit l'expression membranaire et l'activité de variants d'*ABCB1* et d'*ABCB11* (Loo et Clarke 1994, Plass *et al.* 2004, Wang *et al.* 2008, Byrne *et al.* 2009). Ces travaux ont permis de mettre en évidence que les défauts induits par des variants de classe II peuvent être corrigés. Par la suite, des études ont

été menées afin de développer des molécules nommées « correcteurs » capables de restaurer l'adressage de ce type de variants. On distingue trois types de correcteurs : les chaperonnes chimiques, les chaperonnes pharmacologiques et les régulateurs de l'homéostasie protéique.

Les chaperonnes chimiques sont des molécules qui stabilisent la conformation des protéines, augmentent la vitesse de repliement des protéines ou augmentent la cinétique d'assemblage des oligomères. Ainsi, elles favorisent le repliement des variants dans une conformation qui leur permet d'échapper au système de contrôle qualité de la cellule. Parmi elles, le glycérol, le diméthylsulfoxyde (DMSO) ou la thapsigargine ont permis d'induire une restauration partielle de l'adressage de variants retenus dans le RE de CFTR, d'ABCB1 et d'ABCB11 (Sato *et al.* 1996, Wang *et al.* 2008, Byrne *et al.* 2009, Gautherot *et al.* 2012). Ces composés sont non spécifiques et modifient le niveau d'expression de nombreuses protéines, rendant leur utilisation en clinique inadaptée (Martin *et al.* 2013).

Les chaperonnes pharmacologiques sont des molécules qui interagissent spécifiquement avec la protéine afin de favoriser son repliement dans une conformation proche de la conformation native. Des criblages haut débit ont permis la mise en évidence de plusieurs correcteurs du variant CFTR- Δ F508. Parmi ces correcteurs le lumacaftor (VX-809), le tezacaftor (VX-661) et l'elexacaftor (VX-445), en combinaison avec la molécule potentiatrice ivacaftor (VX-770, Kaydeco®), ont été approuvés cliniquement dans le traitement de la mucoviscidose. Le lumacaftor est un correcteur de première génération qui interagit avec le MSD1 de CFTR. Il a été montré que le lumacaftor restaure le repliement du variant CFTR- Δ F508, augmentant ainsi sa fonction dans les cellules épithéliales bronchiques *in vitro*. Cependant, il ne parvenait pas à améliorer la fonction pulmonaire des patients ce qui a conduit à son association avec l'ivacaftor et la commercialisation de la combinaison sous le nom d'Orkambi® (Clancy *et al.* 2012). Cette association a entraîné des améliorations modestes de la fonction pulmonaire chez les patients homozygotes pour le variant CFTR- Δ F508, mais était inefficace chez les patients hétérozygotes composites. Les effets secondaires

indésirables et les interactions médicamenteuses du lumacaftor, telles qu'une forte induction du cytochrome P450 3A pouvant réduire l'efficacité thérapeutique des médicaments substrats du cytochrome P450 3A ont conduit au développement du tezacaftor, un dérivé du lumacaftor (Talamo Guevara et McColley 2017, Schneider 2018). L'association du tezacaftor et de l'ivacaftor s'est avérée efficace chez les patients hétérozygotes composites pour le variant $\Delta F508$ ayant une fonction résiduelle de CFTR, tout en réduisant les interactions médicamenteuses et les effets secondaires indésirables (Taylor-Cousar *et al.* 2017). Cette bithérapie a été commercialisée sous le nom de Symkevi®. L'elexacaftor est un correcteur de nouvelle génération conçu pour rétablir la fonction du variant CFTR- $\Delta F508$ chez les patients atteints de mucoviscidose lorsqu'il est administré en combinaison avec le tezacaftor et l'ivacaftor. La combinaison de ces trois molécules (elexacaftor, tezacaftor et ivacaftor) a induit des améliorations cliniques significatives de la fonction pulmonaire et de la qualité de vie des patients atteints de mucoviscidose par rapport aux groupes placebo ou Symkevi® dans plusieurs études cliniques de phase II et III (Hoy 2019). Cette trithérapie commercialisée sous le nom de Kaftrio® a obtenu en 2020 une autorisation de mise sur le marché (AMM) européenne pour les patients atteints de mucoviscidose âgés de plus de 12 ans porteurs du variant CFTR- $\Delta F508$. En France, il a bénéficié d'une autorisation temporaire d'utilisation nominative dès décembre 2019 sous le nom de Trikafta®.

Les régulateurs de l'homéostasie protéique agissent indirectement sur le repliement de la protéine via une modulation de la composition et de la concentration des composants du réseau protéostatique. Le 4-PB est un régulateur de l'homéostasie protéique cliniquement approuvée pour le traitement des déficits du cycle de l'urée (Dover *et al.* 1992). Son mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé, mais il a été montré que le 4-PB inhibe les Histones DésAcétylases (HDAC) et cible certaines chaperonnes diminuant ainsi le stress du RE (Wright *et al.* 2004, Kolb *et al.* 2015). *In vitro*, le 4-PB augmente l'expression aux CBs de certains variants de classe II d'Abcb11 dans des cellules Can 10 (lignée hépatocytaire) (Gonzales *et al.* 2012). Chez les patients présentant ces variants et traités par le 4-PB, une amélioration des paramètres cliniques

et biologiques de la cholestase et une augmentation de la concentration des ABs dans la bile ont été observées (Gonzales *et al.* 2015, Hayashi *et al.* 2016)). En raison de son effet émétique vraisemblablement lié à sa faible palatabilité, l'observance à long terme peut être difficile pour les patients. Le Glycérol PhénylButyrate (GPB, Ravicti®), un triglycéride constitué de 3 molécules de 4-PB liées à du glycérol, présente des avantages en termes de palatabilité et de pharmacocinétique par rapport au 4-PB. Chez une patiente atteinte de PFIC2, le GPB s'est montré aussi efficace que le 4-PB sur le traitement du prurit et de la cholestase tout en permettant une bonne tolérance orale et une bonne adhésion thérapeutique (Almes *et al.* 2020). Récemment, une combinaison de traitements associant le 4-PB, l'oxcarbazépine (un stabilisateur des nerfs périphériques réduisant le prurit) et le maralixibat (un inhibiteur d'ASBT) a montré un effet bénéfique sur les marqueurs de la PFIC2 (Malatack et Doyle 2018).

c. Les modulateurs d'activité

Les variants particulièrement propices à cette approche sont ceux qui altèrent la fonction du transporteur sans modifier son expression membranaire tels que le variant CFTR-G551D. Ce variant est présente chez environ 4 à 5 % des personnes atteintes de mucoviscidose et est le plus répandu des variants de classe III de CFTR. En 2009, un criblage à haut débit sur le variant CFTR-G551D a permis d'identifier l'ivacaftor en tant que molécule potentiatrice. C'est la première molécule potentiatrice dont l'efficacité clinique a été prouvée et qui a permis d'obtenir un bénéfice thérapeutique significatif chez les patients atteints de mucoviscidose (Van Goor *et al.* 2009, Accurso *et al.* 2010). L'ivacaftor a été approuvé par l'*European Medicines Agency* (EMA) en 2012 pour le traitement des patients porteurs du variant CFTR-G551D puis, sur la base d'une réponse clinique comparable, son autorisation a été étendue au traitement des patients atteints de mucoviscidose porteurs d'autres variants de classe III (De Boeck *et al.* 2014). Le développement de l'ivacaftor a sans aucun doute été l'une des plus importantes percées dans la recherche d'un traitement pour la mucoviscidose, mais pas seulement. Il a été montré que l'ivacaftor permettait également de corriger *in vitro* le défaut de fonction de certains variants de classe III d'ABCA3, ABCB4 et ABCB11, révélant le haut

potentiel thérapeutique de cette molécule (Delaunay, Bruneau *et al.* 2017, Kinting *et al.* 2019, Mareux *et al.* 2020). Le fait qu'il fonctionne à la fois sur un canal tel que CFTR et des transporteurs tels que ABCB4 et ABCB11 laisse présager un mécanisme d'action commun entre ces trois protéines. Pour CFTR, il a été proposé que l'ivacaftor module l'ouverture du canal de façon ATP indépendante en se liant spécifiquement à deux sites : une région de l'ICL4 qui relie le NBD1 au TM2 et une région à l'interface protéine/lipide au niveau des TM4, 5 et 8 de CFTR (Liu *et al.* 2019, Laselva *et al.* 2021b). Son mécanisme d'action n'est pas encore élucidé pour ABCB4 et ABCB11, mais le site de liaison à l'interface protéine/lipide ne semble pas être présent chez d'autres transporteurs ABC que CFTR (Liu *et al.* 2019).

Certains variants, après traitement par l'ivacaftor, n'atteignent pas un niveau satisfaisant de fonction pour aboutir à un bénéfice clinique chez le patient. De plus, plusieurs études montrent une inhibition par l'ivacaftor des correcteurs lumacaftor et elexacaftor (Cholon *et al.* 2014, Veit *et al.* 2014). Il est donc nécessaire de développer de nouvelles molécules potentiatrices qui pourraient compléter ou supplanter l'ivacaftor. Cela a conduit au développement du GLPG1837. Cette molécule a montré une efficacité accrue sur les variants de classe III de CFTR par rapport à l'ivacaftor (Van der Plas *et al.* 2018). Des essais cliniques sont en cours pour évaluer le bénéfice clinique chez les patients atteints de mucoviscidose (Davies *et al.* 2019). Plusieurs études suggèrent un mécanisme d'action commun entre l'ivacaftor et le GLPG1837 (Yeh *et al.* 2017, Liu *et al.* 2019). Très récemment, deux nouvelles molécules nommées « *Small Binders of CFTR* » (SBC040 et SBC219) ont été élaborées par une approche de modélisation moléculaire. Ces molécules ont initialement été conçues pour interagir avec un site à l'interface entre l'ICL4 et le NBD1 qui est altérée dans la structure 3D du variant CFTR- Δ F508. De façon intéressante, ces molécules n'ont pas montré d'activité correctrice, comme prévu par leur conception, mais une activité potentiatrice sur plusieurs variants de classe III sensibles à l'ivacaftor. De plus, un effet synergique a été observé entre l'ivacaftor et les SBCs suggérant un mécanisme d'action différent entre ces deux drogues (Froux *et al.* 2020).

~ OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE ~

Notre équipe s'intéresse aux pathologies hépatocytaires rares de l'enfant impliquant des défauts moléculaires du transporteur biliaire ABCB11. Le défi actuel consiste à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les déficits en ABCB11 afin de développer des molécules capables de corriger ces déficits. Cela constitue la base de la pharmacothérapie ciblée. Mon projet de recherche s'inscrit dans ce contexte et s'articule en deux parties ayant en commun l'étude de la correction pharmacologique des défauts liés aux variants d'*ABCB11* identifiés chez des patients atteints de déficit en ABCB11.

La première partie de mon projet s'intéresse à la caractérisation de trois variants d'*ABCB11* associés à des déficits en ABCB11 et pouvant affecter la fonction d'*ABCB11*. Cela permet d'une part de confirmer le caractère pathogène de ces variants et d'autre part d'identifier la bonne stratégie de pharmacothérapie ciblée à envisager. Par une approche de repositionnement de médicaments, j'ai évalué l'effet de quatre molécules potentiatrices de CFTR (ivacaftor, GLPG1837, SBC040 et SBC219) sur les variants caractérisés. Cette stratégie qui a donné des résultats prometteurs dans la mucoviscidose n'avait pas encore été étudiée dans les déficits en ABCB11.

La seconde partie de mon projet s'inscrit dans la continuité des travaux initiés par notre équipe sur les stratégies de translecture et de correction d'adressage. Elle présente des résultats préliminaires de pharmacothérapies combinatoires afin d'optimiser la correction des défauts moléculaires de variants de classe I et II d'*ABCB11* identifiés chez des patients atteints de déficit en ABCB11. D'une part j'ai évalué l'effet des quatre molécules potentiatrices précédentes sur deux variants potentiellement produits après la translecture du variant de classe I R1090X par la gentamicine. D'autre part, j'ai évalué l'effet de deux correcteurs de CFTR (elexacaftor et tezacaftor) ainsi que l'effet d'une combinaison de traitements alliant correcteurs et molécules potentiatrices sur le variant de classe II R1128C.

~ RESULTATS ~

Mes travaux de thèse s'articulent en deux parties. La première partie porte sur la caractérisation de trois variants faux sens d'ABCB11 (A257V, T463I et G562D) et sur la stratégie de potentialisation. Elle est présentée sous la forme de trois articles. La seconde partie présente des résultats préliminaires sur l'évaluation d'une pharmacothérapie ciblée combinatoire de deux variants d'ABCB11 (R1090X et R1128C) caractérisés au laboratoire.

I – Caractérisation de variants faux sens d'ABCB11 et stratégie de potentialisation

Les variants faux sens comptent pour 73 % des variants identifiées dans la séquence du gène d'*ABCB11* (Figure 20, Annexe 1). Elles peuvent affecter la maturation, le trafic intracellulaire, la fonction et/ou la stabilité du transporteur. Afin de mettre en place la stratégie de pharmacothérapie ciblée la plus adaptée, il est important d'identifier précisément le défaut induit par ces variants. Notre équipe a produit des résultats prometteurs sur les stratégies de translecture et de correction de variants de classe I et II d'ABCB11 (Gonzales *et al.* 2012, Gonzales *et al.* 2015, Amzal *et al.* 2021). Jusqu'à présent, la stratégie de potentialisation de la fonction d'ABCB11 n'avait pas été étudiée. Cette stratégie est particulièrement propice aux variants de classe III qui sont responsables d'un défaut de fonction du transporteur. La liaison et l'hydrolyse de l'ATP dans les NBSs étant essentielles à la fonction des transporteurs ABC, il n'est pas surprenant que des variants dans les NBDs altèrent la fonction de transport. Cependant, la translocation du substrat est un mécanisme complexe faisant intervenir différents paramètres tels que la communication entre NBDs/MSDs essentielle à la transmission du mouvement, la flexibilité de certaines régions indispensable aux changements de conformation, la reconnaissance et la liaison du substrat et l'interaction avec des partenaires moléculaires (Kerem 2005, Beis 2015). Ainsi, des variants localisées en dehors des NBDs, s'ils influent sur l'un de ces paramètres, peuvent

RESULTATS

également entraîner une perte de fonction du transporteur. Dans cette première partie, nous avons caractérisé trois variants d'*ABCB11* identifiées chez des patients atteints de déficit en *ABCB11* puis nous avons évalué l'effet de molécules potentiatrices de CFTR sur la fonction de ces variants.

Les variants ont été sélectionnées parmi celles identifiées chez des patients atteints de PFIC2 et répertoriées au sein du centre de référence maladies rares Atrésie des Voies Biliaires et Cholestases Génétiques (service d'Hépatologie et Transplantation Hépatique Pédiatriques et service de biochimie de l'Hôpital du Kremlin-Bicêtre) ou dans le registre international *NATural course and Prognosis of PFIC and Effect of biliary Diversion* (NAPPED). Nous avons évalué l'effet moléculaire probable de ces variants par modélisation moléculaire 3D d'*ABCB11* en collaboration avec le Dr. Isabelle Callebaut. Ces variants ont été reproduits par mutagenèse dirigée dans un plasmide pEGFP-N1 contenant l'ADNc d'*Abcb11* de rat et produisant après traduction la protéine de fusion *Abcb11*-GFP. Après transfection, l'expression et la localisation subcellulaire de la protéine générée ont été étudiées dans les lignées cellulaires Can 10, HepG2 et MDCK. L'activité de transport des variants a été évaluée par la quantification du transport vectoriel, du pôle basal vers le pôle apical, d'un AB radiomarké (taurocholate tritié, [³H]TC) dans des clones MDCK exprimant de manière stable *Abcb11* (sauvage ou muté) et *Ntcp* (le transporteur basolatéral des ABs).

Le premier article que je signe en co-première auteure porte sur la correction du défaut fonctionnel du variant T463I d'*Abcb11* par la molécule potentiatrice ivacaftor. Le variant T463I est localisé dans le Walker-A du NBD1, dans le site de liaison à l'ATP dégénéré (NBS-a). Le variant T463I était correctement localisé aux CBs dans la lignée hépatocytaire Can10 et au pôle apical dans la lignée cellulaire MDCK. La modélisation moléculaire 3D prédisait que le variant T463I perturbait l'interaction avec l' α -phosphate de l'ATP, modifiant ainsi la dimérisation des NBDs induite par l'ATP qui est essentielle à la fonction de transport d'ABs. En accord avec cela nous avons montré que, bien que le variant T463I conserve une fonction résiduelle, il présentait un défaut majeur de transport d'ABs. L'ivacaftor, une petite molécule identifiée par criblage à haut débit, a

été cliniquement approuvé pour le traitement de la mucoviscidose chez les patients porteurs de certains variants de classe III de CFTR. Chez ces patients, le traitement par l'ivacaftor entraîne une amélioration significative de la fonction respiratoire. De plus, il a été montré que l'ivacaftor corrigeait *in vitro* le défaut fonctionnel de certains variants de classe III d'ABCB4 localisés dans les NBDs (Delaunay, Bruneau *et al.* 2017). Dans notre étude, l'ivacaftor à la dose de 10 μ M permettait de corriger le défaut fonctionnel du variant T463I d'Abcb11, ramenant sa fonction de transport de [3 H]TC au niveau de celui de la protéine sauvage. Ces résultats ouvrent des perspectives de repositionnement de l'ivacaftor dans le traitement de pathologies liées à un déficit en ABCB11.

Le deuxième article que je signe en première auteure est une lettre à l'Éditeur portant sur la correction du défaut fonctionnel du variant A257V d'Abcb11 par l'ivacaftor. Notre équipe a mis en évidence ce variant d'une part chez une patiente hétérozygote ayant fait une ICP et d'autre part chez sa fille qui est porteuse du variant à l'état hétérozygote composite et qui a développé une PFIC2 dans l'enfance. Le variant A257V est située dans le TM4 d'ABCB11, au niveau d'une région particulièrement flexible. La modélisation moléculaire 3D suggérait que ce résidu pouvait jouer un rôle critique dans les changements conformationnels locaux d'ABCB11 entre les états « *inward-* » et « *outward-facing* » et pouvait donc affecter indirectement la fonction d'ABCB11. En accord avec les précédentes données publiées par l'équipe (Gonzales *et al.* 2015), nous avons montré que le variant A257V est correctement adressé aux CBs et à la membrane apicale des cellules HepG2 et des cellules MDCK. Bien qu'elle possède une activité résiduelle, le transport d'ABs était significativement plus faible que celui de la protéine sauvage. L'ivacaftor, même à faible concentration (0,5 μ M), restaure complètement la fonction de ce variant. Ces résultats confirment que le variant A257V est impliqué dans la pathogenèse de l'ICP et de la PFIC2. De plus, ils soutiennent le bénéfice de l'utilisation de l'ivacaftor en tant que traitement de pathologies liées à des déficits en ABCB11.

RESULTATS

Le troisième article est en cours de préparation en vue d'une soumission auprès de Liver International et présente des résultats très préliminaires. Il porte sur la restauration de la fonction des variants T463I, A257V et G562D par quatre molécules potentiatrices de CFTR. Le variant G562D est située dans la signature ABC (MSGGQ) du NBD1, au niveau du deuxième site de liaison à l'ATP (NBS-b). Nous avons ciblé particulièrement ce variant car l'alignement de séquences montre qu'il est homologue au variant G551D-CFTR, variant de classe III le plus répandu chez les patients atteints de mucoviscidose, pour lequel l'ivacaftor a été initialement approuvé. La modélisation moléculaire 3D d'ABCB11 prédisait que le variant G562D abolit l'interaction avec le γ -phosphate de l'ATP qui est essentielle à la fonction de transport d'ABs. D'une part nous avons montré que, comme pour les variants T463I et A257V, le variant G562D d'Abcb11 était correctement adressé aux CBs mais non fonctionnel et ce défaut pouvait être corrigé partiellement par l'ivacaftor. D'autre part, nous avons exploré l'effet de trois autres molécules potentiatrices de CFTR, le GLPG1837, le SBC040 et le SBC219. Ces trois molécules ont été identifiées par criblage haut débit ou par modélisation moléculaire. Dans cette étude, nous avons montré que ces trois molécules permettaient d'augmenter le transport d'ABs des trois variants d'Abcb11. D'autre part, nous avons montré que la combinaison de l'ivacaftor avec le SBC040 ou le SBC219 avait un effet additif laissant supposer un mécanisme d'action différent. Ces résultats ouvrent des perspectives de traitements intéressantes pour les variants induisant un défaut drastique de transport d'ABs, tels que le variant G562D.

I – 1 – Articles

I – 1 – 1 – Premier article (pages 58 à 70)

« Functional rescue of an ABCB11 mutant by ivacaftor: A new targeted pharmacotherapy approach in bile salt export pump deficiency ». Mareux, Lapalus *et al.* Liver Int. 2020 Aug;40(8):1917-1925. doi: 10.1111/liv.14518. Epub 2020 Jun 8.

I – 1 – 2 – Deuxième article (pages 71 à 85)

« *In vitro* functional rescue by ivacaftor of an ABCB11 variant involved in PFIC2 and intrahepatic cholestasis of pregnancy ». Mareux *et al.* soumis à Orphanet J Rare Dis. En Mai 2021.

I – 1 – 3 – Troisième article (pages 86 à 112)

« *In vitro* rescue of the bile acid transport function of ABCB11 variants by CFTR potentiators. » Mareux *et al.* en préparation (résultats préliminaires).



Functional rescue of an ABCB11 mutant by ivacaftor: A new targeted pharmacotherapy approach in bile salt export pump deficiency

Elodie Mareux¹ | Martine Lapalus¹ | Rachida Amzal¹ | Marion Almes^{1,2} | Tounsia Aït-Slimane³ | Jean-Louis Delaunay³ | Pauline Adnot¹ | Mauricette Collado-Hilly¹ | Anne Davit-Spraul^{1,4} | Thomas Falguières¹ | Isabelle Callebaut⁵ | Emmanuel Gonzales^{1,2} | Emmanuel Jacquemin^{1,2}

¹Inserm, Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie, UMR_S 1193, HepatinoV, Université Paris-Saclay, Orsay, France

²Paediatric Hepatology & Paediatric Liver Transplant Department, Reference Center for Rare Paediatric Liver Diseases, FILFOIE, ERN RARE LIVER, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Faculty of Medicine Paris-Saclay, CHU Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

³Inserm, Centre de Recherche Saint-Antoine (CRSA), UMR_S 938, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Sorbonne Université, Paris, France

⁴CHU Bicêtre, Biochemistry Unit, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁵Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, Sorbonne Université, Paris, France

Correspondence

Emmanuel Jacquemin, Service d'Hépatologie et de transplantation hépatique pédiatriques, Département de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, 94275 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France.
Email: emmanuel.jacquemin@aphp.fr

Funding information

EM was supported by "Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation" (Paris, France). RA

Abstract

Background & Aim: The canalicular bile salt export pump (BSEP/ABCB11) of hepatocytes is the main adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) transporter responsible for bile acid secretion. Mutations in *ABCB11* cause several cholestatic diseases, including progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) often lethal in absence of liver transplantation. We investigated in vitro the effect and potential rescue of a BSEP mutation by ivacaftor, a clinically approved cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR/ABCC7) potentiator.

Methods: The p.T463I mutation, identified in a PFIC2 patient and located in a highly conserved ABC transporter motif, was studied by 3D structure modelling. The mutation was reproduced in a plasmid encoding a rat Bsep-green fluorescent protein. After transfection, mutant expression was studied in Can 10 cells. Taurocholate transport activity and ivacaftor effect were studied in Madin-Darby canine kidney (MDCK) clones co-expressing the rat sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (Ntcp/*Slc10A1*).

Results: As the wild-type protein, Bsep^{T463I} was normally targeted to the canalicular membrane of Can 10 cells. As predicted by 3D structure modelling, taurocholate transport activity was dramatically low in MDCK clones expressing Bsep^{T463I}. Ivacaftor treatment increased by 1.7-fold taurocholate transport activity of Bsep^{T463I} ($P < .0001$), reaching 95% of Bsep^{wt} activity. These data suggest that the p.T463I mutation impairs ATP-binding, resulting in Bsep dysfunction that can be rescued by ivacaftor.

Conclusion: These results provide experimental evidence of ivacaftor therapeutic potential for selected patients with PFIC2 caused by *ABCB11* missense mutations

Abbreviations: ABC, ATP-binding cassette; ATP, adenosine triphosphate; BA, bile acid; BSEP/Bsep, bile salt export pump; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; GFP, green fluorescent protein; MDCK, Madin-Darby canine kidney; MDR3, multidrug resistance protein 3; MSD, membrane spanning domain; NBD, nucleotide binding domain; Ntcp, Na-taurocholate cotransporting polypeptide; PFIC2, progressive familial intrahepatic cholestasis type 2; TC, taurocholate; wt, wild type.

Elodie Mareux and Martine Lapalus share first co-authorship; Emmanuel Gonzales and Emmanuel Jacquemin share last co-authorship.

© 2020 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

was supported by "Association pour la Recherche en Hépatologie Pédiatrique" (Hôpital Bicêtre, France) and by "Association Maladie Foie Enfants" (Malakoff, France). MA was supported by "Société Française de Pédiatrie" (Paris, France).

Handling Editor: Emma Andersson

affecting BSEP function. This could represent a significant step forward for the care of patients with BSEP deficiency.

KEYWORDS

ABC transporters superfamily, cholestatic liver diseases, paediatrics, PFIC2, potentiator, VX-770

1 | INTRODUCTION

Numerous studies have shown that mutations in the *ABCB11* gene, encoding the bile salt export pump (BSEP), are associated with several cholestatic diseases of hepatocellular origin, the most severe form being progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2).^{1,2} BSEP is expressed at the canalicular membrane of hepatocytes and is the main ATP-binding cassette (ABC) transporter responsible for bile acid (BA) secretion.¹ As other members of the superfamily of ABC transporters, BSEP is characterized by two membrane-spanning domains (MSDs) involved in substrate specificity and export, and two nucleotide-binding domains (NBDs) providing the energy to pump substrates across the membrane against their electrochemical gradients.^{2,3} In PFIC2, impaired biliary BA secretion leads to decreased bile flow, BA accumulation in hepatocytes, ongoing hepatocellular damage and increased risk of hepatocellular carcinoma. Clinical signs of cholestasis usually appear within the first year of life with jaundice and pruritus. Medical therapy with ursodeoxycholic acid (UDCA) and surgical therapy such as biliary diversion may provide some symptomatic relief. Nevertheless, in the majority of cases, liver transplantation is required before adulthood because of unremitting pruritus, hepatic failure or hepatocellular carcinoma. Numerous PFIC2-causing *ABCB11* mutations have been reported, mostly nonsense, missense and splicing mutations, but also small insertions, deletions and duplications.^{2,4-7} Regarding the missense mutations, some of them affect the processing or trafficking of the protein, thereby causing its retention in the endoplasmic reticulum and subsequent mistargeting to the canalicular membrane. We have previously shown that 4-phenylbutyrate, a clinically approved pharmacological chaperone drug could rescue mistrafficking of some BSEP missense mutants.^{8,9} Other *ABCB11* missense mutations, especially those involving the NBDs, lead to a correctly targeted protein whose BA transport activity is impaired.^{2,5} In two major series reporting on 165 *ABCB11* mutations identified in patients with severe BSEP deficiency, 90 (55%) were missense mutations including 44 (27%) that were located in the NBDs.^{4,7} NBDs are well-conserved throughout the ABC superfamily and contain specific motifs involved in ATP-binding and/or hydrolysis, such as the Walker-A and Walker-B motifs, the A-, D-, H-, and Q-loops, and the LSGGQ (Leu-Ser-Gly-Gly-Gln) signature which is unique to the ABC superfamily.³ Ivacaftor (VX-770, Kalydeco®, Vertex Pharmaceuticals) is a clinically approved potentiator treatment for some class III CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *ABCC7*)

Lay Summary

- Mutations in *ABCB11*/BSEP cause or predispose to several liver disorders, the most severe form being progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2).
- More than half of PFIC2 patients do not or poorly respond to medical treatment and/or surgical biliary diversion and require liver transplantation.
- Our in vitro study shows that the p.T463I mutation of BSEP, identified in a PFIC2 patient, leads to a defect of canalicular bile acid transport activity and that ivacaftor, a clinically approved potentiator, can rescue this functional defect.
- This proof of concept suggests that ivacaftor might constitute an efficient targeted pharmacotherapy approach for some selected PFIC2 patients carrying *ABCB11* mutations that impairs BSEP function. This could represent a significant step forward for the care of patients with BSEP deficiency.

mutations which are mainly located in the NBDs.^{10,11} Interestingly, it has been shown that ivacaftor could also increase the function of some MDR3 (multidrug resistance protein 3, *ABCB4*) mutants resulting from mutations located in NBDs and responsible for PFIC3, another chronic cholestatic liver disease.¹² However, the ability of potentiators to increase the function of BSEP mutants affecting BA transport activity has not been studied. BSEP ATP-binding sites having a strong similarity with those of CFTR and MDR3, we selected the p.T463I mutation, identified in a PFIC2 patient and located in the Walker-A motif of the first BSEP nucleotide binding domain (NBD1). Herein, we report that the p.T463I mutant is correctly located at the canalicular membrane of hepatocytes but that its BA transport activity is decreased and that ivacaftor can rescue this functional defect.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Patient's data and molecular modelling

The patient harbouring the p.T463I mutation was referred to the paediatric hepatology unit of Bicêtre Hospital at age nine

months. *ABCB11* gene analysis, liver immunohistochemistry using anti-human BSEP and MDR3 antibodies and analyses of bile composition were performed as previously reported.⁶ Liver samples were obtained from the Centre de Ressources Biologiques des Hôpitaux Universitaires Paris-Saclay, France. Informed consent was obtained from the parents and this study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the institution's human research committee (Comité de Protection des Personnes, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France). Model of the 3D structure of the *ABCB11* NBD1/NBD2 assembly was built with Modeller v9.15¹³ using as a template the experimental structure of the MJ0796 NBD1/NBD2 heterodimer in complex with ATP (pdb 1I2t),¹⁴ solved at 1.9 Å, as described previously for the modelling of the *ABCB4* NBD1/NBD2 assembly.¹² We have used this MJ0796 3D structure, rather than other 3D structures sharing higher sequence similarities with *ABCB11*, because of the high resolution observed within the ATP-binding sites. The sequence alignment used for modelling is given in Figure S1.

2.2 | DNA constructs and mutagenesis

The plasmid pEGFP-N1 encoding a rat wild type (wt) Bsep-green fluorescent protein (GFP) fusion protein was a gift from J.L Boyer (Yale University School of Medicine, New Haven, CT).¹⁵ Patient's mutation c.1388 C>T, p.T463I was introduced using the QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. The primers used for mutagenesis were 5'-AGTGGGGCTGGGAAGAGTATAGCATTACAGCTC-3' (forward) and 5'-GAGCTGTAATGCTACTCTTCCCAGCCCCACT-3' (reverse). Rat Bsep was used because of its high degree of homology with its human ortholog and a higher level of expression in cultured cells.¹⁶ Furthermore, the p.T463I mutation is located in a highly conserved region between human BSEP and rat Bsep. The whole construct was verified by Sanger sequencing.

2.3 | Cell culture and transfection

Can 10 cells were transiently transfected with the plasmids encoding Bsep-GFP (wt or T463I), as described.^{8,9} This well-characterized rat hepatocellular polarized line expresses only minimal level of Bsep and forms bile canaliculi, thus allowing the study of the subcellular localization of Bsep mutants.^{8,9,17} Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells, a well-characterized polarized kidney cell line allowing measurement of Ntcp- and Bsep-mediated bile acid vectorial transport,^{18,19} were transfected with the plasmids encoding Bsep-GFP (wt or T463I) using Fugene HD transfection reagent (Promega), according to the manufacturer's instructions. Stable transfected clones were obtained by selection with 600 µg/mL G418 (Sigma-Aldrich Chimie) for 3 weeks and were subsequently grown in the presence of 300 µg/mL G418, then sorted by limiting dilution.

2.4 | Immunofluorescence and confocal microscopy

Immunofluorescence analyses were performed as described.^{8,9} For Can 10 cells, primary antibodies were a mouse anti-GFP (1:80; Roche Diagnostics) and a rat anti-zonula occludens 1 (undiluted; a gift from B.R Stevenson,²⁰ Edmonton). For confluent MDCK clones, primary antibodies were a rabbit anti-GFP (1:500; Abcam), a mouse anti-cMyc (1:250; BD Pharmigen) and the rat anti-zonula occludens 1 (see above). Appropriate goat anti-immunoglobulin G Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 594 secondary antibodies (1:500; Molecular Probes) were used as described.^{8,9} The coverslips, embedded in mounting medium containing DAPI (Sigma-Aldrich Chimie), were examined with a confocal microscope (Eclipse TE-2000-Nikon-C1) equipped with 60× objective and serial xy optical sections with a z-step of 0.3 µm were taken using NIS-Elements software (Nikon).

2.5 | Quantification of cells targeting Bsep to the canalicular pole

Can 10 cells expressing Bsep-GFP (wt or T463I) and forming bile canaliculi were examined by epifluorescence microscopy. Bile canaliculi were identified by phase contrast and by immunolocalization of ZO-1 (at the seal of bile canaliculi). Among Bsep-GFP-positive Can 10 cells forming canaliculi, the percentage of cells expressing Bsep-GFP at the canalicular membrane was determined (40-100 cells were examined per coverslip, two coverslips were used per culture and three independent cultures of Can 10 cells were performed).

2.6 | Expression of Ntcp in MDCK Bsep expressing clones

The rat cDNA of the sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (*Ntcp/Slc10A1*) was cloned into the lentiviral vector pLenti cMyc-DDK-IRES-Puro (PS100069, OriGene). The MDCK clones with the highest Bsep-GFP (wt or T463I) expression and parental MDCK cells were infected with lentiviral particles containing the recombinant plasmid at a multiplicity of infection of 30 and recombinant cells were selected with 3 µg/mL of puromycin (Ozyme).

2.7 | Immunoblot analyses

Cell lysates from cultured MDCK clones and immunoblotting were performed as described²¹ using mouse anti-GFP (1:500; Roche Diagnostics), anti-cMyc (1:500; BD Pharmigene) and anti-β-actin (1:3000, Sigma Aldrich) antibodies incubated overnight in PBS with 0.05% tween followed by horseradish peroxidase-linked mouse-specific secondary antibodies (GE Healthcare). Development of peroxidase activity was performed with an ECL detection kit (BioRad). Bsep-GFP, Ntcp-cMyc and β-actin electrophoretic patterns were separately quantified on gels using ImageJ software (US National Institutes of Health). Bsep-GFP and

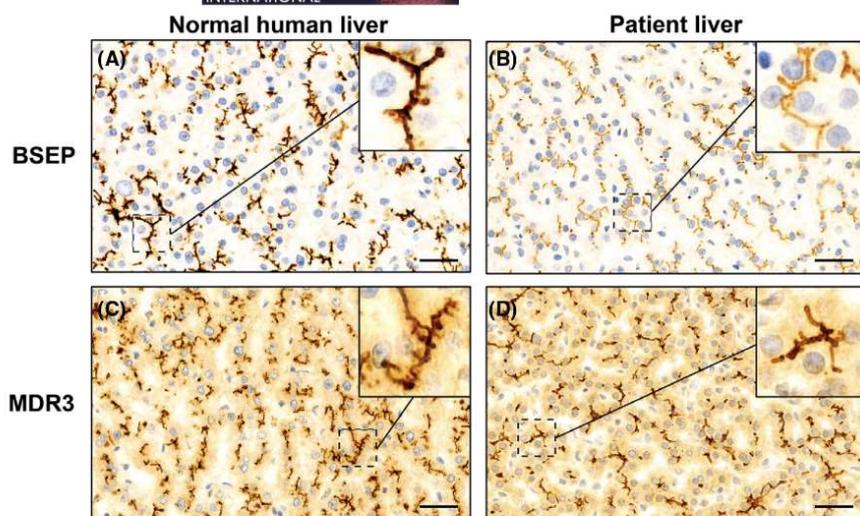


FIGURE 1 Immunohistochemical detection of BSEP and MDR3 in the liver of the PFIC2 patient. A and B, BSEP staining (brown) in normal human liver (A) and patient liver (B). C and D, MDR3 staining (brown) in normal human liver (C) and patient liver (D). Nuclei are also shown (blue). The livers display normal canalicular staining (A, C, D) and faint canalicular staining (B). Insets are magnified areas indicated by dashed squares. Bars: 50 μ m

Ntcp-cMyc relative expressions were normalized to the expression of β -actin.

2.8 | Taurocholate transport assay and ivacaftor treatment

Parental MDCK cells and MDCK clones stably expressing Bsep-GFP and/or Ntcp-cMyc were seeded on polyethylene terephthalate membrane inserts (pore size 3 μ m; Falcon) in 24-well plates at a density of 10^4 cells/insert. During the five following days, the integrity of cell monolayers was assessed by transepithelial electrical resistance measurements and Lucifer yellow permeability tests.²² Culture medium was replaced by prewarmed transport buffer (in mmol/L: 118 NaCl, 23.8 NaHCO₃, 4.83 KCl, 0.96 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 12.5 HEPES, 5 glucose, and 1.53 CaCl₂, adjusted to pH 7.4) in apical and basal compartments, in the absence or presence of ivacaftor (Cliniscience). Ivacaftor was used at a concentration of 10 μ mol/L, as previously reported for the rescue of class III CFTR and MDR3 mutants.^{10,12} Taurocholate (TC, 0.9 μ mol/L, Sigma-Aldrich) and [³H] Taurocholate ([³H]TC, 0.1 μ mol/L, 1 μ Ci/mL, Perkin Elmer) were added in the basal compartment.¹⁹ After two hours, the apical buffer was collected, membrane inserts were washed with ice-cold PBS, then cells were lysed with 120 μ L 1% Triton X-100. Transcellular transport and intracellular accumulation of [³H]TC were calculated from the radioactivity measured by scintillation counter (Hidex 300 SL) in the apical buffer and cell lysates respectively. Aliquots (50 μ L) of cell lysates were used to determine protein concentration (DC Protein Assay Kit, BioRad), with bovine serum albumin as a standard. Transport data were normalized to protein amount.

2.9 | Statistical analyses

Data are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using ANOVA, except for the quantification of canalicular Bsep-GFP positive Can 10 cells which was analysed using the Student *t* test. A *P* value < .05 was considered to be significant.

3 | RESULTS

3.1 | The p.T463I mutation of BSEP and 3D structure modelling of human BSEP NBDs

The p.T463I missense mutation of BSEP was identified in one allele of *ABCB11* in a PFIC2 patient harbouring the p.R1057X nonsense mutation in the other allele.^{4,5,7,23} This nonsense mutation leads to the introduction of a premature termination codon in NBD2 and predicts premature truncation of BSEP, resulting in the absence of protein synthesis through a nonsense-mediated mRNA decay process.²³ Immunostaining of the liver from this patient revealed a faint but positive canalicular staining of BSEP, as compared to the normal human liver (Figure 1A,B), without alteration of the MDR3 staining (Figure 1C,D). Moreover, biliary BA concentration in this patient was low (1 mmol/L, *N* > 10).⁶ Therefore, it is likely that the positive canalicular BSEP immunostaining observed in the liver of the patient is due to normal canalicular targeting of the BSEP^{T463I} mutant.

BSEP consists of 1321 amino acids distributed in a tandemly duplicated structure composed of two MSDs (MSD1 and MSD2) and two cytoplasmic NBDs (NBD1 and NBD2). There are two composite ATP-binding sites formed at the interface of the head-to-tail NBD1/NBD2 heterodimer (site A and B). Each site is indeed composed of Walker-A/Walker-B motifs from one NBD and the signature motif of the other NBD (Figure 2A). In contrast with MDR3, BSEP has asymmetric ATP-binding sites, one of them (site A) being degenerate with the following distinctive amino acids: Y429 (A loop), K461-S462 (Walker A), Q503 (Q loop), M584 (Walker B), H615 (H-loop), L1219-S1220-R1221-G1222-E1223 (ABC signature) (Figure 2). As for other asymmetric ABC transporters, it is expected that this site is catalytically inactive, with long-term ATP-binding at the NBD interface.²⁴ The p.T463I missense mutation is located within the Walker-A motif of NBD1 and belongs to the degenerate site A. The 3D structure modelling predicts that this residue interacts with the ATP α -phosphate (Figure 2B). Its substitution is thus expected to prevent or disturb ATP-binding, hindering ATP-induced NBDs dimerization and resulting in BSEP dysfunction.

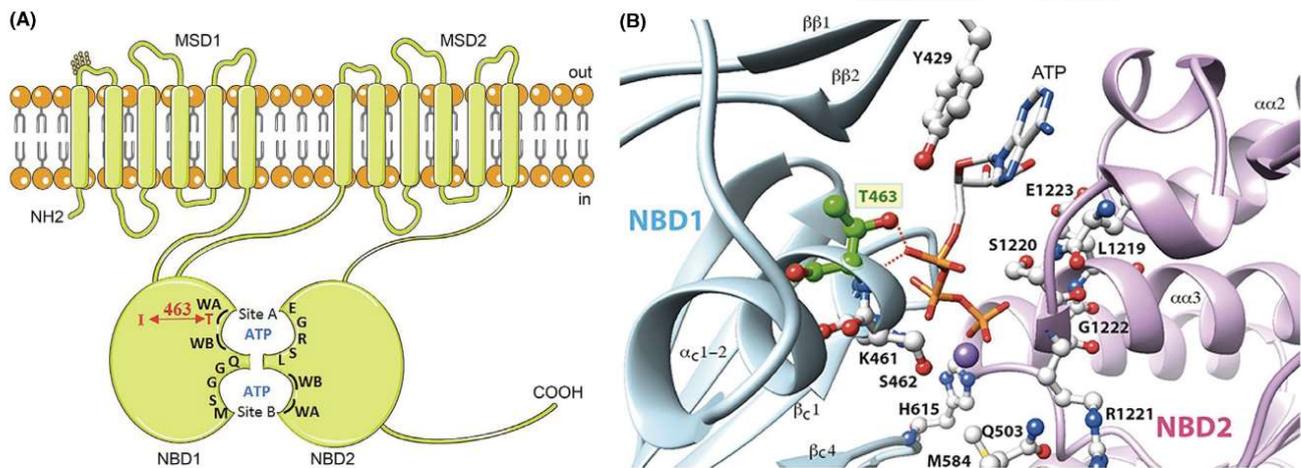


FIGURE 2 Organization of human BSEP and 3D structure modelling of ATP-binding site A. A, The ATP-binding sites (site A and B) of BSEP are formed by the Walker-A (WA) and Walker-B (WB) motifs of one NBD and the ABC signature of the other NBD. The p.T463I mutation (in red) belongs to the WA motif of NBD1, within the degenerate ATP-binding site A. B, View (ribbon representation) of the model of the 3D structure of BSEP degenerate ATP-binding site A, in which amino acid T463I (depicted in green with atomic details) is interacting with the ATP α -phosphate (dashed lines).

3.2 | Subcellular localization of Bsep^{T463I} in Can 10 cells

Localization of Bsep^{T463I} was compared to that of Bsep^{wt} in Can 10 cells after transient Bsep-GFP expression. As the wt protein, Bsep^{T463I} was located at the canalicular membrane, delineated by the tight junction-associated protein ZO-1 (Figure 3A). Quantification showed that all Bsep-GFP-positive Can 10 cells forming canaliculi expressed Bsep (wt or T463I) exclusively at the canalicular membrane (Figure 3B). These observations indicate that the p.T463I mutation did not impair the intracellular trafficking of Bsep.

3.3 | Generation of MDCK clones stably expressing Bsep and Ntcp

The Bsep-mediated BA secretion was evaluated in MDCK clones stably expressing Bsep-GFP (wt or T463I) and/or Ntcp-cMyc. The latter is a basolateral transporter allowing BA entry into MDCK cells. It is also important to note that MDCK cells are reported not to endogenously express Bsep.^{19,25} The appropriate expressions of Bsep and Ntcp, at the apical and basolateral membrane of MDCK cells, respectively, were checked using immunodetection techniques and confocal imaging. On immunoblotting, Bsep-GFP (apparent molecular mass of 190 kDa) was detected in MDCK-Bsep^{wt}, MDCK-Bsep^{wt}/Ntcp and MDCK-Bsep^{T463I}/Ntcp clones (Figure 4A; Figure S2A). The expression of Ntcp-cMyc was detected at 53 kDa in MDCK-Ntcp, MDCK-Bsep^{wt}/Ntcp and MDCK-Bsep^{T463I}/Ntcp clones (Figure 4A; Figure S2B). Quantification of Bsep-GFP and Ntcp-cMyc electrophoretic patterns displayed expression levels of Bsep-GFP and Ntcp-cMyc among MDCK clones that were not statistically different except for MDCK-Ntcp clone that, as expected, did not express Bsep-GFP (Figure 4B,C). The subcellular localization of Bsep

(wt or T463I) and Ntcp was assessed using confocal microscopy. Bsep (wt or T463I) were predominantly located along the apical membrane of MDCK-Bsep^{wt}, MDCK-Bsep^{wt}/Ntcp and MDCK-Bsep^{T463I}/Ntcp cells (Figure 4D; Figure S2C). This localization is consistent with the normal canalicular location of Bsep^{T463I} observed in Can 10 cells (Figure 3A) and in the patient's liver (Figure 1B). As expected, Ntcp was exclusively located at the basolateral membrane in MDCK-Ntcp, MDCK-Bsep^{wt}/Ntcp and MDCK-Bsep^{T463I}/Ntcp clones (Figure 4D; Figure S2C). Control parental MDCK cells did not express detectable amounts of Bsep-GFP or Ntcp-cMyc on immunoblotting and on confocal imaging (Figure S2A-C).

3.4 | BA transport activity of Bsep^{T463I} and effect of ivacaftor

The BA transport activity and the effect of ivacaftor were assessed in MDCK clones stably expressing Bsep-GFP (wt or T463I) and/or Ntcp-cMyc by measuring the intracellular [³H]TC accumulation and the transcellular transport of [³H]TC across the monolayers. As previously reported,¹⁹ intracellular [³H]TC concentration in MDCK clone expressing only Bsep^{wt} was minimal, whereas in MDCK-Ntcp clone, it was significantly higher indicating that Ntcp expression is required for the entry of TC into cells (Figure S2D). In addition, the transcellular transport of [³H]TC in the apical direction and through the apical membrane was 10.8-fold higher in MDCK-Ntcp clone compared with MDCK-Bsep^{wt} clone, suggesting the presence of an apical transporter other than Bsep that carries TC in MDCK cells (Supporting Figure S2E), as previously reported.¹⁹ The basal to apical flux of [³H]TC was 3.5-fold higher and intracellular [³H]TC concentration was seven-fold lower compared with MDCK-Ntcp clone, indicating that Bsep^{wt} efficiently transports TC across the apical membrane (Supporting Figure S2D,E). Thus, our experimental model

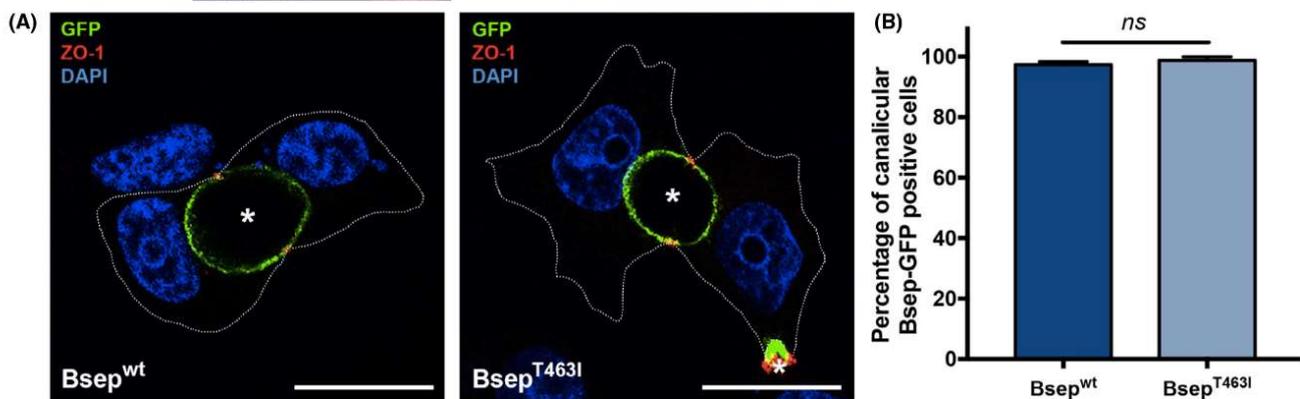


FIGURE 3 Immunolocalization of Bsep-GFP (wt and T463I) in transiently transfected Can 10 cells. A, Immunolocalization of Bsep^{wt}-GFP, Bsep^{T463I}-GFP (green) and tight junction protein zonula occludens 1 (ZO-1, red) in transiently transfected Can 10 cells using confocal microscopy. Dashed lines: transfected cells. *Bile canaliculus. Bars: 10 μm. B, Quantification of experiments shown in A. Among Bsep-GFP-positive cells forming canaliculi, the percentage of cells expressing Bsep-GFP at the canalicular membrane was determined. ns, not significant (student t test)

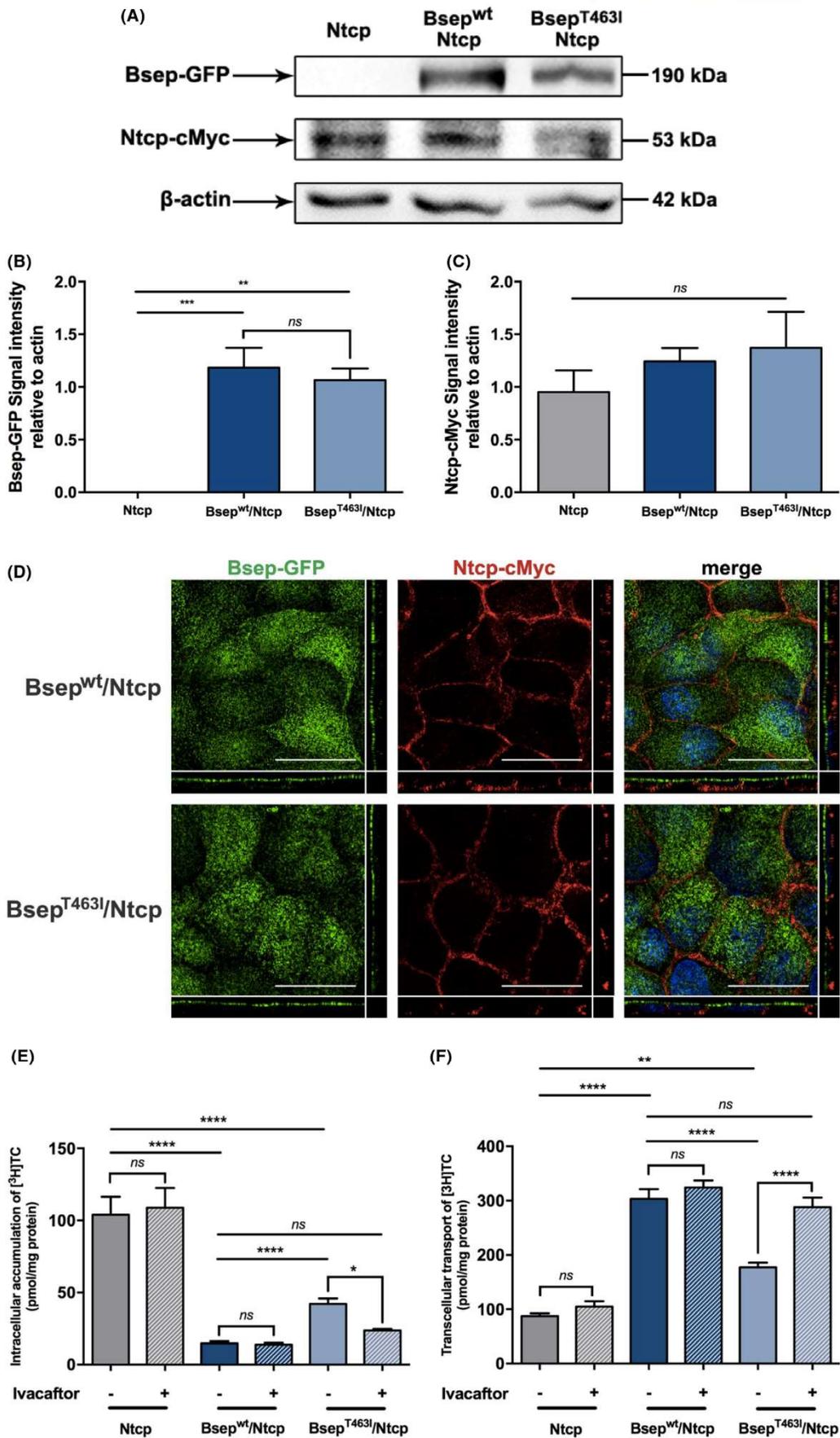
allows a precise measurement of BA uptake and export through Ntcp and Bsep transporters respectively. The Bsep^{T463I} mutant likely retains residual transport activity since the intracellular [³H]TC concentration in MDCK-Bsep^{T463I}/Ntcp clone was significantly lower ($P < .0001$) than in MDCK-Ntcp clone (42.2 ± 3.8 vs 104.0 ± 12.5 pmol/mg protein, respectively) and the [³H]TC transcellular transport detected in MDCK-Bsep^{T463I}/Ntcp clone was significantly higher ($P = .0015$) than the one measured in the MDCK-Ntcp clone (177.2 ± 8.7 vs 87.4 ± 5.1 pmol/mg protein, respectively; Figure 4E,F). However, we observed a marked increase in intracellular [³H]TC concentration by 2.9-fold ($P < .0001$) in MDCK-Bsep^{T463I}/Ntcp clone compared with MDCK-Bsep^{wt}/Ntcp clone and the amount of [³H]TC detected at the apical compartment was dramatically decreased ($P < .0001$), approaching 58% of the transcellular transport measured in MDCK-Bsep^{wt}/Ntcp clone (Figure 4E,F). These observations indicate that the BA transport activity of Bsep^{T463I} is impaired. No significant effect of treatment with ivacaftor (10 μmol/L) was observed neither on the morphology of the cells and the distribution of Bsep-GFP or Ntcp-cMyc (Figure S3) nor on BA transport activity in MDCK-Ntcp and MDCK-Bsep^{wt}/Ntcp clones ($P > .9999$; Figure 4E,F). In MDCK-Bsep^{T463I}/Ntcp clone, ivacaftor significantly decreased ($P = .0449$) intracellular [³H]TC concentration by 1.8-fold and significantly increased ($P < .0001$) the transcellular transport of [³H]TC by 1.6-fold, reaching 95% of the Bsep^{wt} transport activity (Figure 4E,F).

4 | DISCUSSION

The data presented here provide evidence that functional defect of a PFIC2-causing BSEP missense mutation could be rescued in vitro by ivacaftor. The p.T463I mutation was identified in a compound heterozygous patient with the p.R1057X nonsense mutation in the other allele of BSEP. Since PFIC2 is an autosomal recessive disease, the heterozygous p.R1057X nonsense mutation alone cannot be responsible for the clinical phenotype. Our hypothesis was that Bsep^{T463I} was correctly targeted to the bile canaliculi, as we confirmed when expressed in Can 10 cells, but was not functional, as suggested by the low concentration of BA measured in patient's bile. However, Bsep^{T463I} likely retains residual BA transport activity because the biliary BA concentration was not decreased as much as usually observed in PFIC2 patients.⁶ This is in line with our measurements of BA transport activity in MDCK-Bsep^{T463I}/Ntcp cells.

The p.T463I mutation occurs in the Walker-A motif of NBD1, a region highly conserved throughout the vertebrate phylum and therefore likely containing essential residues for BSEP function.²⁶ In agreement with these observations, structure modelling predicted that p.T463I mutation disrupted interaction with the ATP α-phosphate and thereby altered ATP-induced NBD dimerization, which is critical for BA transport function.¹⁴ We show that, although correctly targeted to the canalicular membrane, Bsep^{T463I} displayed a

FIGURE 4 Studies of Bsep-GFP (wt or T463I) and/or Ntcp-cMyc in stable MDCK clones and effect of ivacaftor. A, MDCK clones stably expressing Bsep-GFP (wt or T463I) and/or Ntcp-cMyc were lysed and analysed by immunoblotting using anti-GFP and anti-cMyc antibodies. B and C, Bsep-GFP (B) and Ntcp-cMyc (C) electrophoretic patterns from A were separately quantified and their relative amounts were calculated and normalized to β-actin. Results are means (±SEM) of at least three experiments. ns: not significant; ** $P < .01$; *** $P < .001$ (one-way ANOVA). D, Immunolocalization by confocal microscopy of Bsep-GFP (wt or T463I) and Ntcp-cMyc, shown in green and red respectively. Nuclei (blue) are shown in the merged pictures. Bottom, centre and right panels show x-z, x-y and y-z plane images respectively. Bars: 10 μm. E, Intracellular [³H]TC accumulation and F, Vectorial transport of [³H]TC in MDCK clones expressing Ntcp, Bsep^{wt}/Ntcp or Bsep^{T463I}/Ntcp in the absence (-) or presence (+) of ivacaftor (10 μmol/L). Results are means ± SEM of at least three experiments per condition. ns, not significant; * $P < .05$; ** $P < .01$; **** $P < .0001$ (two-way ANOVA)



major activity defect. So far, no targeted pharmacotherapy has been proposed for mutations that affect BSEP function. Ivacaftor, a small molecule identified by high-throughput screening, was clinically approved by FDA and EMA for some class III CFTR mutations that impaired normal channel gating activity. Ivacaftor treatment has been shown to be safe when used in cystic fibrosis patients and leads to a significant improvement in respiratory function.^{11,27} Furthermore, ivacaftor rescued in vitro the functional defect of class III MDR3 missense mutants involving the NBDs.¹² Considering the motif conservation and structure-function relationships between BSEP, CFTR and MDR3, we show here that ivacaftor can also correct the functional defect of Bsep^{T463I} mutant. This mutant was previously reported in two families.^{4,5} As mentioned earlier, about a quarter of ABCB11 mutations identified in patients with severe BSEP deficiency are missense mutations located in the NBDs.^{4,7} Thereby, this category of patients might be good candidates for ivacaftor treatment, provided that results of 3D structure analyses and in vitro studies are supportive.

The mechanism of action of ivacaftor remains largely unknown. Concerning CFTR, cryo-electron microscopy has recently revealed, a potential ivacaftor binding site within the MSDs.²⁸ It has been proposed that the binding of ivacaftor shifts the gating transitions towards the open state of the channel, regardless of the dimerization state of the NBDs and in an ATP-independent manner.²⁸⁻³⁰ On another hand, a research team has proposed an ATP-dependent mechanism for ivacaftor potentiation³¹ and, more recently, demonstrated a clear dependence on the phosphorylation state.³² Ivacaftor has also been shown to stimulate the ATPase activity of PgP (ABCB1), probably causing a stabilization of the protein.³³ A similar mechanism could be proposed for Bsep, in which the drug would stabilize the MSDs in a substrate binding competent conformational state. Further studies are needed to gain insights into these mechanisms and to define its potential ATP-dependency.

Our findings show that deficient BA secretion activity due to a missense ABCB11 mutation can be rescued in vitro by the CFTR potentiator, ivacaftor. These results provide experimental evidence that ivacaftor may offer a new therapeutic option for selected patients with BSEP deficiency due to missense mutations located in the NBDs. Studies in selected PFIC2 patients are warranted to confirm the beneficial effect of ivacaftor. In addition, in PFIC2 patients, the combination of ivacaftor with a chaperone drug could be an interesting option to improve the functional level of BSEP mutants retargeted by a chaperone drug to the bile canalculus, as it has been proposed for selected cystic fibrosis patients.^{8,9,34}

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank AMFE (Association Maladie Foie Enfants, Malakoff, France), MLD (Monaco Liver disorder, Monaco), Association "Pour Louis 1000 Foie Merci" (Fournet-Luisans, France), Association "Il était un foie" (Plouescat, France) and Fondation Rumsey-Cartier (Genève, Switzerland) for their support and Professor Catherine Guettier (Pathology Unit, CHU Bicêtre, France) for performing

immunostaining studies in patient liver. We thank Sylvie Fabrega (Viral Vector for Gene Transfer core facility of Structure Fédérative de Recherche Necker, University of Paris Descartes, Paris, France) for the preparation of lentiviral particles, and Rodolphe Auger (I2BC, CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France), and Brigitte Grosse (Université Paris-Saclay, Inserm, Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie, UMR_S 1193, Hepatinov, Orsay, France) for technical support, as well as Pascale Dupuis-Williams (Université Paris-Saclay, Inserm, Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie, UMR_S 1193, Hepatinov, Orsay, France) for critical reading of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

None.

AUTHOR CONTRIBUTION

EM, ML, EG and EJ conceived and designed the study. EM, ML, RA, PA and IC carried out the experiments with contributions from MA, TAS, JLD, MCH and ADS. EM, ML, EG and EJ wrote the manuscript and designed the figures with input from all authors. TF contributed to the revision of the manuscript. All the authors contributed to data analyses, interpretation of the data, critical reviewing of the manuscript and approved the final version of the manuscript.

ORCID

Elodie Mareux  <https://orcid.org/0000-0002-0474-9217>
 Martine Lapalus  <https://orcid.org/0000-0002-7033-831X>
 Tounsia Aït-Slimane  <https://orcid.org/0000-0002-7459-859X>
 Jean-Louis Delaunay  <https://orcid.org/0000-0002-6512-5483>
 Anne Davit-Spraul  <https://orcid.org/0000-0002-4710-4793>
 Thomas Falguières  <https://orcid.org/0000-0003-2867-0500>
 Isabelle Callebaut  <https://orcid.org/0000-0003-3124-887X>
 Emmanuel Gonzales  <https://orcid.org/0000-0002-1546-3193>
 Emmanuel Jacquemin  <https://orcid.org/0000-0002-7536-6272>

REFERENCES

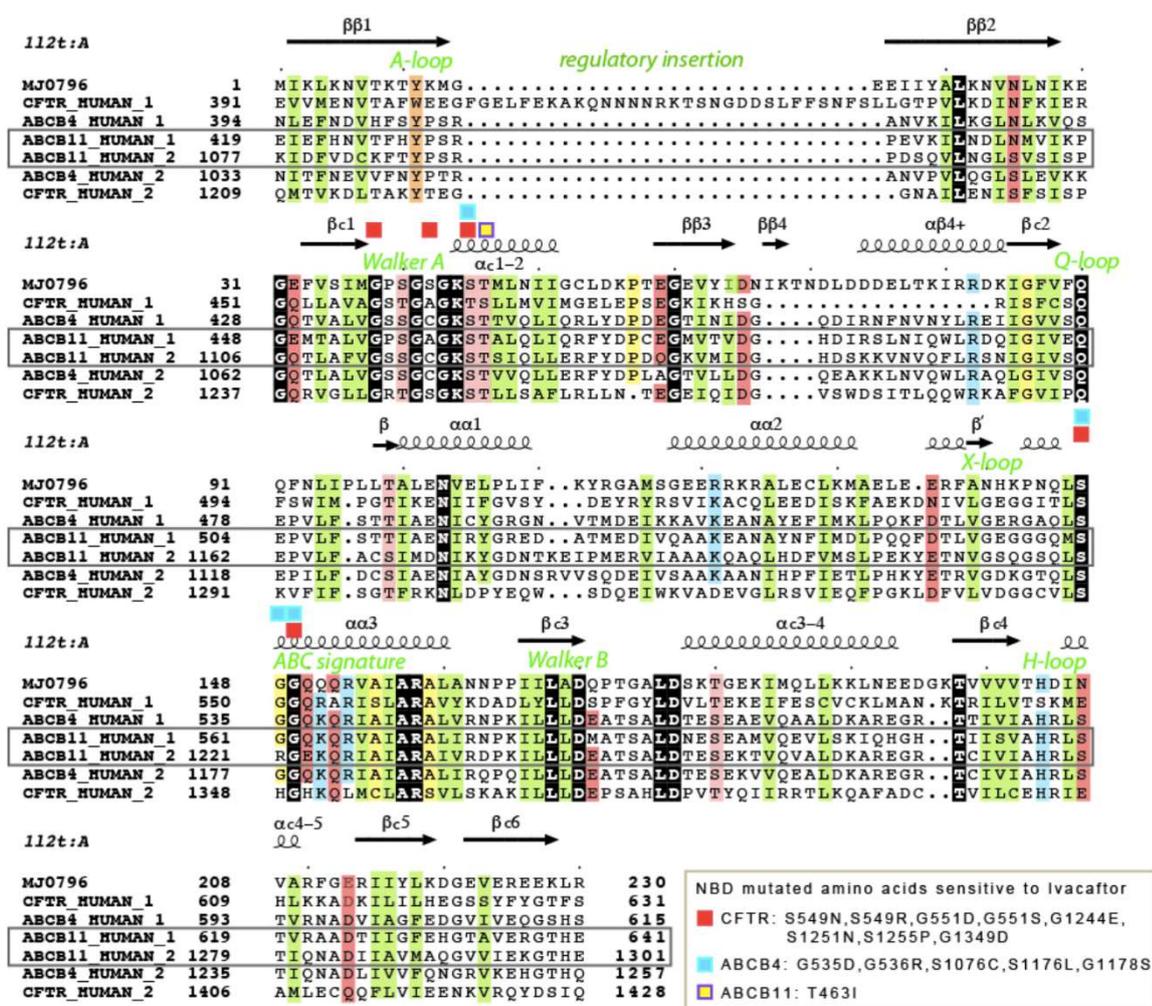
- Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis*. 2009;4:1.
- Soroka CJ, Boyer JL. Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: therapeutic implications of BSEP mutations. *Mol Aspects Med*. 2014;37:3-14.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 2001;11(7):1156-1166.
- Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, et al. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology*. 2008;134(4):1203-1214.
- Byrne JA, Strautnieks SS, Ihrke G, et al. Missense mutations and single nucleotide polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre-messenger RNA splicing. *Hepatology*. 2009;49(2):553-567.
- Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, et al. ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology*. 2010;51(5):1645-1655.

7. Dröge C, Bonus M, Baumann U, et al. Sequencing of FIC1, BSEP and MDR3 in a large cohort of patients with cholestasis revealed a high number of different genetic variants. *J Hepatol*. 2017;67(6):1253-1264.
8. Gonzales E, Grosse B, Cassio D, Davit-Spraul A, Fabre M, Jacquemin E. Successful mutation-specific chaperone therapy with 4-phenylbutyrate in a child with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J Hepatol*. 2012;57(3):695-698.
9. Gonzales E, Grosse B, Schuller B, et al. Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology*. 2015;62(2):558-566.
10. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PDJ, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(44):18825-18830.
11. De Boeck K, Munck A, Walker S, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J Cyst Fibros*. 2014;13(6):674-680.
12. Delaunay J-L, Bruneau A, Hoffmann B, et al. Functional defect of variants in the adenosine triphosphate-binding sites of ABCB4 and their rescue by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator, ivacaftor (VX-770). *Hepatology*. 2017;65(2):560-570. Delaunay J-L and Bruneau A shared co-first authorship.
13. Webb B, Sali A. Protein structure modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol*. 2017;1654:39-54.
14. Smith PC, Karpowich N, Millen L, et al. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*. 2002;10(1):139-149.
15. Lam P, Pearson CL, Soroka CJ, Xu S, Mennone A, Boyer JL. Levels of plasma membrane expression in progressive and benign mutations of the bile salt export pump (Bsep/Abcb11) correlate with severity of cholestatic diseases. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(5):C1709-C1716.
16. Wang L, Soroka CJ, Boyer JL. The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II. *J Clin Invest*. 2002;110(7):965-972.
17. Cassio D, Macias RI, Grosse B, Marin JJ, Monte MJ. Expression, localization, and inducibility by bile acids of hepatobiliary transporters in the new polarized rat hepatic cell lines, Can 3-1 and Can 10. *Cell Tissue Res*. 2007;330(3):447-460.
18. Harris MJ, Kagawa T, Dawson PA, Arias IM. Taurocholate transport by hepatic and intestinal bile acid transporters is independent of FIC1 overexpression in Madin-Darby canine kidney cells. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004;19(7):819-825.
19. Mita S, Suzuki H, Akita H, et al. Vectorial transport of bile salts across MDCK cells expressing both rat Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide and rat bile salt export pump. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(1):G159-167.
20. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*. 1986;103(3):755-766.
21. Bender V, Buschlen S, Cassio D. Expression and localization of hepatocyte domain-specific plasma membrane proteins in hepatoma × fibroblast hybrids and in hepatoma dedifferentiated variants. *J Cell Sci*. 1998;111(Pt 22):3437-3450.
22. Mahdi ZM, Synal-Hermanns U, Yoker A, Locher KP, Stieger B. Role of multidrug resistance protein 3 in antifungal-induced cholestasis. *Mol Pharmacol*. 2016;90(1):23-34.
23. Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, et al. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet*. 1998;20(3):233-238.
24. Csanady L. Degenerate ABC composite site is stably glued together by trapped ATP. *J Gen Physiol*. 2010;135(5):395-398.
25. Quan Y, Jin Y, Faria TN, et al. Expression profile of drug and nutrient absorption related genes in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells grown under differentiation conditions. *Pharmaceutics*. 2012;4(2):314-333.
26. Cai SY, Wang L, Ballatori N, Boyer JL. Bile salt export pump is highly conserved during vertebrate evolution and its expression is inhibited by PFIC type II mutations. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;281(2):G316-322. Cai SY and Wang L shared co-first authorship
27. Vertex Pharmaceuticals. Annex I: summary of product characteristics: Kalydeco 150 mg film-coated tablets. 2017. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002494/WC500130696.pdf
28. Liu F, Zhang Z, Levit A, et al. Structural identification of a hotspot on CFTR for potentiation. *Science (New York, NY)*. 2019;364(6446):1184-1188.
29. Eckford PD, Li C, Ramjeesingh M, Bear CE. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *J Biol Chem*. 2012;287(44):36639-36649.
30. Jih KY, Hwang TC. VX-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(11):4404-4409.
31. Cui G, McCarty NA. Murine and human CFTR exhibit different sensitivities to CFTR potentiators. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015;309(7):L687-L699.
32. Cui G, Stauffer BB, Imhoff BR, et al. VX-770-mediated potentiation of numerous human CFTR disease mutants is influenced by phosphorylation level. *Sci Rep*. 2019;9(1):13460.
33. Lingam S, Thonghin N, Ford RC. Investigation of the effects of the CFTR potentiator ivacaftor on human P-glycoprotein (ABCB1). *Sci Rep*. 2017;7(1):17481.
34. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*. 2015;373(3):220-231.

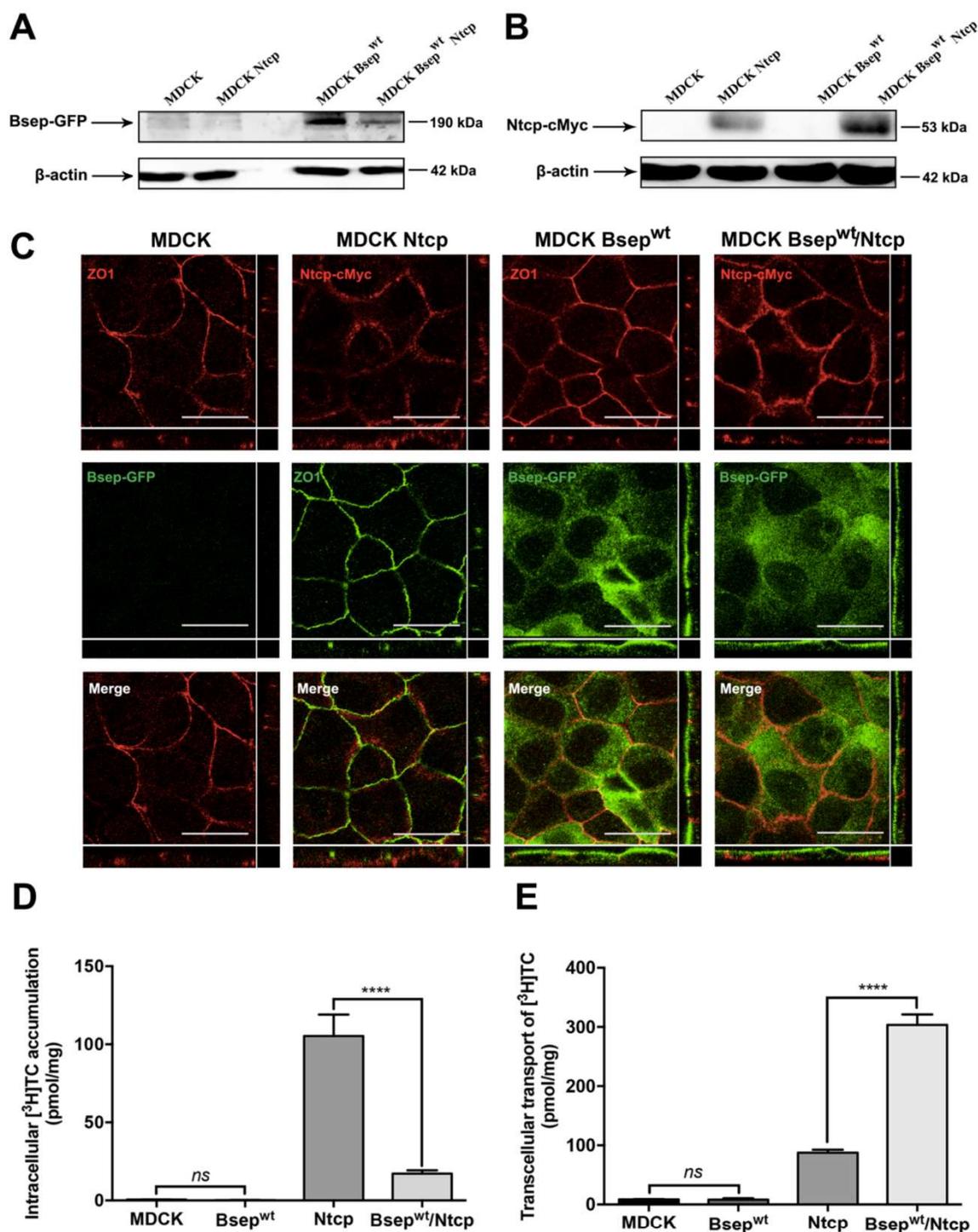
SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

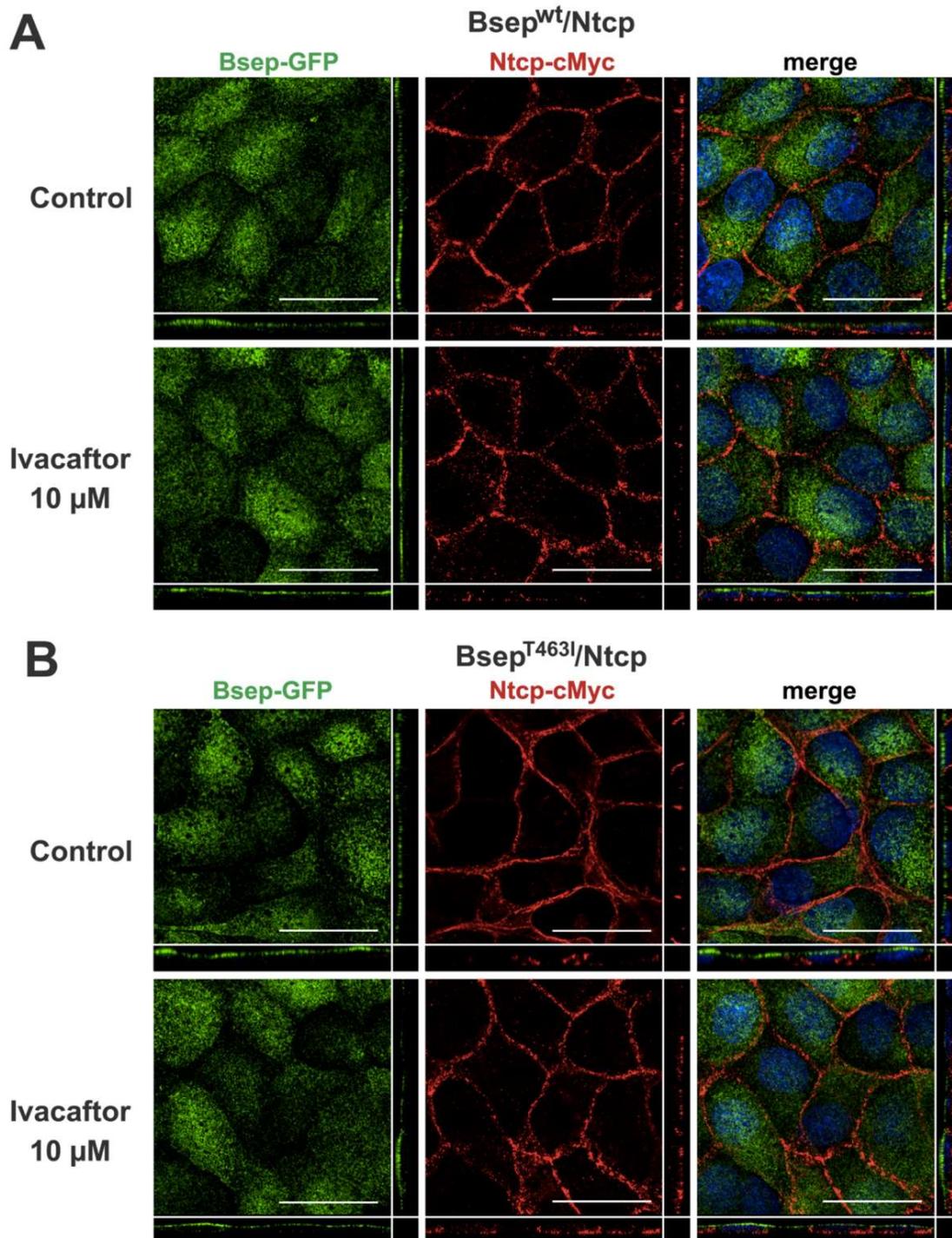
How to cite this article: Mareux E, Lapalus M, Amzal R, et al. Functional rescue of an ABCB11 mutant by ivacaftor: A new targeted pharmacotherapy approach in bile salt export pump deficiency. *Liver Int*. 2020;00:1-9. <https://doi.org/10.1111/liv.14518>



Supporting Figure S1. Alignment of the nucleotide-binding domains NBD1 and NBD2 of ABCB11 (BSEP-isoform 1, Uniprot O95342), ABCC7 (CFTR-isoform 1, Uniprot P13569), ABCB4 (MDR3-isoform 2, Uniprot P21439-2) and MJ08796 (pdb 1L2T). The sequence alignment was made and refined manually using SeaView¹, considering the conserved hydrophobic positions highlighted after structural alignment of ABC NBD known 3D structures. This one was deduced as made previously², after superimposition of the whole set of known 3D structures of ABC NBDs, of which MJ08796 (pdb 1L2T), CFTR NBD1 (pdb 1R0Z) and CFTR NBD2 (pdb 3GD7). Alignment rendering was made using ESPRIT³. Sequence identities are reported on a black background, whereas similarities are reported in colors (green: hydrophobic, orange: aromatic, blue: basic, red: acidic, yellow: small or loop-forming). On top are reported the secondary structures, as observed in the experimental 3D structure of MJ0796, which has served as a template for the modeling of the NBD1/NBD2 heterodimer of ABCB11. The position of the p.T463I mutation is indicated by a yellow square.



Supporting Figure S2. Characterization of MDCK clones and taurocholate transport activity assay in a MDCK monolayer system. (A-B) Control MDCK parental cells and MDCK clones stably expressing Bsep^{wt}-GFP and Ntcp-cMyc were lysed and analyzed by immunoblotting using anti-GFP (A) and anti-cMyc (B) antibodies. β-actin was used as a loading control. (C) Immunolocalization by confocal microscopy of Bsep^{wt}-GFP, Ntcp-cMyc and ZO1 in control MDCK parental cells and MDCK clones. *Bottom, center and right* panels show *x-z, x-y and y-z* plane images, respectively. Original magnification: 60X. Bars: 10 μm. (D) Intracellular [³H]TC accumulation and (E) Vectorial transport of [³H]TC in control MDCK parental cells and MDCK clones expressing Bsep^{wt}, Ntcp or Bsep^{wt}/Ntcp. Results are means ± SEM of at least three experiments. *ns*: not significant; **** *p* < 0.0001 (one-way ANOVA).



Supporting Figure S3. Effect of ivacaftor treatment on the morphology of MDCK cells and distribution of Bsep and Ntcp. After treatment with DMSO (Control) \pm 10 μ M ivacaftor for 2 hours, Bsep^{wt}-GFP (A, green), BSEP^{T463I}-GFP (B, green) and Ntcp-cMyc (A-B, red) were immunolocalized in MDCK cells by confocal microscopy. Nuclei (blue) are shown in the merged pictures. Bottom, center and right panels show *x-z*, *x-y* and *y-z* plane images, respectively. Original magnification: 60X. Bars: 10 μ m.

Supporting References

1. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 2010;27:221-224.
2. Callebaut I, Eudes R, Mornon JP, Lehn P. Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modeling of the heterodimer. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:230-242.
3. Robert X, Gouet, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 2014;42:W320-W324.

Letter to the editor

1
2 ***In vitro* functional rescue by ivacaftor of an ABCB11 variant involved in PFIC2 and**
3
4 **intrahepatic cholestasis of pregnancy**
5
6

7
8 Elodie Mareux¹, Martine Lapalus¹, Amel Ben-Saad¹, Isabelle Callebaut², Thomas Falguières¹,
9
10 Emmanuel Gonzales^{1,3}, Emmanuel Jacquemin^{1,3,*}
11
12

13
14 ¹ Inserm, Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie, UMR_S 1193, Université
15 Paris-Saclay, Hepatinov, 91400 Orsay, France.
16

17
18 ² Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de
19 Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, 75005 Paris, France.
20

21
22 ³ Paediatric Hepatology and Paediatric Liver Transplant Department, National Reference
23 Center for Rare Paediatric Liver Diseases, FILFOIE, ERN RARE LIVER, Assistance Publique-
24 Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine Paris-Saclay, CHU Bicêtre, 94270 Le Kremlin-Bicêtre,
25 France.
26
27

28
29 * **Corresponding author:** Professeur Emmanuel Jacquemin, MD, PhD – Service d'Hépatologie
30 et de transplantation hépatique pédiatriques – Hôpital Bicêtre – 78, rue du Général Leclerc –
31 Le Kremlin Bicêtre – 94275 cedex, France. Phone: +33-(0)1-45-21-31-68; Fax:
32 +33-(0)1-45-21-28-16; e-mail: emmanuel.jacquemin@aphp.fr
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
61
62
63
64
65

Abstract

1
2 **Background:** *ABCB11* variations are responsible for a spectrum of rare liver diseases,
3
4 including progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) and intrahepatic
5
6 cholestasis of pregnancy (ICP). Current medical treatment of these conditions mostly relies on
7
8 ursodeoxycholic acid with limited efficacy. We report on the *in vitro* study of the p.A257V
9
10 missense variant of *ABCB11* identified in a PFIC2 patient and in her mother who experienced
11
12 ICP.
13
14

15
16 **Results:** The Ala257 residue is located outside the ATP-binding site of *ABCB11*. We show
17
18 that the p.A257V variant of *ABCB11* is correctly expressed at the canalicular membrane of
19
20 HepG2 cells but that its function significantly decreased when studied in MDCK cells. This
21
22 functional defect can be fully rescued by Ivacaftor.
23
24

25
26 **Conclusion:** Ivacaftor could be considered as a new pharmacological tool able to respond to
27
28 an unmet medical need for patients with ICP and PFIC2 due to *ABCB11* variations affecting
29
30 *ABCB11* function, even when the residue involved is not located in an ATP-binding site of
31
32 *ABCB11*.
33
34

35
36 **Keywords:** BSEP, cholestasis, VX-770, potentiator, ABC transporters superfamily,
37
38 paediatrics.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

To the editor:

1
2
3 Variations in ATP-binding cassette subfamily B member 11 gene (*ABCB11*), also known as
4
5 bile salt export pump (BSEP), encompass a spectrum of diseases ranging from progressive
6
7 familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) to intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP).
8
9
10 Recently, we have shown that ivacaftor (VX-770), an ABC transporter potentiator with a
11
12 marketing authorization in cystic fibrosis (Kalydeco®), was able to rescue the functional defect
13
14 due to the Abcb11-T463I variant located in an ATP-binding site and identified in a PFIC2
15
16 patient.¹ In line with these results, we investigated here the Abcb11-A257V variant. We have
17
18 previously reported that a compound heterozygous PFIC2 girl, harbouring this p.A257V
19
20 variation of *ABCB11* on one allele, had a mother, heterozygous for this *ABCB11* variation, who
21
22 experienced ICP.² Here, we report that the p.A257V variation may lead to an impaired function
23
24 of the transporter, thus supporting the role of this *ABCB11* variation in the pathogenesis of ICP
25
26 and PFIC2. The Ala257 residue is located outside ATP-binding sites, in the fourth
27
28 transmembrane (TM) helix of ABCB11, at the level of the lateral opening of the translocation
29
30 cavity to the membrane inner leaflet observed in the inward-facing conformation of the
31
32 transporter (Panel A). The p.A257V variation of *ABCB11* is predicted as “possibly
33
34 damaging/deleterious” by Polyphen2³, SNAP2⁴ and PROVEAN⁵ and as “disease-causing” by
35
36 MutationTaster⁶.

37
38
39
40
41
42
43
44
45
46 The Ala>Val variation does not drastically change the polarity and steric hindrance of this
47
48 region of the transporter. However, it is located in a region that has been observed in human
49
50 Pgp/ABCB1 to undergo a local conformational change, from a flexible disordered state in the
51
52 inward-facing conformation to a continuous helix in the outward-facing one.⁷ Interestingly,
53
54 Ala>Val mutation in a similar TM4 position within *Cyanidioschyzon merolae* ABCB1 has been
55
56 shown to diminish transport activity.⁸ Moreover, when we superimpose the 3D structures of the
57
58
59
60
61
62
63
64
65

RESULTATS

1 two halves of ABCB11, we observe that Ala257 in TM4 stands at analogous positions than
2 Thr919 in TM10 (Figure S1), an amino acid for which mutation has been associated with benign
3 recurrent intrahepatic cholestasis type 2.⁹ In addition, this region of TM4/TM10 is flexible
4 between the two transporter halves (Figure S1). This suggests that both residues may play a
5 critical role in the ABCB11 local conformational changes between the inward- and outward-
6 facing states and may thus indirectly impact its function. Indeed, although Abcb11-A257V
7 variant appears as a mature protein (Panel B; quantification in Panel C) correctly targeted to
8 the canalicular/apical membrane when expressed in HepG2 cells and MDCK cells (Panels D-
9 E), it displays a transport activity defect (Panel F). In MDCK cells co-expressing Abcb11 at the
10 apical membrane and sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (Ntcp) at the basolateral
11 membrane, we observed that the p.A257V variant retains only 68 % of wild type taurocholate
12 transport activity (Panel F). This decreased activity due to the p.A257V variation may therefore
13 explain a PFIC2 phenotype when associated with another deleterious *ABCB11* variation.² In a
14 heterozygous state, this residual activity may be sufficient to ensure a satisfying level of biliary
15 bile acid secretion in physiological conditions, excluding pregnancy. However, during
16 pregnancy, the high level of circulating female sex hormones and metabolites can modify
17 ABCB11 expression by repressing *ABCB11* transcription and decreasing normal allele
18 expression.¹⁰ This could have favoured the transient decompensation of the p.A257V
19 heterozygous state leading to ICP.¹¹

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 So far, the efficiency of ivacaftor on ABCB11 variants involving residues localized outside
48 ATP-binding sites has not been demonstrated. However, since ivacaftor is approved in selected
49 cystic fibrosis patients harbouring cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
50 variations localized inside and outside ATP-binding sites¹², similar effects might be considered
51 for such types of *ABCB11* variations. Indeed, we report here that ivacaftor, even at low
52 concentration (0.5 $\mu\text{mol/L}$), rescues the function of the Abcb11-A257V variant, increasing its
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 transport activity, back to the one of Abcb11 wild type (Panel F). These results are in line with
2 previous reports showing that ivacaftor potentiation mechanism could also be independent of
3
4 both ATP-binding and nucleotide binding domain dimerization.¹³ It is also important to note
5
6 that ivacaftor does not significantly modify the function of wild type Abcb11, as we recently
7
8 reported.¹ Moreover, ivacaftor has been shown to rescue the channel activity of wt and mutated
9
10 ABCC7/CFTR at subnanomolar concentrations in patch-clamp experiments,¹⁴ suggesting that
11
12 it might be used at low doses in patients.
13
14

15
16
17 Based on these *in vitro* studies, including the present one, ivacaftor might thus be expected to
18
19 result in clinical benefit in ICP and PFIC2 patients carrying missense *ABCB11* variations, such
20
21 as p.T463I and p.A257V, on at least one allele. In addition, it has been reported that at least 5
22
23 % of women experiencing ICP may harbour a heterozygous *ABCB11* variation.¹⁵ Due to limited
24
25 data during pregnancy, it is currently recommended to avoid or discontinue ivacaftor in
26
27 pregnant women.¹⁶ However, uncomplicated pregnancies have been reported in women with
28
29 cystic fibrosis and treated with ivacaftor, leading to the birth of healthy neonates.¹⁶ These
30
31 reports suggest that ivacaftor could be used safely in pregnant women experiencing ICP.
32
33 However, further studies are needed to support the use of ivacaftor in pregnant women. So far,
34
35 ursodeoxycholic acid is the most commonly used and admitted treatment for ICP and remains
36
37 the first-line therapy even if it is a matter of debate.¹⁷ The present *in vitro* data constitute a proof
38
39 of concept that ivacaftor has therapeutic potential for selected patients with PFIC2 and ICP
40
41 caused by *ABCB11* missense variations affecting the function of the transporter. Considering
42
43 that there is an unmet medical need for patients with BSEP deficiency, this could represent a
44
45 significant step forward for the care of such selected patients.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **List of abbreviations:** ABCB11, ATP-binding cassette subfamily B member 11; ICP,
2 intrahepatic cholestasis of pregnancy; PFIC2, progressive familial intrahepatic cholestasis
3
4 type 2.
5
6

7
8 **Declaration**
9

10
11 **Ethics approval and consent to participate:** Not applicable.
12

13
14 **Consent for publication:** Not applicable.
15

16
17 **Availability of data and materials:** The datasets used and/or analysed during the current study
18 are available from the corresponding author on reasonable request.
19

20
21 **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.
22

23
24 **Funding:** E.M. and A.B.S. were supported by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de
25 la Recherche et de l’Innovation”.
26
27

28
29 **Authors’ contributions:** EM, ML, EG and EJ conceived and designed the study. EM, ML
30 carried out the experiments. EM, ML, ABS, IC, TF, EG and EJ analyzed the data and provided
31 significant intellectual contribution. EM, EG and EJ wrote the manuscript and designed the
32 figures with input from all authors. All the authors contributed to the critical reviewing of the
33 manuscript and approved the final version.
34
35

36
37 **Acknowledgements:** We thank AMFE (Association Maladie Foie Enfants, Malakoff, France),
38 MLD (Monaco Liver Disorder, Monaco), Association “Pour Louis 1000 Foie Merci”
39 (Fournet-Luisans, France), Fondation Rumsey-Cartier (Genève, Switzerland) and FILFOIE
40 (Paris, France) for their support. We thank Sophie Bombard (CNRS UMR9187, INSERM
41 U1196, Institut Curie, PSL Research University, 91405 Orsay, France) for her technical
42 support. We are also grateful to Florent Di Meo (Inserm, Université de Limoges, UMR 1248
43 IPPRITT, Limoges, France) for fruitful discussion about the 3D structure of ABCB11.
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

References

Author names in bold designate shared co-first authorship

[1] **Mareux E, Lapalus M**, Amzal R, Almes M, Ait-Slimane T, Delaunay JL, *et al.* Functional rescue of an ABCB11 mutant by ivacaftor: A new targeted pharmacotherapy approach in bile salt export pump deficiency. *Liver Int* 2020;40:1917-1925.

[2] Gonzales E, Grosse B, Schuller B, Davit-Spraul A, Conti F, Guettier C, *et al.* Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology* 2015;62:558-566.

[3] PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>. Accessed 5 July 2021.

[4] SNAP² Predicting functional effects of sequence variants. <https://www.rostlab.org/services/snap>. Accessed 5 July 2021.

[5] PROVEAN. <http://provean.jcvi.org/index.php>. Accessed 5 July 2021.

[6] Mutation Taster. <http://www.mutationtaster.org>. Accessed 5 July 2021.

[7] Kim Y, Chen J. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science*. 2018;359:915-919.

[8] **Kodan A, Yamaguchi T**, Nakatsu T, Sakiyama K, Hipolito CJ, Fujioka A, *et al.* Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:4049-54.

[9] Wang L, Hou WT, Chen L, Jiang YL, Xu D, Sun L, *et al.* Cryo-EM structure of human bile salts exporter ABCB11. *Cell Res* 2020;30:623-625.

[10] **Song X, Vasilenko A**, Chen Y, Valanejad L, Verma R, Yan B, *et al.* Transcriptional dynamics of bile salt export pump during pregnancy: mechanisms and implications in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Hepatology* 2014;60:1993-2007.

1 [11] Jacquemin E, Cresteil D, Manouvrier S, Boute O, Hadchouel M. Heterozygous non-sense
2 mutation of the MDR3 gene in familial intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Lancet*
3
4 1999;353:210-211.
5

6 [12] KALYDECO prescribing information. https://pi.vrtx.com/files/uspi_ivacaftor.pdf.
7
8 Accessed 5 July 2021.
9

10 [13] Eckford PD, Li C, Ramjeesingh M, Bear CE. Cystic fibrosis transmembrane conductance
11 regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant
12 CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *J Biol Chem*
13 2012;287:36639-36649.
14

15 [14] Csanády L, Töröcsik B. Cystic fibrosis drug ivacaftor stimulates CFTR channels at
16 picomolar concentrations. *Elife* 2019;8:e46450.
17

18 [15] **Dixon PH, Williamson C.** The pathophysiology of intrahepatic cholestasis of pregnancy.
19 *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2016;40:141-153.
20

21 [16] Ladores S, Bray LA, Brown J. Two Unanticipated Pregnancies While on Cystic Fibrosis
22 Gene-Specific Drug Therapy. *J Patient Exp* 2020;7:4-7.
23

24 [17] **Ovadia C, Sajous J,** Seed PT, Patel K, Williamson NJ, Attilakos G, *et al.* Ursodeoxycholic
25 acid in intrahepatic cholestasis of pregnancy: a systematic review and individual participant
26 data meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2021:S2468-1253(21)00074-1.
27

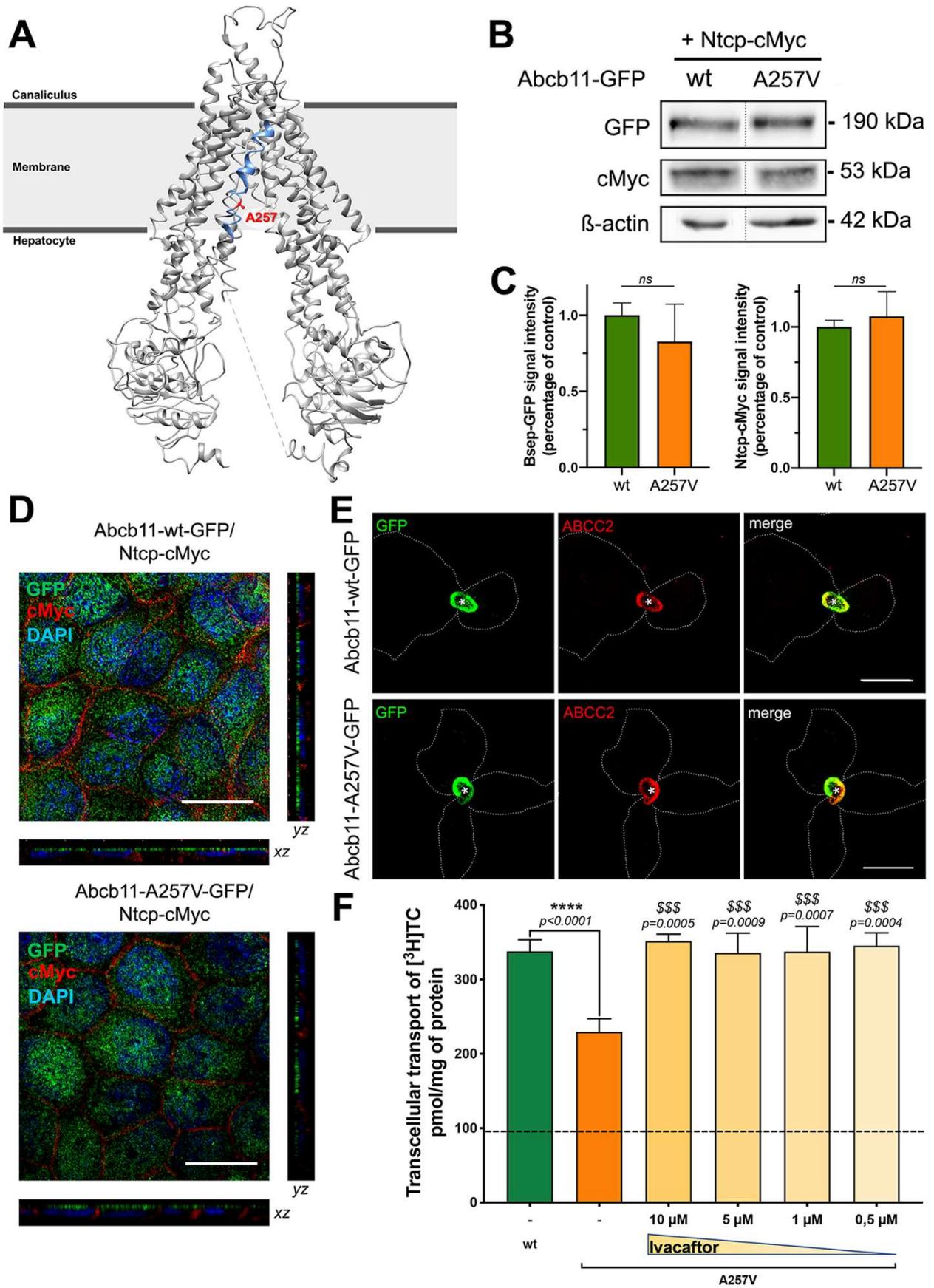
28 [18] Structure of human bile salt exporter ABCB11. <https://www.rcsb.org/structure/6LR0>.
29
30 Accessed 5 July 2021.
31

Figure legend

1
2
3
4 **Characterisation of the p.A257V variant of ABCB11 and effect of ivacaftor on**
5 **taurocholate (TC) transport activity.** (A) Structure of wild type (wt) human ABCB11 in an
6 inward-open state solved at 3.5 Å using cryogenic electron microscopy (PDB ID: 6LR0¹⁸). The
7 fourth transmembrane helix (TM4) is colored in blue and the Ala257 residue is depicted in red.
8
9
10 (B) MDCK cells stably expressing Abcb11-GFP (wt or A257V) and Ntcp-cMyc were lysed and
11 analysed by immunoblotting. This panel is representative of at least six independent
12 experiments. (C) Electrophoretic patterns from B were separately quantified and their relative
13 amounts were calculated and normalized to β-actin. Results are means (± SEM) of at least three
14 experiments. *ns*: not significant (Student *t* test). (D) Abcb11-GFP (wt or A257V) and Ntcp-
15 cMyc were stably expressed in MDCK cells. After immunolabelling, Abcb11 (green) and Ntcp
16 (red) were visualized by confocal microscopy. Bottom, centre and right panels show *x-z*, *x-y*
17 and *y-z* plane images, respectively. Bars: 10 μm. (E) Abcb11-wt-GFP and Abcb11-A257V-GFP
18 were transiently expressed in HepG2 cells. After immunolabelling, Abcb11 (green) and
19 ABCC2 (red) were visualised by confocal microscopy. *Bile canaliculus. Bars: 10 μm. (F)
20 Vectorial transport of [³H]TC in MDCK cells stably expressing Abcb11 (wt or A257V) and
21 Ntcp in the absence (-) or presence of the indicated concentrations of ivacaftor. The dashline
22 indicates [³H]TC transport measured in MDCK cells expressing Ntcp alone. Means (± SEM)
23 of at least six independent experiments for each tested condition are shown. *****P* < .0001 *vs*
24 wt; and ^{ss}*P* < .01 ^{sss}*P* < .005 *vs* non-treated A257V cells (one-way ANOVA).
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
61
62
63
64
65

Figure

[Click here to access/download;Figure;Mareux et al Figure.tif](#)



Letter to the editor

***In vitro* functional rescue by ivacaftor of an ABCB11 variant involved in PFIC2 and
intrahepatic cholestasis of pregnancy**

Elodie Mareux¹, Martine Lapalus¹, Amel Ben-Saad¹, Isabelle Callebaut², Thomas Falguières¹,
Emmanuel Gonzales^{1,3}, Emmanuel Jacquemin^{1,3,*}

¹ Inserm, Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie, UMR_S 1193, Université Paris-Saclay, Hepatinov, 91400 Orsay, France.

² Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, IMPMC, 75005 Paris, France.

³ Paediatric Hepatology and Paediatric Liver Transplant Department, National Reference Center for Rare Paediatric Liver Diseases, FILFOIE, ERN RARE LIVER, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine Paris-Saclay, CHU Bicêtre, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France.

* **Corresponding author:** Professeur Emmanuel Jacquemin, MD, PhD – Service d'Hépatologie et de transplantation hépatique pédiatriques – Hôpital Bicêtre – 78, rue du Général Leclerc – Le Kremlin Bicêtre – 94275 cedex, France. Phone: +33-(0)1-45-21-31-68; Fax: +33-(0)1-45-21-28-16; e-mail: emmanuel.jacquemin@aphp.fr

Table of contents

Supplementary Materials and Methods	2
<i>Patient, DNA construct and mutagenesis</i>	2
<i>Cell culture, transfection, lentiviral infection and immunoanalysis</i>	2
<i>Taurocholate transport assay and ivacaftor treatment</i>	2
<i>Statistical analyses</i>	3
Supplementary Figure S1	4
Supplementary References	5

Supplementary Materials and Methods

Patient, DNA construct and mutagenesis

General information regarding the patients and *ABCB11* gene analysis have been previously reported.^{1,2} The C-terminus green fluorescent protein (GFP) plasmids encoding wild type (wt) and A257V missense variant of Abcb11 have been described, as well as the C-terminus cMyc plasmid encoding Ntcp.^{2,3,4}

Cell culture, transfection, lentiviral infection and immunoanalysis

Abcb11-encoding vectors (wt and A257V) were transiently transfected in HepG2 cells as published.⁴ Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells were transfected, then stable transfected clones were sorted as described.^{3,4} MDCK clones with the highest Abcb11-GFP (wt or A257V) expression and parental MDCK cells were infected with lentiviral particles containing the Ntcp recombinant plasmid as described.^{3,4} Immunofluorescence and immunoblotting analyses were performed as described,³ using the following primary antibodies: rat monoclonal anti-cMyc (Clone JAC6; GeneTex, Irvine, CA), rabbit polyclonal anti-GFP (ab290; Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-ABCC2 (clone M2I-4; Enzo life Sciences, Villeurbanne, France), mouse monoclonal anti-GFP (clone 7.1 and 13.1; Roche Diagnostics, Mannheim, DE), anti-cMyc (Clone 9E10; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) and anti- β -actin (clone AC-15; Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO). Peroxydase- and fluorochrome-conjugated secondary antibodies were from GE Healthcare (Chicago, IL) and Molecular Probes/ThermoFisher Scientific (Illkirch, France), respectively.

Taurocholate transport assay and ivacaftor treatment

Measurement of Abcb11-mediated taurocholate (TC) secretion was performed as described.³ In brief, culture medium was replaced by pre-warmed transport buffer in apical and basal

compartments, in the absence or presence of 0.5 to 10 $\mu\text{mol/L}$ ivacaftor (S1144, Selleck Chemicals, Munich, DE). [^3H]TC was added in the basal compartment. After two hours, the apical buffer was collected and transcellular transport of [^3H]TC was calculated from the radioactivity present in the apical buffer. Transport data were normalized to protein amounts determined by BiCinchoninic acid Assay (QuantiPro™ BCA Assay Kit, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO).

Statistical analyses

Data are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using Student *t* test and one-way ANOVA. A *P* value $< .05$ was considered to be significant.

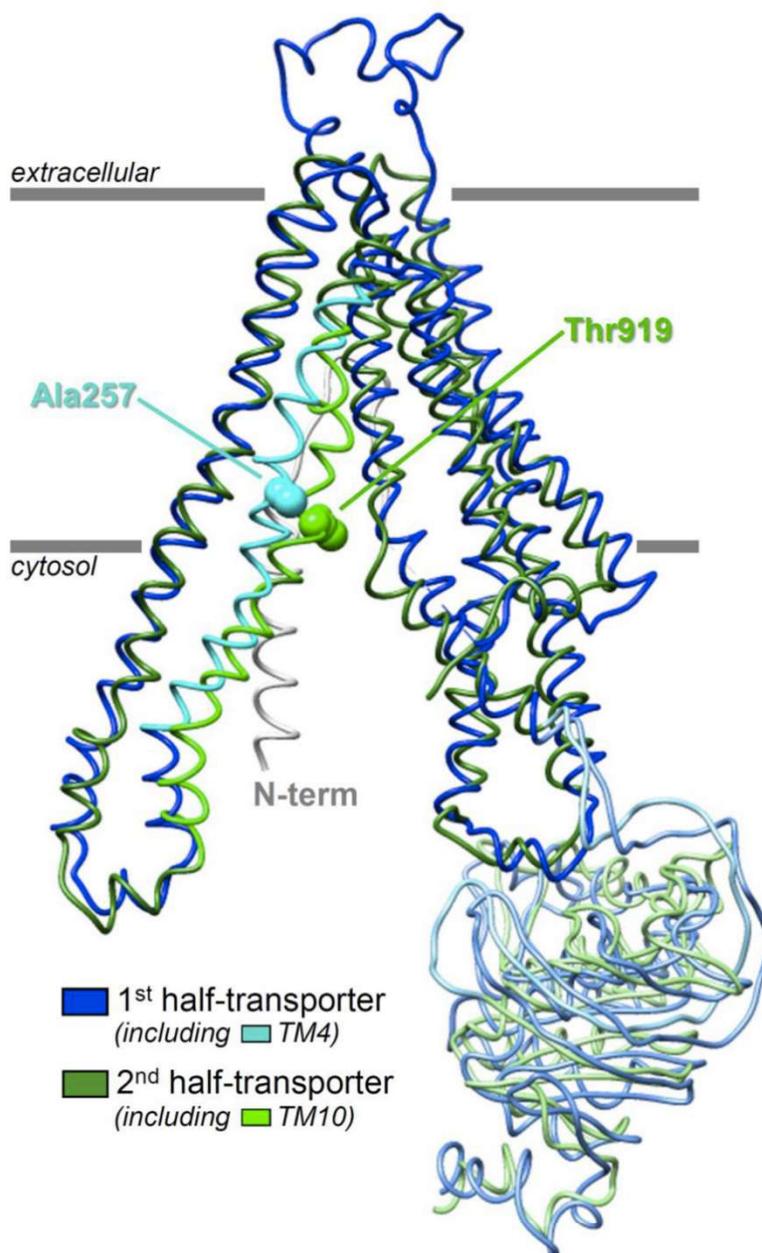


Figure S1: Superimposition of the two transporter halves of the 3D structure of ABCB11. The two transporter halves of the 3D structure of ABCB11 (pdb entry: 6LR0) were split and superimposed using UCSF Chimera.⁵ The two transporter halves are indicated in different colors, as well as the residues Ala257 and Thr919 in TM4 and TM10, respectively.

Supplementary References

- [1] Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, Baussan C, Gonzales E, Stieger B, *et al.* ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 2010;51:1645-5165.
- [2] Gonzales E, Grosse B, Schuller B, Davit-Spraul A, Conti F, Guettier C, *et al.* Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology*. 2015;62:558-566.
- [3] Mareux E, Lapalus M, Amzal R, Almes M, Ait-Slimane T, Delaunay JL, *et al.* Functional rescue of an ABCB11 mutant by ivacaftor: A new targeted pharmacotherapy approach in bile salt export pump deficiency. *Liver Int* 2020;40:1917-1925.
- [4] Amzal R, Thébaut A, Lapalus M, Almes M, Grosse B, Mareux E, *et al.* Pharmacological premature termination codon readthrough of ABCB11 in bile salt export pump deficiency: an in vitro study. *Hepatology* 2020;73:1449-1463.
- [5] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25:1605-1612.

- En préparation -

**In vitro rescue of the bile acid transport function of ABCB11 variants by CFTR
potentiators**

Elodie Mareux¹, Martine Lapalus¹, Amel Ben Saad¹, Mounia Lakli¹, Tounsia Aït-Slimane²,
Jean-Luc Decout³, Isabelle Callebaut⁴, Thomas Falguières¹, Emmanuel Jacquemin^{1,5},
Emmanuel Gonzales^{1,5}

¹Inserm UMR_S1193, Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie, Université Paris-Saclay, Hepatinov, 91400 Orsay, France.

²Inserm UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Sorbonne Université, 75012 Paris, France.

³Université de Grenoble Alpes, CNRS, DPM, 38000, Grenoble, France.

⁴UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75005 Paris, France

⁵APHP CHU Bicêtre, Service d'hépatologie et transplantation hépatique pédiatrique, Centre de référence national des maladies pédiatriques rares du foie, FILFOIE, ERN RARE LIVER, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France.

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

Text electronic word count: 3248

Figures: 5; Table: 1

Supporting information: 1 table

Authors' contributions EM, EJ and EG conceived and designed the study. EM carried out the experiments. EM, ML, ABS, ML, TAS, JLD, IC, TF, EG and EJ analyzed the data and provided significant intellectual contribution. EM, EJ and EG wrote the manuscript and designed the figures with input from all authors. All the authors contributed to the critical reviewing of the manuscript and approved the final version.

Conflict of interest: None

Funding: EM, ABS and ML were supported by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation”. TF and TAS were financially supported by FILFOIE.

Availability of data and materials: The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgements We thank AMFE (Association Maladie Foie Enfants, Malakoff, France), MLD (Monaco Liver Disorder, Monaco), Association “Pour Louis 1000 Foie Merci” (Fournet-Luisans, France), Fondation Rumsey-Cartier (Genève, Switzerland) and FILFOIE (Paris, France) for their support. We thank Sophie Bombard (CNRS UMR9187, INSERM U1196, Institut Curie, PSL Research University, 91405 Orsay, France) for her technical support.

Abstract

Background: ABCB11 is expressed at the canalicular membrane of hepatocytes and is responsible for biliary bile acid secretion. Variations in the *ABCB11* gene cause a spectrum of rare liver diseases. The most severe form is progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2). Current medical treatments of these conditions have limited efficacy. Here we report the *in vitro* study of Abcb11 missense variants identified in PFIC2 patients and their functional rescue by CFTR potentiators.

Methods: Three ABCB11 disease-causing variations have been identified in PFIC2 patients and studied by 3D structure modelling (*i.e.* A257V, T463I and G562D). The variations were reproduced in a plasmid encoding a rat Bsep-green fluorescent protein. After transfection, the expression and localization of the variants were studied in HepG2 cells. Taurocholate transport activity and potentiators effect were studied in Madin-Darby canine kidney (MDCK) clones co-expressing Abcb11 and the rat sodium-taurocholate co-transporting polypeptide (Ntcp/*Slc10A1*).

Results: As predicted by 3D structure modelling, the three variants were correctly expressed at the canalicular membrane of HepG2 cells but had a defective function when studied in MDCK cells. Ivacaftor, GLP1837, SBC040 and SBC219 potentiators increased bile acid transport of the three Abcb11 missense variants. In addition, a synergic effect was observed when ivacaftor was combined with SBC040 or SBC219.

Conclusion: Such potentiators could represent new pharmacological approach for improving the condition of patients with ABCB11 deficiency due to missense variations affecting the function of the transporter.

Keywords: BSEP, cholestasis, VX-770, potentiators, ABC transporters, paediatrics.

Introduction

The bile salt export pump (ABCB11/BSEP) is an ATP-binding cassette (ABC) transporter localized at the apical (or canalicular) plasma membrane of hepatocytes. It allows normal bile flow through its essential function of biliary bile acid (BA) secretion.¹ Like other members of the ABC transporters superfamily, ABCB11 is composed of two membrane spanning domains (MSDs) that confer substrate specificity and provide the translocation paths for ligands, and two nucleotide-binding domains (NBDs) involved in binding and hydrolysing ATP, thus providing energy for the active transport of BAs.^{2, 3} However, ABCB11 has an asymmetric nucleotide-binding sites (NBS), NBS-a being degenerated and expected to be catalytically inactive, with long-term ATP-binding at the NBD interface.⁴

Dysfunction of ABCB11 leads to cholestatic liver diseases, the most severe form being progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2), which is a rare autosomal recessive disease affecting patients harbouring a homozygous or a compound heterozygous status for *ABCB11* variations early during childhood.^{1, 3} It is characterized by a decreased bile flow, BA accumulation in hepatocytes, ongoing hepatocellular damages, and an increased risk of hepatocellular carcinoma. Clinical signs of cholestasis usually appear within the first months of life with jaundice and pruritus. Medical therapy with ursodeoxycholic acid (UDCA) and surgical therapy such as biliary diversion may provide some symptomatic relief. Nevertheless, none of these treatments is curative, and liver transplantation is required before adulthood for the two thirds of PFIC2 patients.^{1, 5} This lack of effective treatment options highlights the need to identify new targeted pharmacotherapies as an alternative to liver transplantation for patients with severe forms of ABCB11-related diseases.

At present, nearly 300 distinct variations of the *ABCB11*-encoding gene have been identified (<https://evs.gs.washington.edu/EVS/> and <http://abcmutations.hegelab.org/>), including nonsense, missense, and splicing variations, small insertions, deletions, and duplications.⁵⁻⁹ In

a recent series reporting on 264 patients with *ABCB11* variations, 208 (78 %) carried at least one missense variation.⁵ They can affect the traffic, the function, and/or the stability of the transporter. For the latter two possibilities, a specific targeted pharmacotherapy could be proposed, by using potentiators able to enhance the residual function of the transporter that is correctly localized to the bile canaliculi but not or less functional. We have recently shown *in vitro* the effectiveness of this strategy on an *Abcb11* missense variant. Ivacaftor (VX-770, Kalydeco[®]), a clinically approved potentiator treatment for cystic fibrosis patients with some class III *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *ABCC7*) variations, was able to potentiate the function of the *Abcb11*-T463I variant.¹⁰ In the present study, we characterized another *ABCB11* variants (G562D) and, in a repositioning strategy, we evaluated the effect of other *CFTR* potentiators (GLPG1837, SBC040 and SBC219) shown to rescue the functional defect of the G551D variant of *CFTR*.^{11, 12} As the T463I variant, the A257V and G562D variants were correctly targeted to the canalicular membrane but displayed a BA transport function defect. A stability defect could be correlated with the functional defect also observed with the A257V variant. In this context, the different tested *CFTR* potentiators were able to correct the functional defect of all three *Abcb11* missense variants investigated in the present study.

Materials and Methods

Patient's data and molecular modelling

General information regarding the patients and *ABCB11* gene analysis have been previously reported and are summarized in Table 1.^{6, 10, 13} The 3D structure of ABCB11 in the inward-facing conformation was available (pdb 6LR0).¹⁴ The model of the 3D structure of the ABCB11 NBD1/NBD2 assembly was built with Modeller v9.15¹⁵ using the experimental structure of ABCB1 in the outward-facing conformation, determined by cryo-electron microscopy at 3.4 Å and with the NBD1/NBD2 dimer in complex with ATP as a template (pdb 6c0v).¹⁶

DNA constructs and mutagenesis

The C-terminus green fluorescent protein (GFP) plasmids encoding wild type (wt) and missense variants (A257V and T463I) of *Abcb11* have been described, as well as the C-terminus cMyc plasmid encoding *Ntcp*.^{10, 13} The primers used for G562D mutagenesis were: 5'- AGGCCAGATGAGTGGT**GAT**CAGAAGCAAAGAGTAG-3' (forward) and 5'- CTACTCTTTGCTTCT**GAT**CACCACTCATCTGGCCT-3' (reverse).

Cell culture, transfection, lentiviral infection and immunoanalysis

Abcb11-encoding vectors (wt, A257V, T463I or G562D) were transiently transfected in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells as published.¹⁷ These cells form pseudo-bile canaliculi in culture and allow localization studies.¹⁸ Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells were transfected, then stable transfected clones were sorted as described.¹⁰ MDCK clones with the highest *Abcb11*-GFP (wt, A257V, T463I or G562D) expression and parental MDCK cells were infected with *Ntcp*-encoding lentiviral particles as described.¹⁰ Immunofluorescence and immunoblotting analyses were performed as described¹⁰ using the following primary antibodies: rat monoclonal anti-cMyc (Clone JAC6; GeneTex, Irvine, CA), rabbit polyclonal anti-GFP (ab290; Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-ABCC2 (clone M2I-4; Enzo life Sciences, Villeurbanne, France), mouse monoclonal anti-GFP (clone 7.1 and 13.1;

RESULTATS

Roche Diagnostics, Mannheim, DE), anti-cMyc (Clone 9E10; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) and anti- β -actin (clone AC-15; Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO). Peroxydase- and fluorochrome-conjugated secondary antibodies were from GE Healthcare (Chicago, IL) and Molecular Probes/ThermoFisher Scientific (Illkirch, France), respectively.

Chemicals and cell treatments

Ivacaftor and GLPG1837 were from Selleckchem (S1144 and S8698 respectively, Munich, DE). Small Binders of CFTR (SBC040 and SBC219) were synthesized by J.L. Decout (University of Grenoble Alpes, FR). All compounds were solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) as 1000 X concentrated stock solutions to treat cells with 0.5 or 10 μ M final concentration, using DMSO as control vehicle at the same dilution (0.1 % DMSO for all conditions). After two hours of treatment with these drugs, cells were used for cytotoxicity assays or taurocholate (TC) transport assays (see below).

Analysis of ABCB11 protein stability

MDCK cells stably expressing Abcb11-GFP (wt or variants) were treated with 25 μ g/mL cycloheximide to inhibit further protein synthesis. Following incubation for 0, 4 or 8 hours, cells were harvested, lysed, and submitted to SDS-PAGE and immunoblot analysis. Band densities were quantified using the ImageJ software (NIH Bethesda, version 1.41) and normalized to the density at time point 0.

Cytotoxicity assays

Cytotoxicity of CFTR potentiators was assessed by the conversion of MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide; Sigma) into formazan crystals by living cells, as described previously.¹⁹ Briefly, subconfluent MDCK cells were plated into 96-well plates in triplicate for each tested condition, including controls (no cells and 0,1 % DMSO). Sixteen hours after cell seeding and 2 hours after drug treatment, 125 μ g/mL MTT (final

concentration) was added in each well, and cells were re-incubated at 37°C for 2 hours. Then culture media were gently washed out, cells were lysed in 100 μ L DMSO, and the absorbance at 540 nm was measured using a multiplate spectrofluorometer Victor from Perkin Elmer (Massy, FR). Cell survival was calculated for each triplicate and, after background subtraction, means were expressed as percentages of the mean for cells treated with the vehicle only.

Taurocholate transport assay

Measurement of Abcb11-mediated TC secretion was performed as described.¹⁰ In brief, culture medium was replaced by pre-warmed transport buffer in apical and basal compartments, in the absence or presence of 0.5 or 10 μ M of ivacaftor, GLPG1837, SBC040 or SBC219. [³H]TC was added in the basal compartment. After two hours, the apical buffer was collected and transcellular transport of [³H]TC was calculated from the radioactivity present in the apical buffer. Transport data were normalized to protein amounts determined by BiCinchoninic acid Assay (QuantiPro™ BCA Assay Kit, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO).

Statistical analyses

Data are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Graphics and statistical analyses were performed by one-way ANOVA using Prism version 7.00 (GraphPad software, La Jolla, CA). A *P* value < .05 was considered significant.

Results

Molecular modelling predicts a functional defect of ABCB11 variants

The A257V, T463I or G562D variations were identified at a heterozygous status in young PFIC2 patients. The main characteristics of the patients are shown in Table 1. The A257V and T463I variations and their potential defect were previously reported.^{10, 20} In brief, Ala257 resides in the transmembrane domain 4 (TM4), in a very flexible region of ABCB11 (Figure 1A). Thr463 resides in the NBD1, inside the degenerated NBS-a and interacts with the ATP α -phosphate (Figure 1A-B). The G562D variation is homologous to the gating variation G551D of CFTR. Gly562 belongs to the NBD1 inside the NBS-b and is in Van der Waals contact with the ATP γ -phosphate (Figure 1B). In this position, there is not enough space to accommodate a larger side chain as the one of aspartate, leading to a steric hindrance when the Gly562 is mutated into an aspartate. Three-dimensional molecular modelling predicted that all three variations might directly or indirectly impact ABCB11 transport function by disrupting ATP binding or ABCB11 local conformational change between the inward- and outward-facing states.

Abcb11 variants are correctly targeted to the canalicular/apical membrane

The canalicular expression of the A257V and T463I variants of Abcb11 were previously reported in Can 10 and/or HepG2 cells.^{10, 13, 20} Twenty-four hours after transient expression of Abcb11-GFP in polarized HepG2 cells, we compared expression of the T463I and G562D variants to the one of the wt. These cells form pseudo-canalicular in culture allowing localization studies.¹⁸ As the wt protein, T463I and G562D variants of Abcb11 were exclusively expressed at the canalicular membrane of HepG2 cells and colocalize with endogenously expressed ABCC2, used as a canalicular marker (Figure 2A, quantification in 2B). We then confirmed Abcb11-GFP as well as Ntcp-cMyc expression and localization in MDCK cells, used further for measuring Abcb11 transport activity. Abcb11 (wt, A257V, T463I and G562D) was

predominantly located along the apical membrane, and Ntcp was exclusively located at the basolateral membrane of MDCK cells (Figure 2C). On immunoblot from MDCK cell lysates, Abcb11-GFP (wt, A257V, T463I and G562D) was present as a fully glycosylated protein with an apparent molecular weight of 190 kDa, and Ntcp-cMyc was detected at 53 kDa (Figure 2D). The quantification of these results indicated that expression levels of Abcb11-GFP and Ntcp-cMyc in MDCK clones were not statistically different (Figure 2E and F). These results suggest that the A257V, T463I and G562D do not impair the intracellular trafficking of Abcb11.

The A257V variation of Abcb11 impacts the stability of the transporter

To further characterize the molecular defect due to A257V, T463I and G562D variations, we assessed the stability of Abcb11 variants. The stability of Abcb11 (wt and variants) was compared by analysing the protein decay of Abcb11-GFP after inhibition of protein synthesis with cycloheximide. As shown in Figure 3A, at time point 0, Abcb11 (wt and variants) appear as a fully glycosylated protein with an apparent molecular weight of 190 kDa. The quantification of these results showed that protein synthesis inhibition led to the progressive disappearance of the mature forms of Abcb11-wt (Figure 3B). No significant difference was observed between the wt and the T463I and G562D variants of Abcb11. By contrast, the amount of the A257V variant significantly decreased under cycloheximide treatment. After 4 hours, the A257V showed a 68 % decrease as compared to the time point 0 and the reduction was more than 82 % after 8 hours (Figure 3B). These results suggested that Abcb11-A257V was degraded faster than the wt Abcb11.

CFTR potentiators rescue the functional defect due to Abcb11 variations

Using a previously described approach with radiolabelled taurocholate,¹⁰ we measured the Abcb11-mediated BA secretion of Abcb11 (wt and variants) stably expressed in MDCK cells treated with vehicle (0.1% DMSO) or CFTR potentiators (Supplementary table S1). We did not

RESULTATS

μM in MDCK cells (Figure 4). As previously reported, A257V and T463I variants maintain a residual activity (70 % and 53 % of the wt Abcb11, respectively). In addition, we observed a strongly reduced activity (28 % of the wt transport activity) for the G562D variant in the absence of treatment (Figure 5A). All four CFTR potentiators allowed to increase by 1.5 to 1.9-fold the BA-transport activity of the A257V variant, reaching the level of the wt Abcb11 (Figure 5B). Except for GLPG1837, all CFTR potentiators significantly increased by 1.3 to 1.5-fold the BA transport activity of the T463I variant (Figure 5C). Only minor differences were observed between treatments at 0.5 or 10 μM . Finally, BA transport activity of the G562D variant was significantly increased by treatment with ivacaftor at 0.5 μM (1.5-fold, $p < 0.5$), SBC040 at 10 μM (1.6-fold, $p < 0.5$) and GLPG1837 at 0.5 μM (1.6-fold, $p < 0.5$), even if to a lesser extent than the two other variants (Figure 5D). In addition, we tested whether the combination of treatments with ivacaftor and SBCs potentiators might increase the BA transport activity of Abcb11 (Figure 5B-D, last two bars). A significant additive or synergetic effect between SBCs and VX-770 was observed only for the T463I variant of Abcb11 (Figure 5B-C). However, a slight trend toward more BA transport activity was also observed for the G562D variant (Figure 5D). Altogether, these results indicate that all four CFTR potentiators, but also ivacaftor and SBCs combinations, are able to totally or partially rescue the functional defect of A257V, T463I and G562D Abcb11 variants.

Discussion

In this study, we further characterized three ABCB11 missense variants and evaluated the capability of four CFTR potentiators to correct their defect. The A257V, T463I, and G562D missense variations were identified in heterozygous patients who developed PFIC2 during childhood. In previous studies, we have shown that the A257V and T463I variants are correctly targeted to the canalicular membrane but are not functional.^{10, 20} Although the G562D variant has a similar profile, its defective activity is stronger than those of the A257V and T463I variants. Its localization in the canonical NBS-b could therefore be more drastic to the function of ABCB11. Indeed, it has been shown that ABCB11 has asymmetric ATP-binding sites. The NBS-a is degenerated and unable to hydrolyse ATP while the NBS-b binds and hydrolyses ATP.⁴ This could allow the NBDs to be closer to allow multiple cycles of ATP hydrolysis.²¹ It is therefore not surprising that a variation in a residue interacting with ATP in the NBS-b has a major effect on the transport function. Likewise, the homologous variation in CFTR (G551D) also shown a drastic function defect.^{22, 23} Although 3D structure modelling predicts that Ala257 residue may play a critical role in the ABCB11 local conformational changes between the inward- and outward-facing states and may thus indirectly impact its function, the A257V variant has the lightest phenotype of the three studied variants. Its localization in a TM instead of in the NBDs could have a minor impact on the function of the transporter, highlighting the importance of the NBD in the transport function. Moreover, in line with its TM localization, we found that this variation leads to a stability defect. By analogy with ABCB4, a classification of the variations could hence be proposed: no expression of the protein (class I); intracellular retention (class II); impairment of BAs secretion activity (class III); defect of protein stability at the canalicular membrane (class IV); no apparent defect (class V).²⁴ Thus, the T463I and G562D variants would belong to class III variations whereas A257V would be a class III-IV variant.

RESULTATS

Ivacaftor is approved in selected cystic fibrosis patients harbouring CFTR variations localized inside and outside ATP-binding sites.²⁵ We have previously shown the efficiency of ivacaftor at 10 μM on the T463I variants of Abcb11.¹⁰ Ivacaftor has been shown to rescue the channel activity of wt and mutated CFTR at subnanomolar concentrations in patch-clamp experiments,²⁶ suggesting that we could use it at a lower concentration. In accordance with that, we show here that ivacaftor at 0.5 μM (as well as 10 μM) rescues the function of the A257V, T463I and G562D variants of Abcb11. These results show that ivacaftor would be clinically used to treat patients with these classes of variations. The fact that a unique molecule can act on several transporters suggests common mechanisms of action among the ABC transporter superfamily. The binding of ivacaftor to the transporter could induce, for example, conformational changes that favour ATP binding. An ivacaftor binding site was first identified at the protein/lipid interface of the TM4, 5 and 8 of CFTR.²⁷ The binding of ivacaftor to this site would facilitate the opening of the channel in an ATP-independent manner while prolonging its opening time in an ATP-dependent manner, resulting in increased Cl^- ion secretion.²⁸⁻³⁰ However, this site is absent from other ABC transporters, which could explain why ivacaftor potentiates the function of CFTR-wt but not Abcb11-wt.¹⁰ More recently, a binding site in the intracellular loop 4 (ICL4) of CFTR (between NBD1 and TM2) has been identified.³¹ Investigations are underway to determine whether this site is present in other ABC transporters. Another ivacaftor binding site was identified in the substrate-binding site of ABCB1, in the large central cavity that communicates with the cytoplasm and the lipid bilayer.³² This site appears to be absent in CFTR, favouring the hypothesis that ivacaftor is a substrate of ABCB1.³³

The development of new potentiator drugs is necessary to achieve higher clinical benefit for patients. Therefore, we were interested in new promising CFTR potentiators. GLPG1837 is still being evaluated in clinical studies.³⁴ It has been shown that this molecule enhanced the activity

of class III CFTR variants to a better extent than ivacaftor.³⁵ However, in our study, GLPG1837 showed similar efficacy to that of ivacaftor. GLPG1837 has been shown to bind to the same ivacaftor binding site at the lipid/protein interface, which is absent of other ABC transporters.²⁷ Therefore, it is likely that the higher efficacy of GLPG1837 compared to ivacaftor on CFTR is related to the presence of this binding site. It would be interesting to look for other GLPG1837 binding sites in CFTR and other ABC transporters and identify whether these sites are identical to those for ivacaftor. More recently, the small binders of CFTR (SBC040 and SBC219) have been developed to interact with an obvious target site on CFTR, *i.e.* filling the pocket known to be present in the altered ICL4:NBD1 inter-domain interface in the F508del 3D structure.¹² Initially designed as correctors, these compounds were found to have a potentiating activity on several class III CFTR variants sensitive to ivacaftor.¹² In this study, we showed that these compounds were also able to potentiate the BA transport activity of A257V, T463I and G562D variants. However, we did not observe a stronger effect of SBC219 than ivacaftor, as shown for CFTR potentiation. Furthermore, the G562D variant of Abcb11 showed a positive response to SBC040 while little or no potentiation was observed in its homologous CFTR-G551D.¹² Moreover, the level of transport function after G562D variant potentiation remains lower than the one of the residual activity of T463I, suggesting that potentiation of G562D would not provide a clinical benefit. Finally, a potentiation of the function of the wild-type protein was observed in CFTR but not for Abcb11.¹² Similarities were also observed such as the synergistic effect of the combination of ivacaftor and SBCs suggesting a different binding site than those for ivacaftor. Hence, SBCs may modulate CFTR channel and ABCB11 transporter by different mechanisms. It would therefore be interesting to study the potential binding sites of these compounds in ABCB11.

The present *in vitro* study enabled the characterization of three ABCB11 variants and the identification of new potentiator drugs able to correct the function defects caused by ABCB11

RESULTATS

variations. This constitutes a proof of concept for repurposing CFTR potentiators as a new therapeutic option for selected patients with ABCB11 deficiency caused by ABCB11 class III variations, *i.e.* affecting the function of the transporter. Considering that there is an unmet medical need for patients with BSEP deficiency, this could represent a significant step forward for the care of such selected patients.

References

Author names in bold designated shared co-first authorship.

1. Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:1.
2. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001;11:1156-1166.
3. Soroka CJ, Boyer JL. Biosynthesis and trafficking of the bile salt export pump, BSEP: therapeutic implications of BSEP mutations. *Mol Aspects Med* 2014;37:3-14.
4. Sohail MI, Schmid D, Wlcek K, et al. Molecular Mechanism of Taurocholate Transport by the Bile Salt Export Pump, an ABC Transporter Associated with Intrahepatic Cholestasis. *Mol Pharmacol* 2017;92:401-413.
5. van Wessel DBE, Thompson RJ, Gonzales E, et al. Genotype correlates with the natural history of severe bile salt export pump deficiency. *J Hepatol* 2020;73:84-93.
6. Strautnieks SS, Byrne JA, Pawlikowska L, et al. Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families. *Gastroenterology* 2008;134:1203-1214.
7. Byrne JA, Strautnieks SS, Ihrke G, et al. Missense mutations and single nucleotide polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre-messenger RNA splicing. *Hepatology* 2009;49:553-567.
8. Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, et al. ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 2010;51:1645-1655.
9. Droge C, Bonus M, Baumann U, et al. Sequencing of FIC1, BSEP and MDR3 in a large cohort of patients with cholestasis revealed a high number of different genetic variants. *J Hepatol* 2017;67:1253-1264.
10. **Mareux E, Lapalus M**, Amzal R, et al. Functional rescue of an ABCB11 mutant by ivacaftor: A new targeted pharmacotherapy approach in bile salt export pump deficiency. *Liver Int* 2020;40:1917-1925.
11. Yeh HI, Sohma Y, Conrath K, Hwang TC. A common mechanism for CFTR potentiators. *J Gen Physiol* 2017;149:1105-1118.
12. Froux L, Elbahnsi A, Boucherle B, et al. Targeting different binding sites in the CFTR structures allows to synergistically potentiate channel activity. *Eur J Med Chem* 2020;190:112116.

13. Gonzales E, Grosse B, Schuller B, et al. Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate. *Hepatology* 2015;62:558-566.
14. Wang L, Hou WT, Chen L, et al. Cryo-EM structure of human bile salts exporter ABCB11. *Cell Res* 2020;30:623-625.
15. Webb B, Sali A. Protein Structure Modeling with MODELLER. *Methods Mol Biol* 2017;1654:39-54.
16. Kim Y, Chen J. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation. *Science* 2018;359:915-919.
17. Amzal R, Thebaut A, Lapalus M, et al. Pharmacological Premature Termination Codon Readthrough of ABCB11 in Bile Salt Export Pump Deficiency: An In Vitro Study. *Hepatology* 2021;73:1449-1463.
18. Sormunen R, Eskelinen S, Lehto VP. Bile canaliculus formation in cultured HEPG2 cells. *Lab Invest* 1993;68:652-662.
19. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 2011;731:237-245.
20. Mareux E, Lapalus M, Ben Saad A, et al. In vitro functional rescue by ivacaftor of an ABCB11 variant involved in PFIC2 and intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Orphanet J Rare Dis* submit in 2021.
21. Stockner T, Gradisch R, Schmitt L. The role of the degenerate nucleotide binding site in type I ABC exporters. *FEBS Lett* 2020;594:3815-3838.
22. Tsui LC. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:S47-53.
23. Li C, Ramjeesingh M, Wang W, et al. ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 1996;271:28463-28468.
24. Delaunay JL, Durand-Schneider AM, Dossier C, et al. A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3. *Hepatology* 2016;63:1620-1631.
25. De Boeck K, Munck A, Walker S, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J Cyst Fibros* 2014;13:674-680.
26. Csanady L, Torocsik B. Cystic fibrosis drug ivacaftor stimulates CFTR channels at picomolar concentrations. *Elife* 2019;8.
27. Liu F, Zhang Z, Levit A, et al. Structural identification of a hotspot on CFTR for potentiation. *Science* 2019;364:1184-1188.

28. Eckford PD, Li C, Ramjeesingh M, Bear CE. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *J Biol Chem* 2012;287:36639-36649.
29. Jih KY, Hwang TC. Vx-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:4404-4409.
30. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18825-18830.
31. Laselva O, Qureshi Z, Zeng ZW, et al. Identification of binding sites for ivacaftor on the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *iScience* 2021;24:102542.
32. Barbieri A, Thonghin N, Shafi T, et al. Structure of ABCB1/P-glycoprotein bound to the CFTR potentiator ivacaftor. *bioRxiv* 2021:2021.2006.2011.448073.
33. Lingam S, Thonghin N, Ford RC. Investigation of the effects of the CFTR potentiator ivacaftor on human P-glycoprotein (ABCB1). *Sci Rep* 2017;7:17481.
34. Davies JC, Van de Steen O, van Koningsbruggen-Rietschel S, et al. GLPG1837, a CFTR potentiator, in p.Gly551Asp (G551D)-CF patients: An open-label, single-arm, phase 2a study (SAPHIRA1). *J Cyst Fibros* 2019;18:693-699.
35. Van der Plas SE, Kelgtermans H, De Munck T, et al. Discovery of N-(3-Carbamoyl-5,5,7,7-tetramethyl-5,7-dihydro-4H-thieno[2,3-c]pyran-2-yl)-1H-pyr azole-5-carboxamide (GLPG1837), a Novel Potentiator Which Can Open Class III Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Channels to a High Extent. *J Med Chem* 2018;61:1425-1435.

RESULTATS

Patient (No./Sex)	First allele	Domain	Second allele	Domain	Biliary BA (N >10 μ M)	IHC ABCB11	Reference
1/F	c.770C>T p.A257V	TM4	c.2944G>A p.G982R	TM11	na	na	13
2/F	c.1388C>T p.T463I	NBD1 NBS-a	c.3169C>T p.R1057X	Linker TM6-NBD2	1mM	Faint	10
3/na	c.1685G>A p.G562D	NBD1 NBS-b	c.1445A_G p.D482G	NBD1	na	Normal	6

Table 1: Features of PFIC2 patients with ABCB11 variations. Nucleotide variant corresponds to the cDNA of the NM_003742.4 (ABCB11, transcript variant A, messenger RNA). Abbreviations: F, female; na, not available; NBD, nucleotide binding domain; NBS, ATP-binding site; TM, Transmembrane domain.

Figure 1

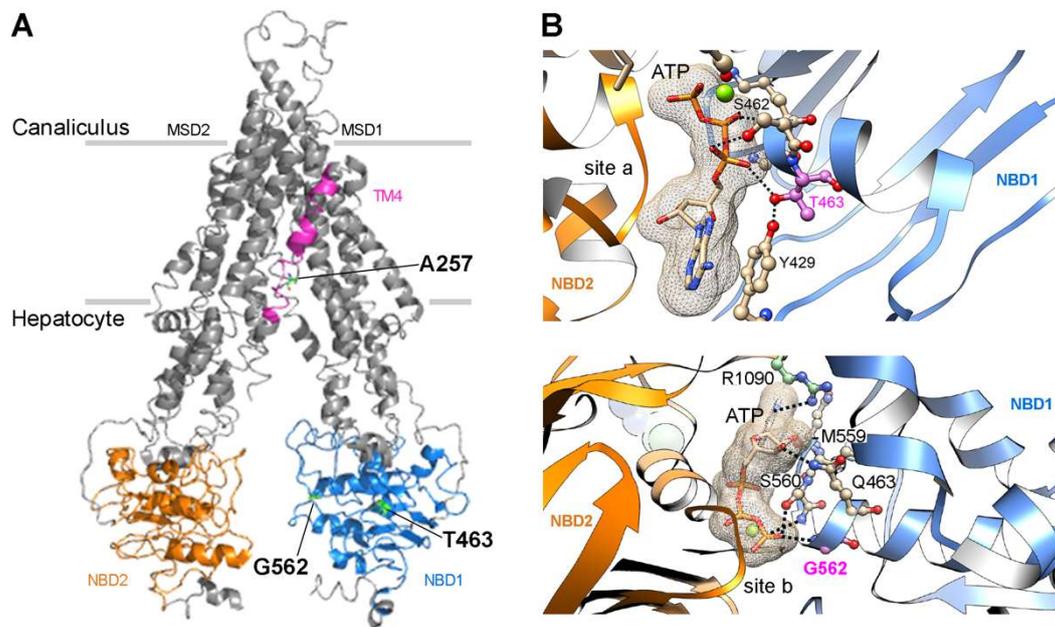


Figure 1: 3D structure modelling of human ABCB11. (A) Structure of wild type (wt) human ABCB11 in an inward-open state solved at 3.5 Å using cryogenic electron microscopy (PDB ID: 6LR0).¹⁴ The Ala257 belongs to the fourth transmembrane helix (TM4) (coloured in magenta), whereas the Thr463 and Gly562 belongs to the NBD1 in blue. NBD2 is shown in orange. (B) Ribbon representation of the 3D structure model of ABCB11 NBD1/NBD2 assembly. The Thr463 (pink) resides in the degenerated ATP-binding site “a” whereas Gly562 (pink) belongs to the consensus ATP-binding site “b”.

Figure 2

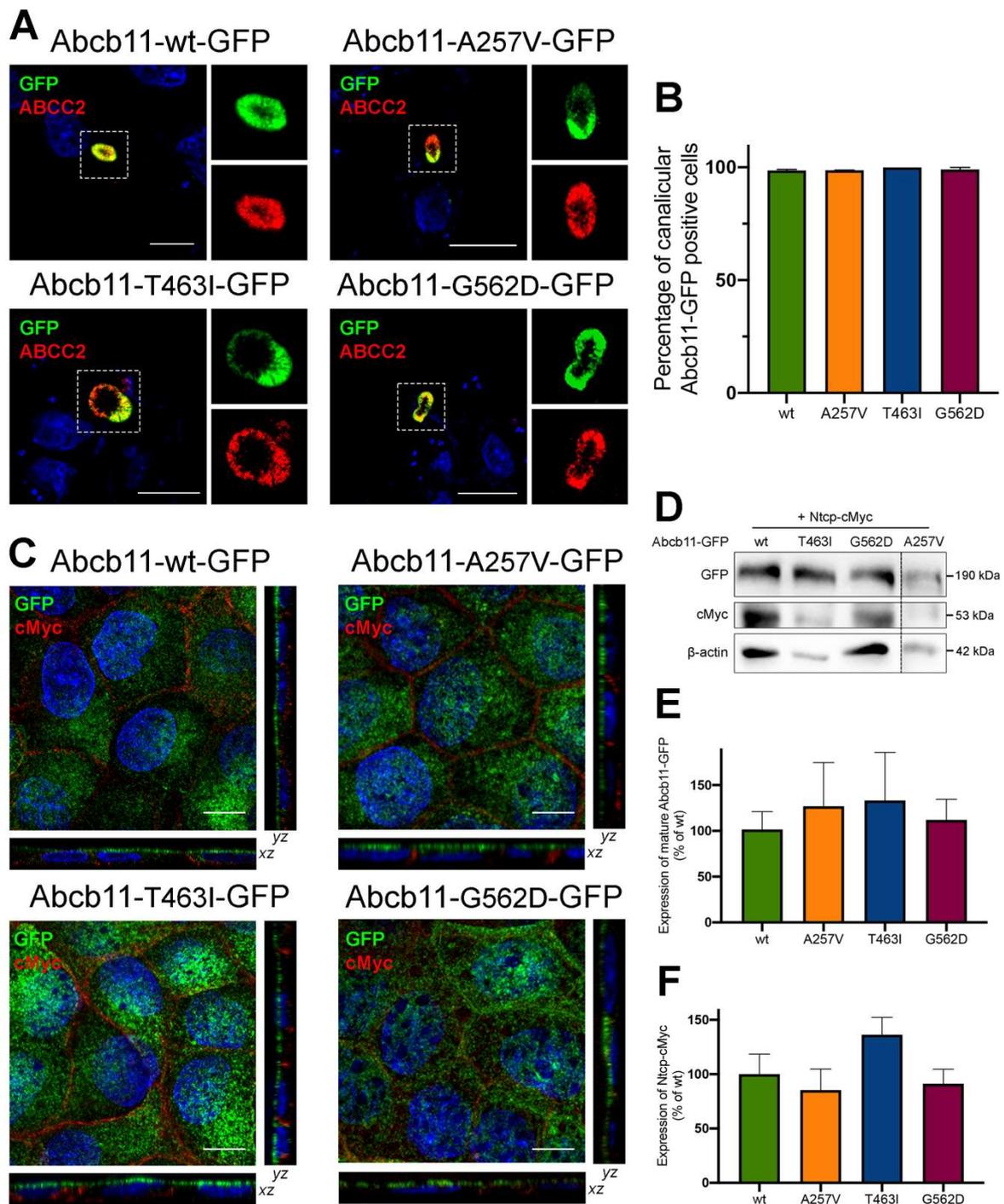


Figure 2: Abcb11 variants are expressed at the canalicular/apical membrane. (A) HepG2 cells were transiently transfected with Abcb11-GFP (wt and variants). Twenty-four hours after, cells were fixed and permeabilized. Immunolabelling of Abcb11-GFP (green) and endogenous ABCC2 (red) were visualized by confocal microscopy. Nuclei shown in the merged images were labelled with Hoechst 33.342 (blue). This panel is representative of at least three independent experiments per condition. Dashed squares indicate magnification shown in the small right panels. Bars: 10 μ m. (B) Quantification of A. Results are means (\pm SEM) of at least

three independent experiments per condition. **(C)** MDCK clones stably expressing Abcb11-GFP (wt or variants) and Ntcp-cMyc were fixed and permeabilized. Immunolabelling of Abcb11-GFP (green) and Ntcp-cMyc (red) were visualized by confocal microscopy. Nuclei were labelled with Hoechst 33 342 (blue). Bottom, centre and right panels show x - z , x - y and y - z plane images, respectively. Bars: 10 μ m. This panel is representative of at least three independent experiments per condition. **(D)** Cell lysates from MDCK clones stably expressing Abcb11-GFP (wt or variants) and Ntcp-cMyc were prepared and analysed by immunoblotting using the indicated antibodies. This panel is representative of at least five independent experiments for each condition. Densitometry of **(E)** Abcb11-GFP and **(F)** Ntcp-cMyc from D were separately quantified and their relative amounts were calculated and normalized to β -actin. Means (\pm SEM) of at least three independent experiments per condition are shown. No statistical differences have been observed.

Figure 3

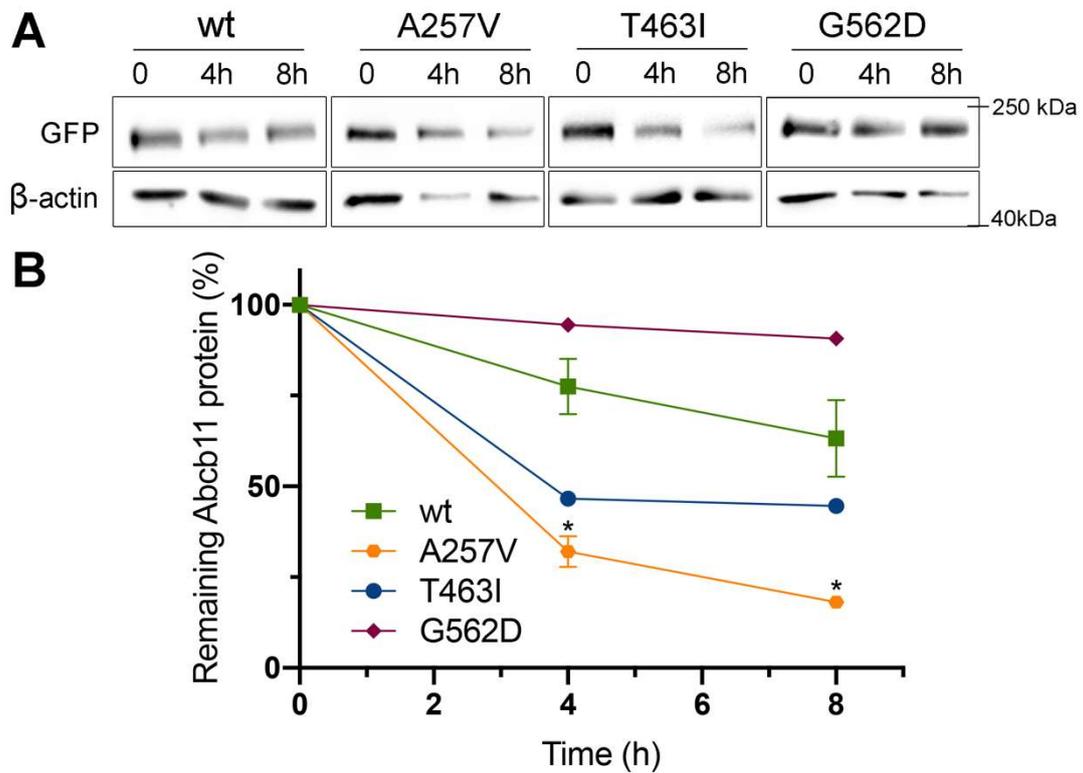


Figure 3: The A257V variant of Abcb11 shows a significant stability defect. (A) MDCK cells stably expressing Abcb11-GFP (wt or variants) were treated with cycloheximide (25 μ g/mL) to inhibit protein synthesis. Then, expression of Abcb11 (wt and variants) was analysed by immunoblot at the indicated time points. (B) Electrophoretic patterns of Abcb11-GFP were separately quantified from A at 0, 4 and 8 hours after cycloheximide addition and their relative amounts were calculated and normalized to β -actin. The amount of Abcb11-GFP at time 0 was considered as 100 %. Remaining Abcb11-GFP at 4 and 8 hours was expressed as a percentage of time point 0. Means (\pm SEM) of one to three independent experiments are shown. * $p < .05$.

Figure 4

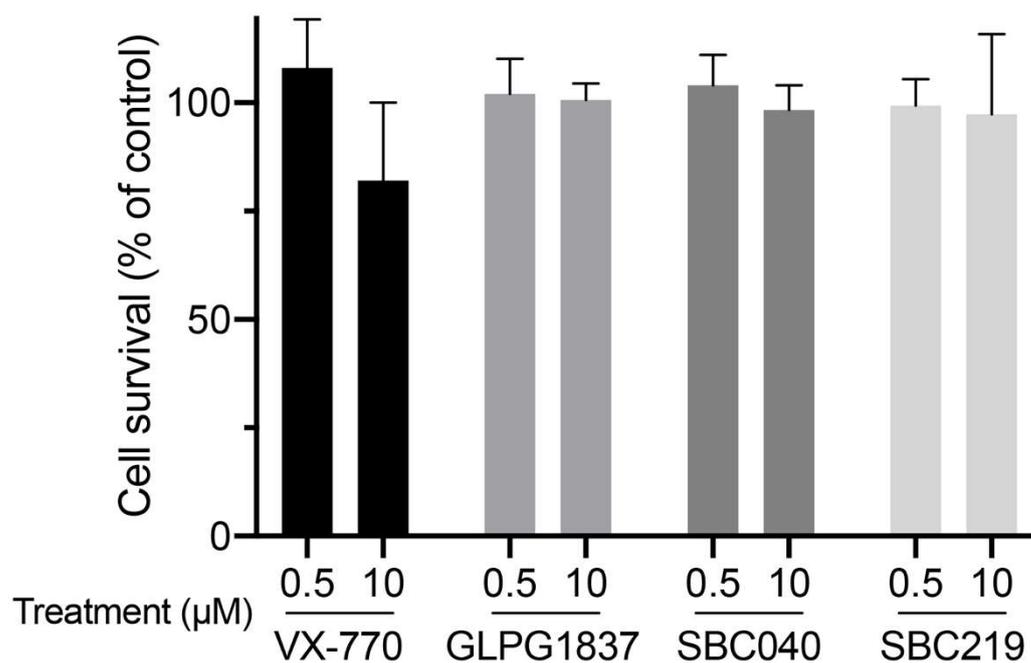


Figure 4: CFTR potentiators are not cytotoxic. MDCK cells were treated with 0.5 or 10 μM of the indicated potentiators for 2 hours. Then cytotoxicity was assessed by MTT assay and expressed as the percentage of means of the control vehicle-treated cells. Means (\pm SEM) of at least three independent experiments per condition performed in triplicate are shown.

Figure 5

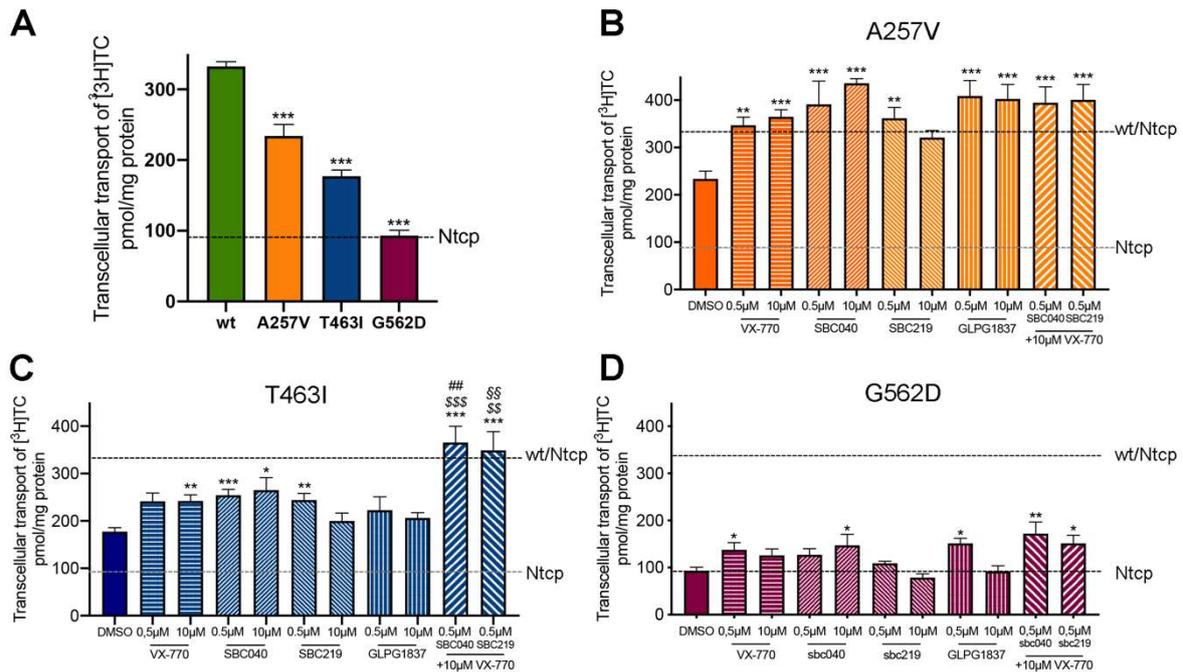


Figure 5: CFTR potentiators totally or partially rescue the functional defect of Abcb11 variants. Vectorial transport of [³H]TC in MDCK cells stably expressing Abcb11 (wt or variants) and Ntcp in the absence (A) or presence of the indicated concentrations of ivacaftor, GLPG1837, SBC040 or SBC219 in the (B) A257V, (C) T463I or (D) G562D variants of Abcb11. The upper and lower dashed lines indicate [³H]TC transport measured in MDCK cells expressing both wt and Ntcp or Ntcp alone, respectively. Means (± SEM) of at least six independent experiments for each tested condition are shown. **p* < .05; ***p* < .01; ****p* < .005 vs non-treated Abcb11-wt expressing cells (panel A); \$\$*p* < .01; \$\$\$*p* < .005 vs VX-770-treated cells; ##*p* < .01 vs SBC040-treated cells \$\$*p* < .01 vs SBC219-treated cells.

Supplementary information

In vitro rescue of the bile acid transport function of ABCB11 variants by CFTR potentiators

Elodie Mareux¹, Martine Lapalus¹, Amel Ben Saad¹, Mounia Lakli¹, Tounsia Aït-Slimane²,
Jean-Luc Decout³, Isabelle Callebaut⁴, Thomas Falguières¹, Emmanuel Jacquemin^{1,5},
Emmanuel Gonzales^{1,5}

¹Inserm UMR_S1193, Physiopathogénèse et traitement des maladies du foie, Université Paris-Saclay, Hepatinov, 91400 Orsay, France.

²Inserm UMR_S 938, Centre de Recherche Saint-Antoine, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Sorbonne Université, 75012 Paris, France.

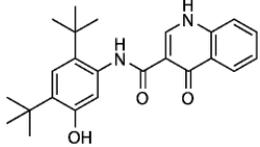
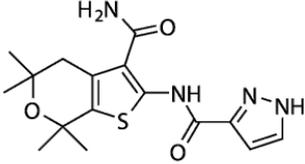
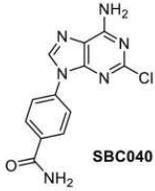
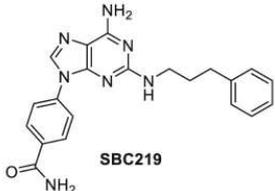
³Université de Grenoble Alpes, CNRS, DPM, 38000, Grenoble, France.

⁴UMR CNRS 7590, Institut de Minéralogie, de Physique des Matériaux et de Cosmochimie, Sorbonne Université, Muséum National d'Histoire Naturelle, 75005 Paris, France

⁵APHP CHU Bicêtre, Service d'hépatologie et transplantation hépatique pédiatrique, Centre de référence national des maladies pédiatriques rares du foie, FILFOIE, ERN RARE LIVER, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France.

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

RESULTATS

Compound	IUPAC Name	Chemical structure	PubChem CID	MW (Da)	References
Ivacaftor (VX-770)	N-(2,4-ditert-butyl-5-hydroxyphenyl)-4-oxo-1H-quinoline-3-carboxamide		16220172	392.49	1
GLPG1837 (ABBV-974)	N-(3-carbamoyl-5,5,7,7-tetramethyl-4H-thieno[2,3-c]pyran-2-yl)-1H-pyrazole-5-carboxamide		117857370	348.42	2
SBC040	4-(6-Amino-2-chloro-9H-purin-9-yl)benzamide		–	403,7	3
SBC219	4-(6-Amino-2-((3-phenylpropyl)amino)-9H-purin-9-yl)benzamide		–	387,4	3

Supplementary Table S1: Chemical structures of CFTR potentiators used in this study

Supplementary References

1. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:18825-18830.
2. Yeh HI, Sohma Y, Conrath K, Hwang TC. A common mechanism for CFTR potentiators. *J Gen Physiol* 2017;149:1105-1118.
3. Froux L, Elbahnsi A, Boucherle B, et al. Targeting different binding sites in the CFTR structures allows to synergistically potentiate channel activity. *Eur J Med Chem* 2020;190:112116.

I – 2 – Résultats complémentaires

I – 2 – 1 – Matériels et méthodes

Traitements

L'ivacaftor et le GLPG1837 proviennent de Selleckchem (S1144 et S8698 respectivement, Munich, DE). Les SBC040 et SBC219 ont été gracieusement fournis par J.L. Decout (Université de Grenoble Alpes, FR). Tous les composés ont été solubilisés dans du DMSO sous forme de solutions mères concentrées 1000 X pour traiter les cellules avec une concentration finale de 0,5 ou 10 μM , en utilisant le DMSO comme contrôle à la même dilution (0,1 % DMSO pour toutes les conditions). Après traitement, les cellules ont été utilisées pour des tests de transport de taurocholate (TC) ou des tests de stabilité.

Transport transcellulaire de taurocholate tritié

La mesure de la sécrétion de [^3H]TC par Abcb11 a été réalisée sur des cellules MDCK exprimant de manière stable la protéine sauvage (wt) ou les variants d'Abcb11-GFP et le transporteur basolatéral permettant l'entrée du TC dans la cellule, Ntcp-cMyc, comme décrit précédemment (Mareux, Lapalus *et al.* 2020). Ces cellules sont cultivées en monocouche sur une membrane d'insert jusqu'à confluence, contrôlée par la mesure de la résistance transépithéliale. Puis, le milieu de culture dans les compartiments apical et basal est remplacé par un tampon de transport préchauffé à 37°C et supplémenté ou non de 0,5 ou 10 μM d'ivacaftor, GLPG1837, SBC040 et/ou SBC219. Le TC (0,1 μM de [^3H]TC soit 1 $\mu\text{Ci/mL}$ et 0,9 μM de TC) est ajouté dans le compartiment basal. Après deux heures, le tampon dans le compartiment apical est collecté. Le transport transcellulaire de [^3H]TC est donné par la mesure de la radioactivité présente dans le tampon apical. Les données sont ensuite normalisées par rapport à la quantité de protéines de l'insert déterminée par le dosage de l'acide bicinchoninique (QuantiPro™ BCA Assay Kit, Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO).

Test de stabilité d'Abcb11

Les cellules MDCK exprimant de manière stable Abcb11-GFP (wt ou variants) sont traitées 24 heures avec 0,1 % de DMSO (contrôle) ou 10 μM d'ivacaftor. Puis, les

RESULTATS

cellules sont incubées avec la cycloheximide (25 µg/mL) pour inhiber la synthèse protéique. Après une incubation de 0, 4, 8 ou 24 heures, les cellules sont lysées et soumises à une analyse par SDS-PAGE et immunoblot. La densité des bandes est quantifiée par le logiciel ImageJ 1.41 et normalisée de sorte que la densité au temps 0 soit de 100 %.

Analyses statistiques

Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm erreurs standards de la moyenne (SEM). Les graphiques et les analyses statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel GraphPad. Une valeur $p < 0,05$ est considérée comme significative.

I – 2 – 2 – Résultats

Les potentiateurs de CFTR n'ont pas d'effet sur l'activité d'Abcb11 wt ou de Ntcp

Afin de valider l'effet spécifique des potentiateurs de CFTR sur les variants, nous avons évalué leur effet sur les cellules MDCK exprimant de manière stable soit Abcb11-wt et Ntcp, soit Ntcp seul. Aucun effet significatif n'a été observé ni sur l'activité de transport d'Abcb11-wt, ni sur celle de Ntcp (Figure 22). Il est à noter une légère diminution non significative du transport de TC dans les cellules exprimant Ntcp seul avec 10 µM de GLPG1837 ou de SBC219. L'ensemble de ces résultats montre que l'ivacaftor, le GLPG1837, les SBC040 et SBC219 n'ont pas d'effet sur les formes sauvages d'Abcb11 et ntcp.

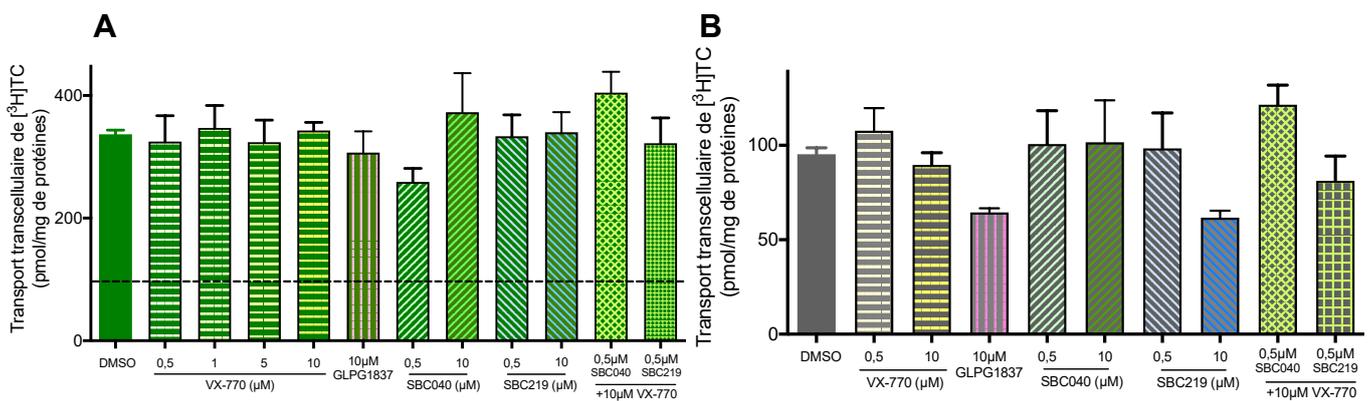


Figure 22 : Les potentiateurs de CFTR n'ont pas d'effet sur l'activité d'Abcb11 wt ou de Ntcp. Transport vectoriel de [³H]TC dans des cellules MDCK exprimant de façon stable (**A**) Abcb11 wt et Ntcp ou (**B**) Ntcp seul en absence ou en présence des concentrations indiquées d'ivacaftor (VX-770), de GLPG1837, de SBC040 ou de SBC219. La ligne pointillée indique le transport de [³H]TC mesuré dans les cellules MDCK exprimant Ntcp seul. Les moyennes (\pm SEM) d'au moins cinq expériences indépendantes pour chaque condition testée sont indiquées. Aucune significativité n'a été observée (One-way anova).

L'ivacaftor affecte la stabilité d'Abcb11-wt et du variant G562D

Afin de déterminer si l'augmentation du transport d'ABs observée lors du traitement avec l'ivacaftor était liée à une augmentation de la stabilité de la protéine ou à un effet direct sur la fonction, nous avons évalué la stabilité d'Abcb11-wt ou du variant G562D après 24 heures de traitement avec 10 μ M d'ivacaftor (Figure 23). De manière surprenante, nous avons observé que l'ivacaftor semblait induire une diminution de la stabilité d'Abcb11 (wt ou G562D). Cependant, ces résultats sont très préliminaires et non significatifs.

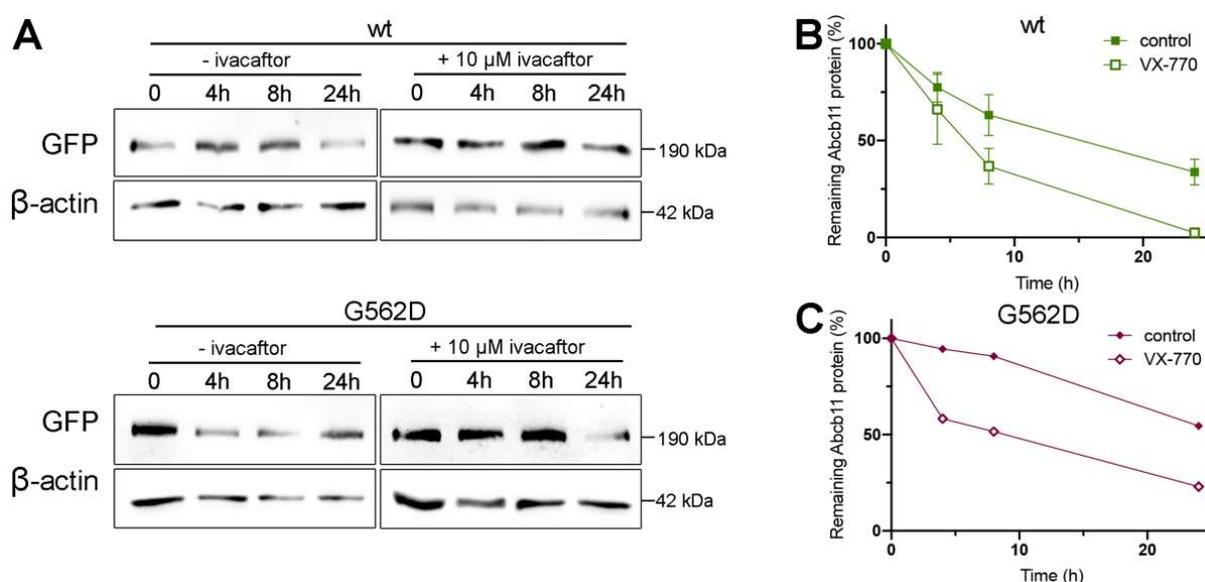


Figure 23 : L'ivacaftor semble affecter la stabilité d'Abcb11. (A) Après 24 heures de traitement avec 0,1 % DMSO (control) ou 10 μ M d'ivacaftor (VX-770), les cellules MDCK exprimant de manière stable Abcb11-GFP (wt ou G562D) sont traitées avec la cycloheximide (25 μ g/mL) pour inhiber la synthèse protéique. L'expression d'Abcb11 est ensuite analysée par immunoblot aux temps indiqués. Les profils électrophorétiques d'abcb11-GFP (B) wt et (C) G562D sont quantifiés à 0, 4, 8 et 24 heures après l'ajout de cycloheximide. Les quantités relatives d'Abcb11-GFP sont calculées et normalisées par rapport à la β -actine. La quantité d'Abcb11-GFP au temps 0 a été considérée comme 100 %. La quantité d'Abcb11-GFP restante à 4, 8 et 24 heures est exprimée en pourcentage du temps 0. Les moyennes (\pm SEM) de deux expériences indépendantes sont présentées. Aucune significativité n'a été observée (Two-way anova).

II – Pharmacothérapies ciblées combinatoires de variants de classe I et de classe II d'ABCB11

II – 1 – Matériels et méthodes

Modélisation moléculaire 3D

La modélisation moléculaire 3D a été réalisée en collaboration avec le Dr. Isabelle Callebaut. Le modèle de la structure 3D de l'assemblage du dimère NBD1-NBD2 d'ABCB11 a été construit avec Modeller v9.15 (Webb et Sali 2017) en utilisant la structure d'ABCB1 en conformation « *outward-facing* » déterminée par cryo-EM à une résolution de 3,4 Å avec les NBDs liés à deux molécules d'ATP comme modèle (pdb 6c0v, Kim et Chen 2018b).

Traitements

L'origine et la préparation des molécules potentiatrices sont décrites en page 113. L'elexacaftor et le tezacaftor proviennent de Selleckchem (S8851 et S7059 respectivement, Munich, DE). Ils ont été solubilisés dans du DMSO sous forme de solutions mères concentrées 1000 X pour traiter les cellules avec une concentration finale de 0,5 ou 10 µM, en utilisant le DMSO comme contrôle à la même dilution (0,1 % DMSO pour toutes les conditions). Les cellules ont été traitées pendant 2 heures avec les molécules potentiatrices et 24 heures avec les molécules correctrices. Après traitement, les cellules ont été utilisées pour des tests de transport de taurocholate (TC) comme décrit en page 113 ou pour des tests de viabilité cellulaire. Le test de stabilité d'abcb11 est également décrit en page 113.

Viabilité cellulaire

La cytotoxicité des correcteurs de CFTR a été évaluée par la conversion du MTT (Sigma) en cristaux de formazan par les cellules vivantes, comme décrit précédemment par van Merloo *et al.* 2011. Les cellules MDCK et HepG2 sub-confluentes sontensemencées dans des plaques 96 puits, en triplicata pour chaque condition testée, y compris les contrôles (pas de cellules, cellules seules et 0,1 % de DMSO). Seize heures après l'ensemencement des cellules et 24 heures après le traitement correcteur,

125 µg/mL de MTT (concentration finale) sont ajoutés dans chaque puit, et les cellules sont réincubées à 37°C pendant 2 heures. Les milieux de culture sont délicatement lavés, les cellules sont lysées avec 100 µL de DMSO et l'absorbance à 540 nm est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre Victor (Perkin Elmer). La viabilité cellulaire est calculée par l'absorbance pour chaque puit après soustraction du bruit de fond. Les moyennes des triplicatas sont exprimées en pourcentage par rapport aux cellules traitées avec le DMSO seul (contrôle).

II – 2 – Le variant de classe I R1090X

II – 2 – 1 – Résultats préliminaires de l'équipe

Notre équipe a montré précédemment l'efficacité de la gentamicine à induire la translecture du variant de classe I, R1090X (Amzal *et al.* 2021). La translecture de ce variant induit l'introduction d'un tryptophane (W), d'une cystéine (C) ou d'une arginine (R), le dernier représentant la forme sauvage de la protéine (R1090R) (Feng *et al.* 1990, Floquet *et al.* 2012). Notre équipe a alors étudié les variants faux sens issus de la translecture du variant de classe I R0190X et a mis en évidence que ces variants étaient majoritairement adressés aux CBs (Figure 24). Cela suggérait que ces variants n'affectaient pas le trafic d'Abcb11.

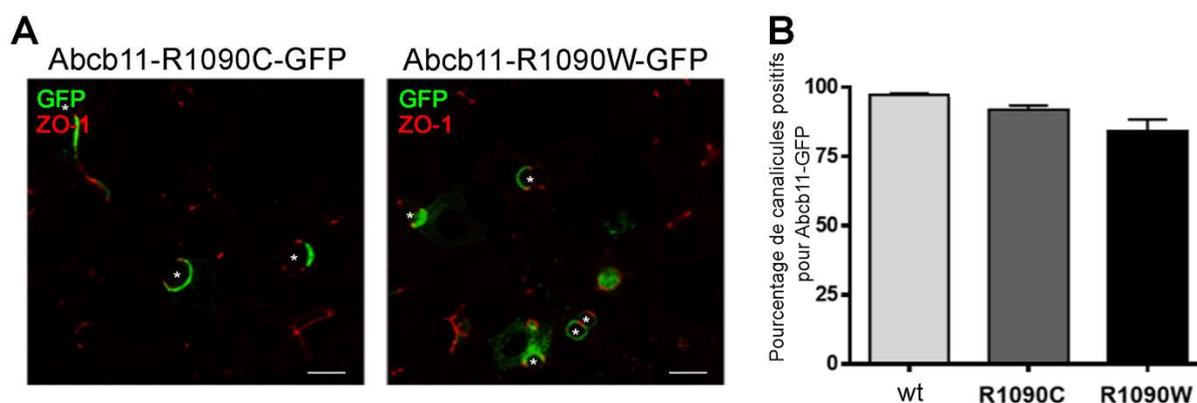


Figure 24 : Les variants R1090C et R1090W sont correctement adressés aux canalicules biliaires. (A) immunolocalisation des variants R1090C et R1090W en utilisant des anticorps anti-GFP (vert) et anti-ZO1 (rouge). Ce dernier nous permet de repérer les jonctions serrées du canalicule. Les images sont réalisées au microscope confocal et représentent une projection de 2 à 3 coupes de 0.3 µm. Barres : 10 µm. * : canalicule biliaire (B) Quantification des canalicules marqués à la GFP par rapport aux cellules positives pour la GFP formant un canalicule. Les résultats sont exprimés en moyenne des pourcentages (± SEM) de 3 expériences indépendantes.

RESULTATS

Ces variants ont par la suite été reproduits dans des cellules MDCK exprimant de manière stable Abcb11-GFP (wt, R1090C ou R1090W) et le transporteur basolatéral Ntcp-cMyc. L'expression et la localisation de ces transporteurs ont été confirmées par microscopie confocale et immunoblot (Figure 25). Comme dans les cellules Can 10, une localisation apicale d'Abcb11 a été observée. La localisation basolatérale de Ntcp a été confirmée. De plus, ces variants sont présents sous une forme mature migrant sur gel à 190 kDa. Ces résultats confirment que les variants potentiellement produits après la translecture du variant R1090X n'affectent pas l'adressage d'Abcb11 à la membrane.

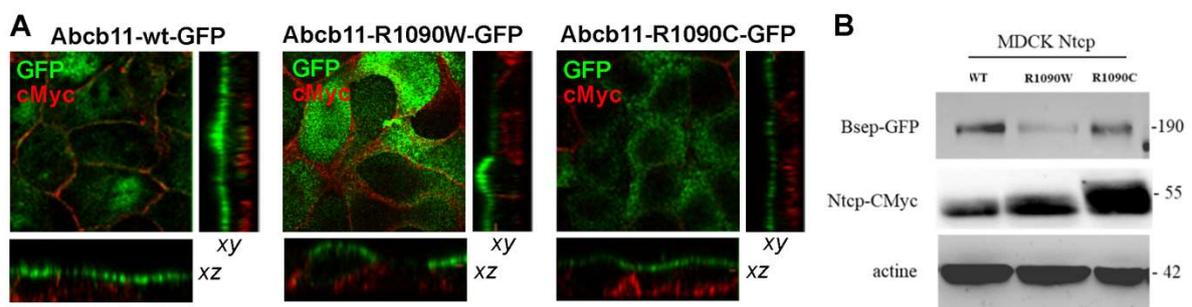


Figure 25 : Les variants R1090C et R1090W sont adressés sous forme mature à la membrane apicale. (A) Les clones MDCK exprimant de manière stable Abcb11-GFP (wt ou variants) et Ntcp-cMyc ont été fixés et perméabilisés. L'immunomarquage d'Abcb11-GFP (vert) et de Ntcp-cMyc (rouge) a été visualisé par microscopie confocale. Les plans inférieur, central et droit représentent respectivement des images dans le plan xz, xy et yz. Barres : 10 μ m. (B) Des lysats cellulaires provenant de clones MDCK exprimant de manière stable Abcb11-GFP (wt ou variants) et Ntcp-cMyc ont été préparés et analysés par immunoblot en utilisant les anticorps anti-GFP et anti-cMyc.

Après translecture du variant R1090X, il est difficile de prédire dans quelle proportion chaque résidu est incorporé dans les protéines synthétisées. Par conséquent, nous ne connaissons pas la contribution respective de la protéine sauvage et des variants R1090C et R1090W dans l'augmentation du transport d'ABs du variant R1090X après traitement par la gentamicine. Par ailleurs, ni la gentamicine ni la combinaison de la gentamicine avec le 4-PB et/ou l'AUDC ne permettent une restauration complète du transport d'ABs par Abcb11 (Amzal *et al.* 2021). Les variants R1090C et R1090W étant correctement adressés aux CBs, il est donc envisageable d'optimiser cette stratégie combinatoire par l'utilisation de traitements potentiateurs. Afin de sélectionner le traitement potentiateur le plus adapté, nous avons étudié l'effet des molécules potentiatrices de CFTR sur la fonction des variants R1090C et R1090W.

II – 2 – 2 – Résultats

L'arginine en position 1090 est impliquée dans la liaison à l'ATP

Afin de prédire les conséquences du variant R1090X et des variants faux sens produits après translecture R1090C et R1090W sur ABCB11, nous avons étudié les interactions de l'arginine en position R1090 par modélisation moléculaire 3D d'ABCB11 en collaboration avec le Dr. Isabelle Callebaut. L'Arg1090 se positionne forme une liaison avec le ribose de l'ATP (Figure 26). Cette interaction est importante dans la liaison à l'ATP et la fonction du transporteur. La disruption de cette interaction par l'incorporation d'un autre résidu pourrait donc perturber directement la fonction du transporteur.

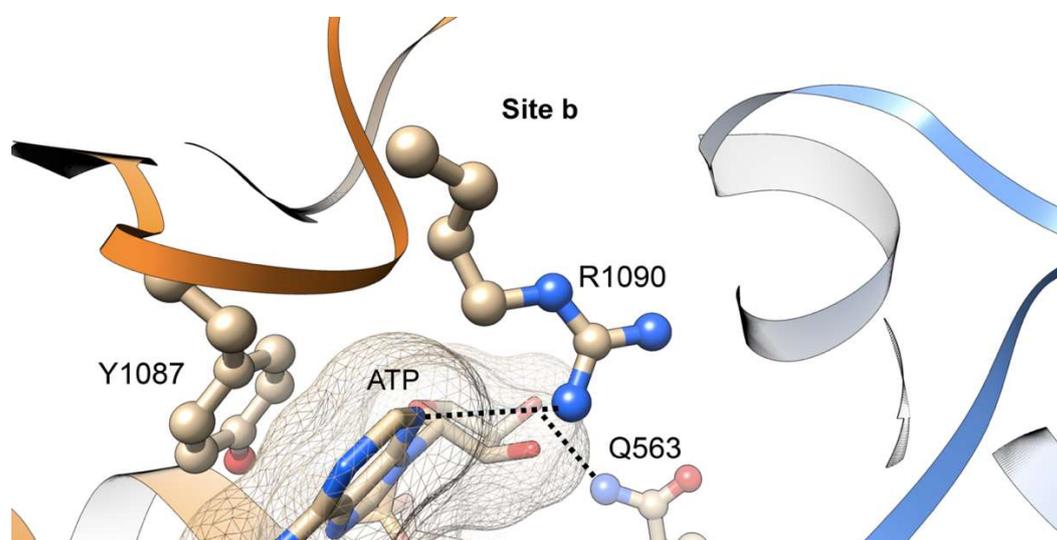


Figure 26 : Modèle de structure 3D du site b de liaison à l'ATP. L'arginine en position 1090 se situe dans le NBD2 (orange) et appartient au site b de liaison à l'ATP. Il forme une liaison avec le ribose de l'ATP. Le NBD1 apparaît en bleu.

Les variants R1090C et R1090W ne semble pas affecter la stabilité d'Abcb11

Pour aller plus loin dans la caractérisation des variants faux sens R1090C et R1090W, nous avons étudié la stabilité de ces mutants comparée à celle d'Abcb11 sauvage. Ainsi, nous avons évalué la décroissance d'Abcb11-GFP après inhibition de la synthèse protéique par le cycloheximide après 0, 4 ou 8 heures de traitements (Figure 27). Nous n'avons pas détecté de différence significative entre la courbe de décroissance d'Abcb11 sauvage et celles des variants R1090C et R1090W. Ces résultats laissent supposer que les variants probables produits de la translecture du variant R1090X sont des variants de classe III.

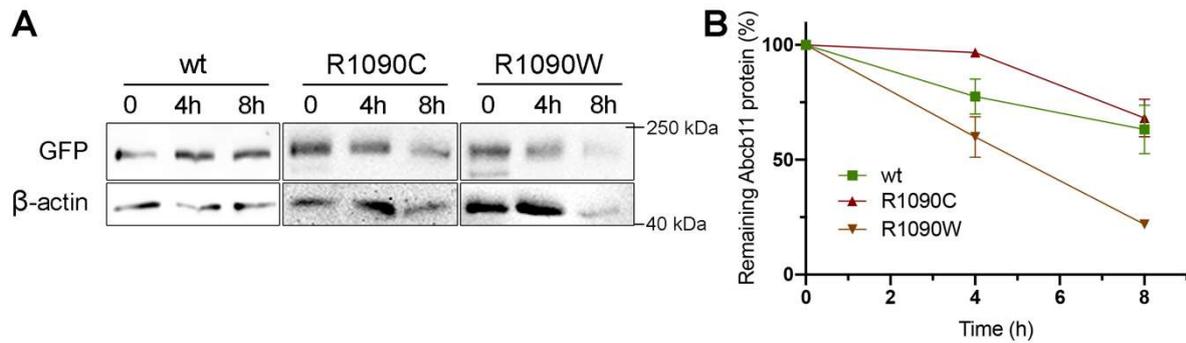


Figure 27 : Les variants R1090C et R1090W n'affectent pas la stabilité d'Abcb11. (A) Les cellules MDCK exprimant de manière stable Abcb11-GFP (wt ou G562D) sont traitées avec la cycloheximide (25 µg/mL) pour inhiber la synthèse protéique. L'expression d'Abcb11 est ensuite analysée par immunoblot aux temps indiqués. **(B)** Les profils électrophorétiques d'abcb11-GFP (wt, R1090C et R1090W) sont quantifiés à 0, 4 et 8 heures après l'ajout de cycloheximide. Les quantités relatives d'Abcb11-GFP sont calculées et normalisées par rapport à la β-actine. La quantité d'Abcb11-GFP au temps 0 heure a été considérée comme 100 %. La quantité d'Abcb11-GFP restante à 4 et 8 heures est exprimée en pourcentage du temps 0. Les moyennes (± SEM) de deux expériences indépendantes sont présentées.

Les potentiateurs de CFTR corrigent partiellement le défaut de fonction des variants R1090C et R1090W

Nous avons ensuite évalué l'effet de molécules potentiatrices de CFTR sur les variants R1090C et R1090W en mesurant le transport vectoriel de [³H]TC à travers une monocouche de cellules MDCK exprimant de manière stable Abcb11-GFP (R1090C ou R1090W) et Ntcp-cMyc (Figure 28). Comme attendu, nous avons observé une activité de transport de TC fortement réduite (35 % et 20 % de l'activité d'Abcb11-wt) pour les variants R1090C et R1090W en absence de traitement. Un traitement par 0,5 µM d'ivacaftor, de GLPG1837, de SBC040 ou de SBC219 semble induire une augmentation du transport de TC de 1,4 à 2,1 fois de ces deux variants même si les différences n'ont pas atteint une significativité statistique excepté pour le variant R1090W avec le GLPG1837. Ces résultats préliminaires montrent que les molécules potentiatrices de CFTR seraient également capables de corriger le défaut de fonction des variants R1090C et R1090W.

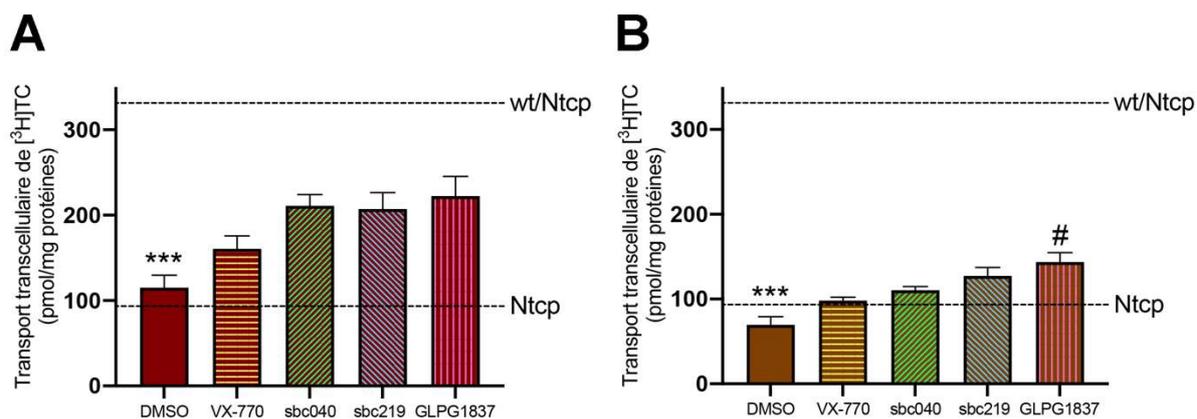


Figure 28 : Les potentiateurs de CFTR ont tendance à corriger le défaut de transport des variants R1090C et R1090W. Transport vectoriel de [³H]TC dans des cellules MDCK exprimant de façon stable Abcb11 (A) -R1090C ou (B) -R1090W en absence (DMSO) ou en présence de 0,5 μM d'ivacaftor, de GLPG1837, de SBC040 ou de SBC219. Les lignes pointillées haute et basse indiquent respectivement le transport de [³H]TC mesuré dans les cellules MDCK exprimant Abcb11-wt et Ntcp seul et celles exprimant Ntcp seul. Les moyennes (± SEM) d'au moins 3 expériences indépendantes pour chaque condition testée sont indiquées. ****p* < 0,005 vs wt/Ntcp et #*p* < 0,05 vs DMSO.

II – 3 – Le variant de classe II R1128C

II – 3 – 1 – Résultats préliminaires de l'équipe

Notre équipe a précédemment montré que le 4-PB permettait de restaurer partiellement *in vitro* l'adressage canaliculaire du variant de classe II R1128C (Gonzales *et al.* 2012). Chez le patient, le traitement par le 4-PB permet une amélioration des paramètres cliniques et biologiques de cholestase résultante d'une augmentation de la sécrétion des ABs dans la bile (Gonzales *et al.* 2015, Hayashi *et al.* 2016). Cependant, en raison de son effet émétique, l'observance à long terme peut être difficile pour les patients. Il est donc intéressant d'optimiser le traitement par l'utilisation de molécules potentiatrices permettant d'augmenter la fonction résiduelle des variants de classe II relocalisés aux CBs après traitements par le 4-PB, mais également de rechercher d'autres molécules capables de corriger l'adressage de ces variants de classe II. Ainsi, nous nous sommes intéressés à deux correcteurs de CFTR, l'elexacaftor et le tezacaftor, récemment approuvés cliniquement en combinaison avec la molécule potentiatrice ivacaftor dans le traitement de la mucoviscidose.

II – 3 – 2 – Résultats

L'arginine en position 1128 est impliquée dans la communication NBDs/MSDs

Afin d'évaluer le mécanisme sous-jacent au défaut d'adressage observé chez le variant R1128C, nous avons étudié ses interactions par modélisation moléculaire 3D d'ABCB11 en collaboration avec le Dr. Isabelle Callebaut. L'arg1128 est localisé dans le NBD2, à distance de l'interface NBD1/NBD2 et donc des sites de liaison à l'ATP. Cependant, il forme un pont salin avec Asp1131 et un pont hydrogène avec la Ser1144 (Figure 29). Il contribue ainsi à la structure interne de cette partie du NBD2. Par ailleurs, il se situe dans une zone de contact proche des ICLs et du « linker » NBD2/MSD2. Ainsi, un variant de l'Arg1128 induirait une déstabilisation locale de la protéine qui pourrait altérer directement l'assemblage entre le NBD2 et le MSD2.

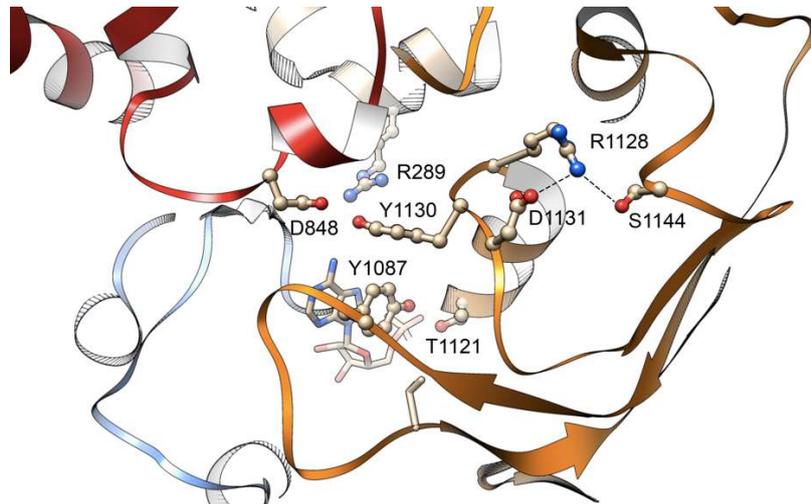


Figure 29 : Modélisation de la structure 3D du NBD2 d'ABCB11 humain. L'arginine en position 1128 (R1128) forme un pont salin avec l'Asp1131 (D1131) et un pont hydrogène avec la Ser1144 (S1144), contribuant ainsi à l'architecture du NBD2 (orange). Cette zone de contact est à proximité de l'ICL2 (beige) et ICL3 (rouge). Le NBD1 est coloré en bleu.

Les correcteurs de CFTR n'ont pas d'effets cytotoxiques dans les cellules HepG2 et MDCK

Les cytotoxicités de l'elezacaftor (VX-445) et du tezacaftor (VX-661) ont été évaluées par un test de viabilité au MTT après 24 heures de traitement à des concentrations entre 0,5 et 20 μM dans les cellules HepG2 et MDCK. Nous n'avons pas observé d'effets cytotoxiques majeurs de ces deux composés en-dessous de 10 μM dans les deux types cellulaires bien qu'une légère tendance à la diminution soit observée dans les cellules HepG2 traitées avec l'elezacaftor.

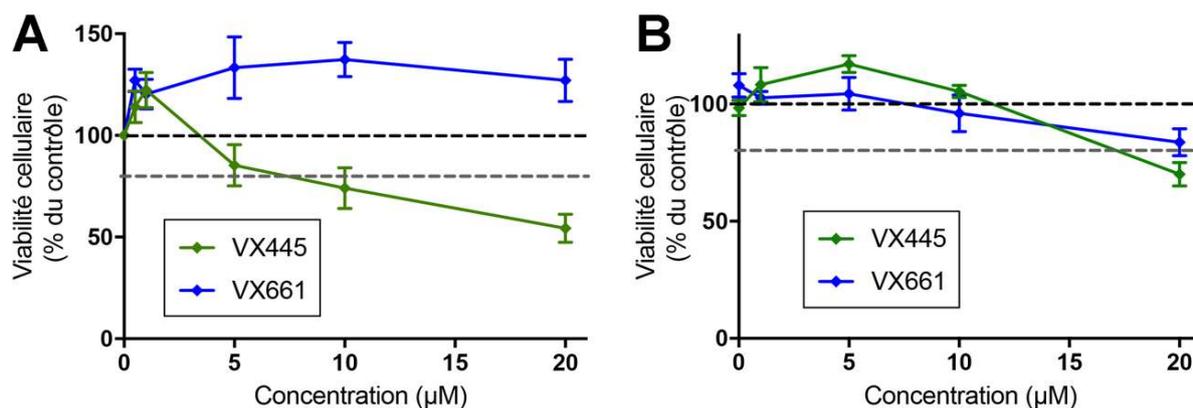


Figure 30 : Cytotoxicité de l'elexacaftor (VX445) et du tezacaftor (VX661). Les cellules (A) HepG2 et (B) MDCK ont été traitées aux concentrations indiquées avec le VX445 ou le VX661 durant 24 heures. La viabilité cellulaire a ensuite été évaluée par le test MTT et exprimée en pourcentage des moyennes des cellules témoins traitées par le véhicule (DMSO). Les moyennes (\pm SEM) d'au moins trois expériences indépendantes par condition réalisées en triplicata sont présentées.

Les correcteurs de CFTR corrigent partiellement l'adressage du variant R1128C

Afin d'identifier de nouveaux correcteurs pour le variant de classe II R1128C, nous avons testé la possibilité de repositionner les correcteurs de CFTR ayant récemment été approuvés cliniquement en combinaison avec la molécule potentiatrice ivacaftor dans le traitement de la mucoviscidose et ayant montré une capacité à restaurer l'adressage du variant CFTR- Δ F508 à la membrane plasmique. Ainsi, le potentiel de l'elexacaftor et du tezacaftor à restaurer l'adressage canaliculaire du variant R1128C a été étudié dans les cellules HepG2, une lignée cellulaire dérivée d'un hépatome humain formant des pseudo-canalicules biliaires en culture (Figure 29). Dans ces cellules polarisées, Abcb11-wt colocalise avec ABCC2 au niveau des CBs, ce qui n'est pas le cas du variant R1128C qui présente une localisation cytoplasmique. Après 24 heures de traitement avec 0,5, 1 ou 10 μ M d'elexacaftor (VX-445) ou de tezacaftor (VX-661), ou la combinaison des deux, une légère relocalisation au niveau du pôle canaliculaire semble se mettre en place. Cependant même après traitement, il est difficile de distinguer une colocalisation avec ABCC2. La quantification des cellules ayant une relocalisation partielle au pôle canaliculaire montre une plus forte correction à 10 μ M qu'à 0,5 et 1 μ M avec les deux molécules (elexacaftor x2 vs x5 et tezacaftor x8 vs x9). L'effet correcteur partiel semble plus important avec le tezacaftor (9 fois la condition contrôle DMSO) qu'avec l'elexacaftor (5 fois la condition contrôle DMSO). La

RESULTATS

combinaison de l'elezacaftor à 0,5 μM et du tezacaftor à 1 μM semble avoir un léger effet additif sur la correction de l'adressage partiel du variant R1128C. L'ensemble de ces résultats laisse supposer que ces correcteurs sont capables de relocaliser partiellement le variant R1128C vers le pôle canaliculaire.

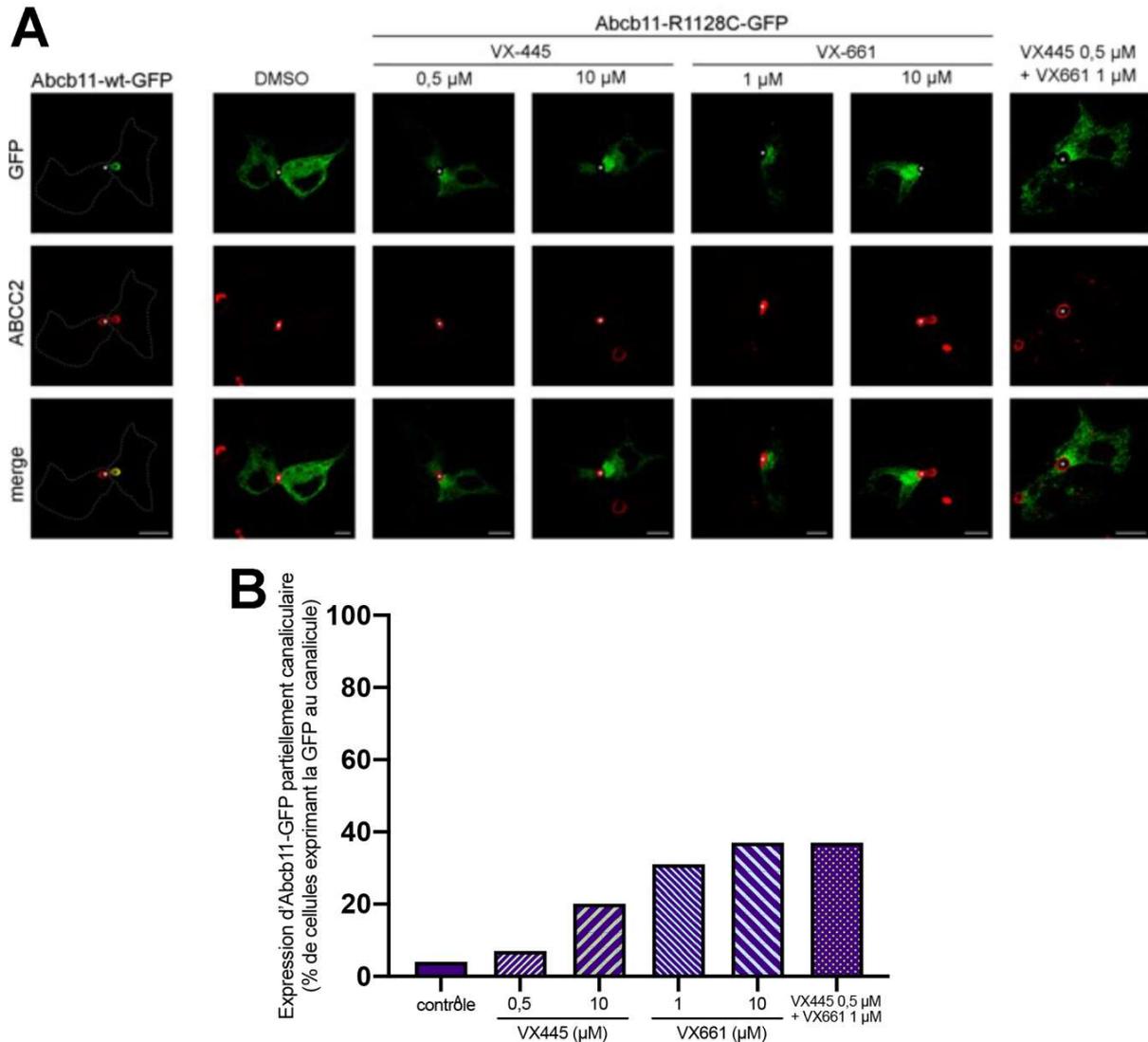


Figure 31 : Relocalisation partielle aux canalicules biliaires du variant R1128C après traitements correcteurs. (A) Les cellules HepG2 ont été transfectées de manière transitoire avec Abcb11-GFP (wt et R1128C). Après 24 heures avec ou sans elezacaftor (VX445) et/ou tezacaftor (VX661) aux concentrations indiquées, les cellules ont été fixées et perméabilisées. L'immunomarquage de l'Abcb11-GFP (vert) et de l'ABCC2 endogène (rouge) a été visualisé par microscopie confocale. Ces résultats sont représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes par condition. Barres : 10 μm . *: canalicules biliaires. **(B)** Quantification de A. Les résultats sont issus d'une unique quantification.

Nous avons ensuite étudié par immunoblot l'effet de ces correcteurs sur la maturation du variant R1128C dans des lysats de cellules MDCK exprimant de manière stable Abcb11-GFP (Figure 30). Le variant R1128C est principalement présent à un poids moléculaire de 160 kDa en raison d'une glycosylation incomplète. Un traitement de 24 heures avec l'elezacaftor ou le tezacaftor à différentes concentrations permet de corriger partiellement la maturation du variant R1128C, visualisé par l'apparition d'une bande à 190 kDa témoin d'une glycosylation complète. La quantification de ce résultat montre une augmentation de la maturation de 2 à 3 fois par rapport à la condition contrôle (DMSO). Nous n'avons pas observé de différences majeures entre les deux correcteurs ou entre les différentes concentrations.

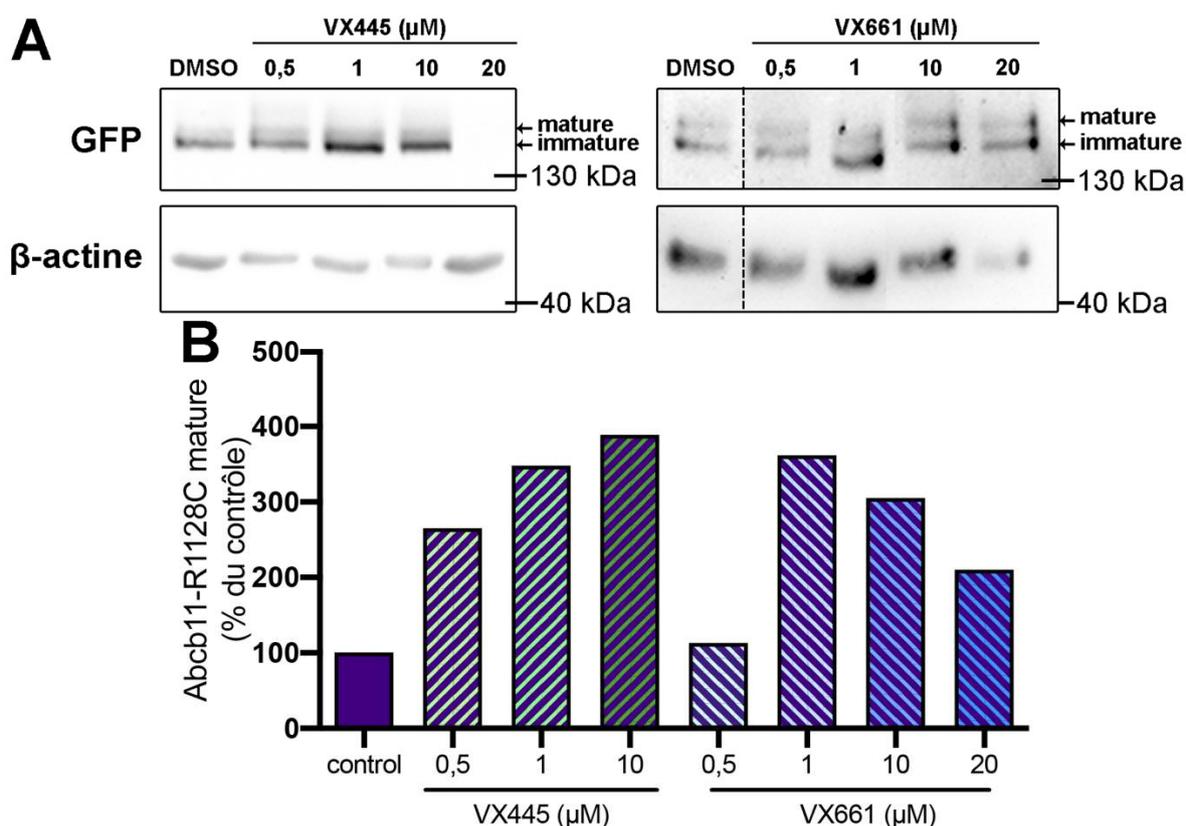


Figure 32 : Les correcteurs de CFTR restaurent partiellement la maturation du variant R1128C. (A) Les cellules MDCK exprimant de manière stable Abcb11-GFP (wt ou R1128C) sont traitées 24 heures avec 0,1% de DMSO (contrôle), l'elezacaftor (VX445) ou le tezacaftor (VX661) aux concentrations indiquées. Les cellules sont ensuite lysées et analysées par immunoblot en utilisant les anticorps indiqués. Les formes matures et immatures d'Abcb11-GFP sont indiquées par des flèches ainsi que les marqueurs de poids moléculaire. Ces résultats représentent une expérience **(B)** Analyse densitométrique de A. La quantité de forme mature d'Abcb11-GFP R1128C a été quantifiée et normalisée par rapport à la quantité de β-actine.

Les correcteurs de CFTR restaurent partiellement le transport d'acides biliaires du variant R1128C

Enfin, nous avons évalué si la correction de l'adressage canaliculaire du variant R1128C permettait d'obtenir des quantités suffisantes d'Abcb11 fonctionnels à la membrane canaliculaire pour corriger l'activité de transport d'ABs. Nous avons pour cela mesuré le transport vectoriel de [³H]TC à travers une monocouche de cellules MDCK exprimant de manière stable Abcb11-GFP (wt ou R1128C) et Ntcp-cMyc avec ou sans traitement avec le 4-PB ou les correcteurs de CFTR en combinaison ou non avec des molécules potentiatrices (Figure 31). L'activité de transport de TC du variant R1128C était fortement réduite (de 60 %) par rapport à celle d'Abcb11-wt. Cette activité était augmentée de 1,2 fois par un traitement à 1mM de 4-PB ou 1 ou 10 µM de tezacaftor (VX-661) et de 1,4 à 1,5 fois par un traitement à 0,5 ou 10 µM d'elexacaftor (VX-445) bien qu'aucune significativité statistique n'ait été démontrée. En revanche, la combinaison de l'elexacaftor à 0,5 µM et du tezacaftor à 1 µM permettait d'augmenter significativement de 1,8 fois l'activité de transport de TC du variant R1128C. De même, le traitement du variant R1128C avec l'ivacaftor à 10 µM permettait d'augmenter significativement l'activité de transport de TC de 1,5 fois et la combinaison de 1mM de 4-PB et 0,5 µM d'ivacaftor induisait une augmentation de l'activité du transporteur de 1,7 fois. Ces résultats indiquent que la fonction du transporteur adressé au canalicule pouvait être potentialisée. Cependant de façon surprenante, la combinaison des correcteurs de CFTR (elexacaftor et tezacaftor) avec un potentiateur de CFTR (Ivacaftor, GLPG1837, SBC040 ou SBC219) induisait systématiquement une diminution (entre 30 et 80 %) de l'activité de transport de TC par rapport à la combinaison correctrice seule. Il est à noter que ni les correcteurs, ni les potentiateurs, ni leur combinaison n'induisaient d'effet sur l'activité de transport des cellules exprimant Abcb11-wt et Ntcp ou Ntcp seul. L'ensemble de ces résultats montrent que, lorsqu'il est correctement adressé au CB biliaire, le variant R1128C a une fonction résiduelle qui peut être potentialisée, à condition d'utiliser le correcteur adéquat. Cependant, le transport de TC est optimal avec la combinaison des correcteurs elexacaftor et tezacaftor.

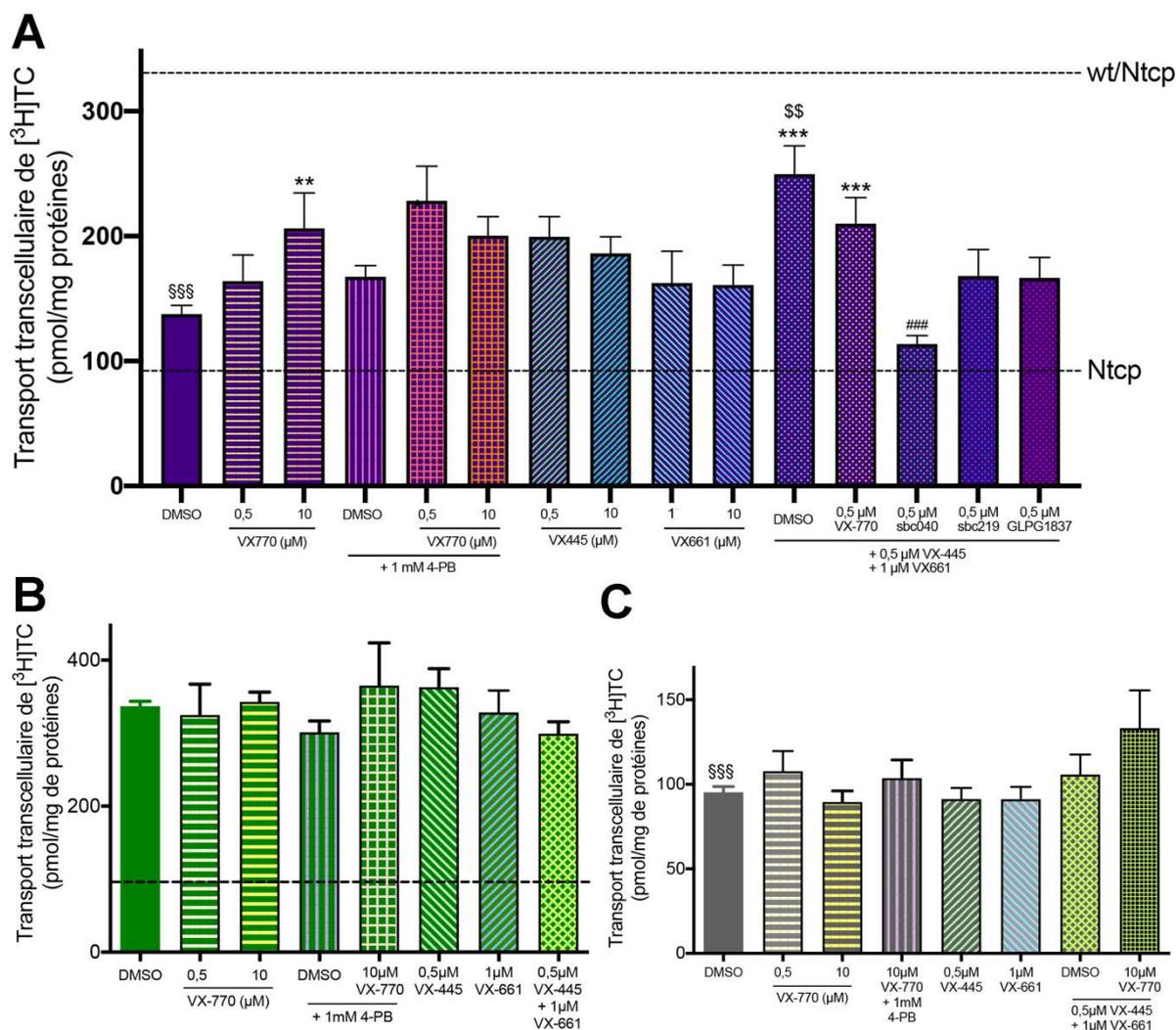


Figure 33 : Les correcteurs de CFTR corrigent partiellement le transport d'acides biliaries du variant R1128C. Transport vectoriel de $[^3\text{H}]\text{TC}$ dans des cellules MDCK exprimant de façon stable (A) Abcb11-R1128C, (B) Abcb11-wt et ntcp ou (C) Ntcp seul en absence ou en présence des correcteurs et/ou potentiateurs aux concentrations indiquées. Les lignes pointillées haute et basse indiquent respectivement le transport de $[^3\text{H}]\text{TC}$ mesuré dans les cellules MDCK exprimant Abcb11-wt et Ntcp seul et celles exprimant Ntcp seul. Les moyennes (\pm SEM) d'au moins 3 expériences indépendantes pour chaque condition testée sont indiquées. $^{\text{sss}}p < 0,005$ vs wt, $^{\text{**}}p < 0,01$, $^{\text{***}}p < 0,005$ vs Témoin DMSO, $^{\text{ss}}p < 0,01$ vs 4-PB+DMSO, $^{\text{###}}p < 0,005$ vs bi-thérapie VX445 + VX661.

~ DISCUSSION ~

Dans la première partie de cette thèse, je me suis intéressée à la caractérisation de trois variants faux sens d'*ABCB11* identifiées chez des patients atteints de PFIC2 et j'ai montré que les molécules potentiatrices de CFTR permettaient de corriger en partie leurs défauts moléculaires. Dans la seconde partie, je me suis intéressée à la faisabilité d'une combinaison de traitements avec des molécules potentiatrices.

La caractérisation des variants identifiés chez les patients est un prérequis indispensable dans le processus de médecine personnalisée qu'est la thérapie ciblée. En effet, en fonction de la classe des variants identifiées chez les patients, différentes stratégies thérapeutiques peuvent être envisagées. D'autre part, la sévérité du phénotype du patient ainsi que la réponse aux traitements dépendent également du type de variants portés par le patient. En effet, Van Wessel *et al.* ont récemment montré que les patients porteurs des variants les moins sévères [« BSEP1 » et « BSEP2 »] répondaient le mieux à la dérivation biliaire (van Wessel *et al.* 2020). De plus, l'âge de survie avec un foie natif chez ces patients était plus important (7 à 20,4 ans). Une autre équipe a montré que le niveau d'expression d'*ABCB11* à la membrane était directement corrélé à la sévérité de la pathologie (Lam *et al.* 2007). D'après ces données, on peut supposer que les variants les plus sévères sont ceux de classe I, suivies par ceux de classe II entraînant une absence d'expression à la membrane canaliculaire, suivies de ceux de classe III et IV. Cependant, ceci n'est pas totalement juste, car certains variants de classe III tels que le G562D entraînent une absence quasi totale de fonction de la protéine à l'origine d'un phénotype sévère comme c'est le cas pour son homologue CFTR-G551D (Tsui 1995, Li *et al.* 1996). Par ailleurs, il existe une grande hétérogénéité des variants faux sens en termes de pathogénicité. Récemment, le centre de référence des maladies rares a identifié un nouveau variant présent à l'état homozygote chez un patient atteint de PFIC2 : le variant T463P. Un phénotype similaire à celui du variant T463I était alors attendu. Cependant, ce patient a développé une insuffisance hépatique et un carcinome hépatocellulaire avant l'âge d'un an, conduisant à une transplantation hépatique. Ainsi, bien que la modélisation moléculaire permette de

DISCUSSION

comprendre le rôle du résidu sauvage et ainsi de prédire de façon pertinente l'effet de variants, il est difficile de prédire avec certitude la sévérité de la pathologie. En complément, des approches de dynamique moléculaire pourraient offrir une meilleure compréhension des modifications structurales à l'origine des défauts observés ainsi que des mécanismes moléculaires impliqués dans leur correction (Ben Saad *et al.* 2020). Cependant, ces approches virtuelles ne peuvent se substituer aux études *in vitro* qui permettent non seulement de valider la caractérisation des variants mais également d'établir une preuve de concept de l'efficacité des molécules. D'autant plus que, certains variants peuvent, avec ou sans correction, être à l'origine de défauts multiples difficilement prédictibles. Par exemple, le variant de classe I R1090X induit une absence de production de la protéine. Le variant de l'homologue de l'Arg1090 dans le NBD1 d'ABCB4 (R406Q) induit une symptomatologie proche du syndrome *Low Phospholipid-Associated Cholelithiasis* (LPAC, (Poupon *et al.* 2010)). La translecture du variant R1090X par la gentamicine peut induire la production soit de la protéine sauvage, soit de deux variants faux sens de classe III (R1090C et R1090W). Cela souligne d'une part le rôle primordial des NBDs dans la fonction des transporteurs ABC et d'autre part l'importance d'étudier *in vitro* l'effet de chaque variant individuellement afin de choisir la pharmacothérapie ciblée la plus adéquate.

Les modèles cellulaires utilisés dans cette thèse sont bien établis pour l'étude de l'expression, la maturation, la localisation et la fonction d'ABCB11 (Kubitz *et al.* 2004, Harris *et al.* 2004, Mita *et al.* 2005, Decaens *et al.* 2008, Telbisz et Homolya 2016). De plus il existe généralement une bonne corrélation entre les effets observés *in vitro* et le phénotype du patient (Lam *et al.* 2007). Ils conviennent particulièrement aux approches de repositionnement de médicaments pour lesquelles la pharmacocinétique et la toxicité des molécules sont déjà établies. Tout en réduisant le délai et le coût de développement du médicament, ils permettent une application rapide chez les patients atteints de déficit en ABCB11 comme ça a été le cas pour le repositionnement du 4-PB et du GPB dans la PFIC2 (Gonzales *et al.* 2012, Gonzales *et al.* 2015, Almes *et al.* 2020). En revanche, pour le développement de nouvelles molécules dont le potentiel

thérapeutique reste à démontrer, les modèles animaux représenteraient un complément indispensable. A l'heure actuelle, il existe deux types de modèles animaux invalidés pour le gène *Abcb11*, le modèle rongeur (souris et rat) (Wang *et al.* 2001, Wang *et al.* 2003, Cheng *et al.* 2016a, Pankowicz *et al.* 2018) et le modèle poisson zèbre (Ellis *et al.* 2018). Comme il a été décrit pour ABCB4 et ABCC6, la réintroduction de différents variants d'*ABCB11* dans ces modèles, soit par l'administration de vecteurs viraux (AAV8) (Aronson *et al.* 2019, Weber *et al.* 2019) soit par une injection hydrodynamique de plasmides spécifiques (Le Saux *et al.* 2011), pourrait permettre de reproduire le phénotype du patient. Ce type de modèles pourrait être utilisé pour la validation préclinique de nouvelles molécules de pharmacothérapie ciblée.

La pharmacothérapie ciblée par l'utilisation de molécules potentiatrices est bien documentée pour corriger les défauts moléculaires de certains variants de classe III de CFTR. Les variants particulièrement propices à cette approche étant ceux altérant la fonction du transporteur sans modifier son expression membranaire, nous nous sommes intéressés dans un premier temps au variant T463I, localisé dans un NBD et au niveau du NBS-a. En effet, les NBDs des transporteurs ABC contiennent des motifs consensus indispensables à la fonction de ces transporteurs (Szollosi *et al.* 2018, Stockner *et al.* 2020). Nous avons ensuite étendu notre recherche à deux autres variants localisés d'une part dans le NBS-b (G562D) et d'autre part dans un TM (A257V). Comme prédit par la modélisation moléculaire 3D, ces trois variants, bien que correctement adressés aux CBs, présentaient un défaut de transport d'ABs. Le variant G562D avait l'effet le plus délétère sur la fonction d'*Abcb11*, probablement lié à sa localisation dans le site de liaison à l'ATP canonique (NBS-b). En effet, il a été démontré qu'*ABCB11* possède des sites de liaison à l'ATP asymétriques ; le NBS-a est dégénéré et peut se lier à l'ATP sans être capable de l'hydrolyser alors que le NBS-b se lie et hydrolyse l'ATP (Sohail *et al.* 2017). L'hydrolyse de l'ATP étant indispensable à la séparation des NBDs pour permettre un nouveau cycle de transport (Stockner *et al.* 2020), un défaut dans ce site peut alors avoir un effet drastique sur la fonction du transporteur comme observé pour son homologue dans CFTR-G551D (Li *et al.* 1996). Le variant A257V à

DISCUSSION

l'inverse avait le phénotype le plus léger, probablement lié à sa localisation dans un TM plutôt que dans un NBD. Bien qu'elle puisse altérer indirectement la fonction de transport d'ABCB11, nous avons montré que ce variant induisait un défaut de stabilité du transporteur. Sa localisation dans un TM pourrait être à l'origine d'une déstabilisation de la dynamique d'ABCB11 à la membrane en plus d'un défaut de fonction.

Dans une optique de thérapie par l'utilisation de molécules potentiatrices, l'ivacaftor est probablement la molécule la plus prometteuse à l'heure actuelle. Cette petite molécule découverte par criblage haut débit a sans nul doute révolutionné la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose. Première molécule approuvée cliniquement pour le traitement de certains variants de classe III de CFTR (De Boeck *et al.* 2014), son efficacité a plus tard été démontrée pour d'autres transporteurs ABC tels que ABCB4 et ABCA3 (Delaunay Bruneau *et al.* 2017, Kinting *et al.* 2019). Nous avons également montré que l'ivacaftor corrigeait le défaut de fonction des variants de classe III et IV d'Abcb11 étudiés dans nos modèles, ramenant la fonction de transport à un niveau similaire à la protéine sauvage dans le cas du variant A257V. Ces résultats montrent que l'ivacaftor pourrait être utilisé en clinique pour traiter certains patients atteints de déficits en ABCB11 et porteurs de ces classes de variants. Le fait qu'une même molécule puisse agir sur plusieurs transporteurs peut s'expliquer par la forte homologie de structure qu'il existe parmi les membres cette famille. Cela laisse donc présager un mécanisme d'action commun qui à ce jour n'est pas complètement élucidé. La liaison de l'ivacaftor au transporteur pourrait par exemple induire des changements de conformation favorisant la liaison de l'ATP. Pour CFTR, un premier site de liaison de l'ivacaftor a été mis en évidence à l'interface protéine/lipide au niveau des TM4, 5 et 8 de CFTR (Liu *et al.* 2019). La liaison de l'ivacaftor sur ce site modifierait la structure du canal, facilitant ainsi son ouverture de façon ATP-indépendante tout en prolongeant son temps d'ouverture de façon ATP-dépendant, avec pour résultante une augmentation de la sécrétion d'ion Cl⁻ (Van Goor *et al.* 2009, Eckford *et al.* 2012, Jih et Hwang 2013). Cependant, ce site ne semble pas être présent dans les autres

transporteurs ABC (Liu *et al.* 2019) ce qui peut expliquer le fait que l'ivacaftor potentialise la fonction de la protéine sauvage CFTR, mais pas celle d'ABCB11. Plus récemment, un autre site de liaison de l'ivacaftor au niveau de l'ICL4 (reliant le NBD1 et le TM2) de CFTR a été mis en évidence (Laselva *et al.* 2021b). Des investigations sont en cours afin de déterminer si ce site est présent chez d'autres transporteurs ABC. Un autre site de liaison de l'ivacaftor a été mis en évidence chez ABCB1 au niveau du site de liaison au substrat, dans la grande cavité centrale qui communique avec le cytoplasme et la bicouche lipidique (Barbieri *et al.* 2021). Ce site semble absent de CFTR. Il a été proposé que du fait de la présence de ce site, l'ivacaftor pourrait être un substrat d'ABCB1 (Lingam *et al.* 2017).

Bien que l'ivacaftor soit une molécule très prometteuse, le développement d'autres molécules potentiatrices est indispensable. D'une part afin d'optimiser la fonction de variants sévères tels que le G562D et obtenir des niveaux satisfaisants de correction permettant d'améliorer le phénotype du patient. D'autre part pour limiter les interactions médicamenteuses telles qu'une inhibition des correcteurs lumacaftor et elexacaftor par l'ivacaftor (Cholon *et al.* 2014, Veit *et al.* 2014). Nous nous sommes donc intéressés à d'autres molécules potentiatrices prometteuses de CFTR. Des essais cliniques sont en cours pour évaluer le bénéfice clinique du GLPG1837 chez des patients atteints de mucoviscidose (Davies *et al.* 2019). Cette molécule a montré une efficacité accrue sur les variants de classe III de CFTR par rapport à l'ivacaftor (Van der Plas *et al.* 2018). Cependant dans nos modèles d'étude, le GLPG1837 a montré une efficacité équivalente à celle de l'ivacaftor. Il a été montré que le GLPG1837 se lie sur le même site de liaison que l'ivacaftor à l'interface lipide/protéine, qui est absent chez les autres transporteurs ABC (Liu *et al.* 2019). Il est possible que l'effet plus important du GLP1837 par rapport à l'ivacaftor sur CFTR soit lié à la présence de ce site. Il serait donc intéressant de rechercher d'autres sites de liaison du GLPG1837 chez les autres transporteurs ABC et d'identifier si ces sites sont identiques à ceux de l'ivacaftor. Plus récemment, les molécules SBC040 et SBC219 ont été élaborées par une approche de modélisation moléculaire pour interagir avec un site localisé à l'interface entre l'ICL4 et

DISCUSSION

le NBD1, qui est altéré dans la structure 3D du variant CFTR- Δ F508 (Froux *et al.* 2020). Initialement modélisées pour induire la correction de l'adressage de ce variant, il s'est avéré que ces molécules avaient finalement une activité potentiatrice sur plusieurs variants de classe III sensibles à l'ivacaftor. Nous avons montré que ces molécules étaient également capables de potentialiser la fonction de transport d'ABs des variants d'Abcb11 étudiés. Cependant, contrairement à ce qui a été observé pour CFTR, nous n'avons pas observé d'effet plus important du SBC219 par rapport au SBC040. De plus, le variant G562D d'Abcb11 a montré une réponse positive au SBC040 alors qu'une potentialisation faible, voire nulle, a été observée chez son homologue CFTR-G551D. Enfin, une potentialisation de la fonction de la protéine sauvage est observée chez CFTR alors que ce n'est pas le cas pour Abcb11. Les interactions de ces molécules pourraient donc être différentes entre un canal tel que CFTR et un transporteur tel qu'ABCB11. Des similitudes ont également été observées telles que l'effet synergique de la combinaison de l'ivacaftor et des SBCs. Cela suggère que les sites de liaison de ces molécules sont différents de ceux de l'ivacaftor. Il serait donc également intéressant d'étudier les sites de liaison potentiels de ces molécules sur ABCB11 par des approches de « *docking* » moléculaire *in silico*.

De manière intéressante, nous avons observé une diminution de la stabilité d'Abcb11 wt ou du variant G562D après un traitement par l'ivacaftor. Cependant, les résultats sont non significatifs et doivent être approfondis. Ils pourraient être en rapport avec une cytotoxicité de l'ivacaftor. En effet, après un traitement de 2h avec de l'ivacaftor à 10 μ M, on observe une tendance à la diminution de la viabilité cellulaire. Il est probable que cet effet à 24 heures soit plus important. Il faudrait donc réaliser un test de toxicité cellulaire après 24 heures de traitement avec 10 μ M d'ivacaftor d'une part et tester la stabilité d'autres protéines membranaires de MDCK pour voir si un effet similaire est observé. Par ailleurs, un test de biotinylation de surface, plus sensible et plus informatif que le test de stabilité à la cycloheximide, pourrait permettre d'évaluer de façon plus précise la stabilité du transporteur à la membrane apicale.

L'étude de telles molécules potentiatrices est également intéressante afin d'optimiser les combinaisons de traitements. Dans cette optique, nous avons étudié les molécules potentiatrices de CFTR sur les variants de classe III R1090C et R1090W afin de préciser la molécule potentiatrice la plus adaptée à utiliser en combinaison avec un inducteur de translecture pour le traitement du variant de classe I R1090X. Comme précédemment, une amélioration du transport d'ABs a été observée pour ces variants après un traitement avec une des molécules potentiatrices précédemment étudiées (GLPG1837). Ces résultats constituent une preuve de concept de l'intérêt de l'utilisation de ces molécules potentiatrices en bithérapie avec un inducteur de translecture pour corriger le défaut de variants stop tel que le variant R1090X. De plus, cela renforce l'idée que ces molécules peuvent être repositionnées pour le traitement de certains patients atteints de déficits en ABCB11.

L'ivacaftor est autorisé en clinique en combinaison avec le lumacaftor (Clancy *et al.* 2012), le tezacaftor (Talamo Guevara et McColley 2017), mais également en triple combinaison avec l'elexacaftor et le tezacaftor (Hoy 2019). Cette dernière montre des résultats très prometteurs dans le traitement de la mucoviscidose. Nous avons donc voulu comparer le traitement correcteur utilisé actuellement dans le cadre de la PFIC2, le 4PB, avec cette nouvelle génération de correcteurs. Nous avons observé que l'elexacaftor et le tezacaftor seuls induisaient une relocalisation partielle du variant de classe II R1128C au niveau du pôle canaliculaire, mais moins franche que celle observée après traitement par le 4-PB. Cette relocalisation s'accompagne d'une amélioration du transport d'ABs par le variant R1128C, à un niveau similaire à celui observé après traitement par le 4-PB. Il est à noter que les concentrations utilisées pour ces deux molécules étaient 100 à 2000 fois moins importantes que celle du 4-PB (0,5 à 10 μ M vs 1mM). Il serait donc intéressant de comparer ces deux types de traitements à concentrations égales. Si le 4-PB pouvait être utilisé à une dose inférieure chez le patient, cela permettrait de limiter l'effet aversif et donc d'améliorer l'observance pour le traitement. A défaut, le tezacaftor et l'elexacaftor pourraient être utilisés. D'autant plus qu'un effet additif sur le transport d'ABs a été observé avec la bithérapie correctrice

DISCUSSION

(elexacaftor et tezacaftor) sur le variant R1128C d'Abcb11. Cela suggère que comme pour CFTR, le site de liaison diffère entre les deux correcteurs ce qui permettrait un effet maximal de chacune des molécules (Capurro *et al.* 2021). Cependant et de façon surprenante, nous avons observé que toutes les molécules potentiatriques de CFTR étudiées précédemment induisaient une diminution de l'effet de la bithérapie correctrice. Il avait été reporté un effet similaire de l'ivacaftor en combinaison avec le lumacaftor ou avec son dérivé le tezacaftor. Cette déstabilisation serait due aux propriétés lipophiles de l'ivacaftor qui perturberait les rafts lipidiques de la membrane plasmique en s'y insérant (Chin *et al.* 2018). Il est possible que pour CFTR, l'effet inhibiteur de l'ivacaftor sur le tezacaftor soit gommé par l'activité potentiatrice de l'elexacaftor (Laselva *et al.* 2021a). Un mécanisme similaire d'inhibition des correcteurs peut être proposé pour le GLPG1837 qui partage le même site de liaison que l'ivacaftor. De plus comme pour l'ivacaftor, un effet inhibiteur avait été observé par la combinaison du lumacaftor et du SBC040 (Froux *et al.* 2020). Il serait intéressant d'investiguer de façon plus approfondie les mécanismes d'interactions sous-jacents à l'inhibition des effets de ces correcteurs par ces molécules potentiatriques. D'autant plus que contrairement aux correcteurs de CFTR, un effet additif sur le transport d'ABs du variant R1128C était observé par la combinaison du 4-PB et de l'ivacaftor. Ceci peut s'expliquer par le fait que le mécanisme d'action du 4-PB ne nécessiterait pas une interaction directe avec le transporteur, mais plutôt une modulation de la composition et de la concentration des composants du réseau protéostatique (Wright *et al.* 2004, Kolb *et al.* 2015). Une thérapie combinatoire alliant le 4-PB et l'ivacaftor pourrait donc être envisagée dans le traitement de patients porteurs de variants de classe II d'*ABCB11* localisées dans un NBD telles que le variant R1128C.

~ CONCLUSION ET PERSPECTIVES ~

L'ensemble des travaux réalisés au cours de ma thèse a permis d'une part la caractérisation de trois variants d'ABCB11 et d'autre part l'identification de nouvelles molécules capables de corriger les défauts dus aux variants du transporteur biliaire ABCB11 (Tableau 2).

La modélisation moléculaire 3D est un outil privilégié. Par l'étude de la relation structure/fonction du transporteur, il est possible de mieux comprendre l'influence des variants sur le transporteur et par conséquent envisager leur correction spécifique. Par cet outil et en collaboration avec le Dr. Isabelle Callebaut, nous avons pu sélectionner, parmi les variants identifiées chez les patients, ceux qui étaient susceptibles de répondre positivement à un traitement par des molécules potentiatrices. Nous avons ensuite mis en évidence le défaut de classe III des variants T463I et G562D et le défaut de classe IV du variant A257V. De plus, cet outil permet une meilleure compréhension des mécanismes inhérents à la fonction d'ABCB11, mais également des autres transporteurs ABC qui partagent des caractéristiques communes.

Dans une optique de développement de médecine personnalisée, cette étude a permis d'identifier des molécules potentiatrices (ivacaftor, GLPG1837, SBC040 et SBC219) et correctrices (elezacaftor et tezacaftor) de CFTR comme traitement potentiel pour les patients atteints de déficit en ABCB11. Le repositionnement de médicaments tel que l'ivacaftor est une approche de choix, car il permet une utilisation rapide chez les patients. À terme, le repositionnement de l'ivacaftor pourrait constituer une alternative de choix à la transplantation hépatique pour les patients atteints de déficits en ABCB11 porteurs de variants de classe III. De plus, selon les associations de variants identifiées chez les patients, il serait possible de proposer des combinaisons thérapeutiques personnalisées comprenant des molécules inductrices de translecture, correctrices, potentiatrices et/ou stabilisatrices et ainsi d'optimiser le traitement des patients.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Outre l'identification de nouvelles molécules capables de répondre à un besoin thérapeutique, ce projet peut permettre le développement de nouveaux outils et modèles nécessaires à une meilleure compréhension des maladies humaines et du mode d'action des médicaments candidats.

Classe	Défaut	Variants	Stratégies thérapeutiques
Classe I	Expression protéique	R1090X	Inducteurs de translecture : Gentamicine + Modulateurs d'activité : <u>ivacaftor</u> , GLPG1837, SBC040, SBC219
Classe II	Maturation et adressage	R1128C	Correcteurs d'adressage : <u>4-PB</u> ou <u>elexacaftor</u> et/ou <u>tezacaftor</u> + Modulateurs d'activité : <u>ivacaftor</u> , GLPG1837, SBC040, SBC219
Classe III	Fonction	T463I G562D R1090C R1090W	Modulateurs d'activité : <u>ivacaftor</u> , GLPG1837, SBC040, SBC219
Classe IV	Stabilité	A257V	(Stabilisateurs) +/- Modulateurs d'activité : <u>ivacaftor</u> , GLPG1837, SBC040, SBC219

Tableau 2 : Classification des variants d'ABCB11 et stratégies thérapeutiques étudiées. Sont soulignés les molécules ayant une autorisation de mise sur le marché européenne dans le cadre d'autres pathologies.

ANNEXES

Domaines	Variations	Ho, He, HeC	Origine	Pathologie	SNAP2	PROVEAN	Classe	IHC ABCB11	Commentaires	Références
	M1K	Ho			N	N	Classe I			18
	M1V			PFIC2, ICP	N	N				1, 13
	R8P				D	N		Réduit		13
	R8X	HeC		PFIC2			Classe I			12, 18
	G19R			PFIC2	N	N				1, 5, 13
	S25X	He	UE	PFIC2	N	N	Classe I			1, 4, 13
	D26D	He	Asie	PFIC2	N	N				12, 15
	V43I	He		PFIC2	N	N		Normal ou réduit	Pourrait altérer l'adressage membranaire	1, 5, 12, 13
	O49X	HeC		PFIC2			Classe I			13, 18
	L50S	HeC, He	UE	PFIC2	D	D	Classe II	Anormal	Protéine immature	1, 2, 4, 5, 13, 18
	L50W	Hom			D	D				18
	R52W	HeC	UE	PFIC2	D	D	Classe II	Partiel		13, 16, 18
	S56L				N	N				1, 5
	W60X			PFIC2						13
	M62K			PFIC2	D	D				1, 5, 13
	S66N	HeC	UE	PFIC2	N	N				13, 14, 18
	C68Y			PFIC2	N	D				1, 5, 13
TM1	L71H	HeC			N	D				5, 13, 18
	I74R	He		BRIC2	D	N		Absent		13
	P77A				D	D		Normal		13
	T87R			AUTRES	D	D				1, 5
	F90F	He	Asie	PFIC2, BRIC2	N	N			Polymorphisme	2, 12, 15
	Y93S	HeC			N	N				18
	Y93X	HeC		PFIC2						12
	D94N	Ho			D	N				18
	E96X	He		PFIC2						1, 5, 12, 13
	O101D69X	HeC					Classe I	Réduit		18
	O101D68X						Classe I			21
	C107R	Ho, HeC		PFIC2	D	D	Classe I			1, 5, 13, 18
Gly										
	I112T			PFIC2	N	N				1, 5, 13
	I112V	HeC			N	N				5, 13, 18
	W114R	He		PFIC2	D	D		Absent		1, 3, 5
Gly										
	Q121K				N	N				1, 5
Gly										
	M123T			AUTRES	D	N				1, 5
Gly										
	I127H66X	Ho	CA/AR	PFIC2			Classe I	Absent		1, 4, 18
	R128H				N	N				1, 5
	C129Y			PFIC2	N	N	Classe II			6, 7
	I134I	Ho, He		PFIC2, BRIC2	N	N				12
	E135K	Ho, He, HeC	UE	PFIC2, BRIC2, ICP	N	D	Classe II	Partiel		1, 2, 5, 11, 12, 13, 16, 18
	E137K	He, HeC		BRIC2, ICP	N	N	Classe II			1, 2, 5, 15, 18
	Y145C	HeC			N	D				18
TM2	T155P	HeC			D	N				18
	Y157C	He	UE	PFIC2	D	D		Absent		1, 4, 5, 6, 13
	A167E	HeC			D	D				18
	A167T	Ho, HeC	UE	PFIC2	D	D		Absent		18, 1, 5, 13, 14
	A167V	Ho		PFIC2	D	D	Epissage			1, 2, 5, 13
	R181I				D	N				5, 13
	R181Id1	HeC			D	D				18
	I182K	HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 13, 18

Domaines	Variations	Ho, He, HeC	Origine	Pathologie	SNAP2	PROVEAN	Classe	IHC ABCB11	Commentaires	Références
	M183T	HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 13
	M183V			PFIC2	N	N				1, 5, 13, 18
	M185I	HeC			D	D				13, 18
	E186G	He		BRIC2	D	D	Epissage, Classe II	Réduit		1, 2, 5, 12, 13
	G188V	HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 13, 18
	W189X	HeC			N	N	Classe I		Polymorphisme	18
	S194P	HeC		AUTRES	N	N				1, 2, 5
	E197G68X	He			D	D	Classe I			18
	L198P	He		BRIC2, ICP, DILI, AUTRES	D	D	Classe II			1, 2, 5, 13
	N199I614X	He		PFIC2			Classe I			1
	N199I615X	He		BRIC2			Classe III ou IV		Expression similaire wt mais fonction diminuée	1, 5, 9, 13
	I206V	Ho		ICP, DILI	N	N				18
	I206del	Ho			D	D				5, 13, 18
	A212T	HeC			D	N				18
	M217I	HeC			N	N				
	M217R	HeC		PFIC2	D	D			Altère probablement la translocation du ligand	1, 5, 12, 13
	R223C	HeC		PFIC2	N	N				1, 5, 13, 18
	I225P				D	D				13
TM3	S226L	Ho, HeC		PFIC2	D	N				1, 5, 13, 18
	L232C69X			PFIC2	D	N	Classe I	Absent		1
	L233S	He, HeC		PFIC2, BRIC2	N	D				5, 6, 13, 18
	G238V	Ho, He		PFIC2, BRIC2	D	D	Classe II	Absent		1, 2, 3, 5, 8, 9, 13, 18
	T242I	He	UE	PFIC2	D	D				1, 2, 4, 5, 13
	I245Y626X	HeC			D	D	Classe I			18
	P250R	Ho			D	D				18
TM4	A257G	HeC		PFIC2	N	N				1, 5
	A257V	HeC		PFIC2, ICP	D	D	Classe III ou IV		Altération de la plasticité du transporteur	5, 6, 18
	G260D	HeC		PFIC2	D	N		Normal	Polymorphisme	1, 2, 5, 12, 18
	Y269Y	He	Asie	PFIC2	N	N				12, 15
	A277E				D	D				5, 13
	E283D	HeC		BRIC2	D	D				5, 13, 18
	V284A	He		PFIC2	N	N				1, 2, 5, 12, 13, 18
	V284D	He		ICP	D	D				5, 13
	V284L	He		PFIC2	D	N	Classe I		Pas de protéine (mature ou immature)	1, 2, 5, 13
	V291A	HeC			N	D				5, 13, 18
	G295C				N	D				1, 5
	G295R				D	D				21, 25
	G295S				N	D				21, 25
	E297G	Ho, He, HeC	UE	PFIC2, BRIC2, ICP, AUTRES	D	D	Classe II	Présent, anormal ou absent		1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12, 13, 14, 18
	E297K				D	N	Epissage, Classe II			1, 2, 5, 13
	R299K				N	N				1, 5
	R303G	Ho	CA/AR	PFIC2	D	D		Absent		1, 5, 18
	R303K	Ho		PFIC2	N	N	Classe I			1, 4, 5, 13
	R303S617X			PFIC2			Classe I			1
	Y304M617X	HeC	UE	PFIC2			Classe I			13, 16, 18
	Q312H	He		PFIC2	N	N				1, 2, 5, 13
	R313S	He	UE	PFIC2	N	N		Absent		1, 2, 4, 5, 13
	G319G	Ho, He		PFIC2, BRIC2	N	N	Epissage		Polymorphisme	2, 12, 13
	G327E	He	UE	PFIC2	D	D				1, 2, 4, 5, 13
	W330R	Ho		PFIC2	D	D			Pourrait perturber la translocation du substrat	1, 5, 12
	W330X	He		PFIC2	D	D	Classe I			1, 5, 13
	C336S	He	Asie	PFIC2	N	N		Absent		1, 2, 3, 5, 8, 9, 13
	Y337H			PFIC2	D	D				5, 13, 15
	L339V			DILI	N	N				1, 5
	W342G	HeC		PFIC2	D	D	Classe I	Normal	Effets non spécifiques	1, 5, 12, 13
	Y354X	Ho, HeC		PFIC2						1, 5, 6, 13, 18

Domaines	Variations	Ho, He, HeC	Origine	Pathologie	SNAP2	PROVEAN	Classe	IHC ABCB11	Commentaires	Références	
TM6	V368R/627X	He	UE	PFIC2			Classe I			1, 4	
	G374S	Ho		BRIC2	D	D		Normal	La conformation peut être modifiée de manière drastique	1, 5, 12, 13	
	A376D	HeC			D	D				18	
	L380V/618X	He	UE	PFIC2			Classe I			1, 4	
	E381del/387	HeC					Classe I			18	
	A382G	HeC	UE	PFIC2	N	N		Absent	Pourrait altérer l'entrée du substrat et la communication TMD-NBD	1, 5, 12, 13	
	A382del/388	He		PFIC2	D	D				1, 4	
	F383del/389	HeC		PFIC2	D	D				12, 18	
	R387C	HeC		PFIC2	D	D				18	
	R387H	HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 12, 13	
	A389P	He	UE	PFIC2, BRIC2	D	D	Classe II			5, 13	
	A390P	He	UE	PFIC2, BRIC2	D	D	Classe II			1, 2, 4, 5, 13	
	D404G	He		BRIC2	N	D	Classe II			6, 13	
	G410D	He, HeC	UE	PFIC2	N	D		Absent		1, 2, 4, 5, 13, 18	
G410T	He		PFIC2	N	D				18		
L413W	He	UE	PFIC2	D	N	Classe II			1, 2, 4, 5, 13		
R415Q	Ho, HeC		ICP	N	N			Polymorphisme	1, 2, 5		
R415X	Ho, HeC		PFIC2	N	N	Classe I			1, 5, 6, 12, 13, 18		
Début NBD1											
	I420T	HeC		PFIC2	D	D				1, 13, 18	
	H423R				N	N				1, 5	
A-loop (xxxx)											
	R432T	He		BRIC2	N	D	Classe II			1, 2, 5, 9, 13	
	K436N				D	D				13	
	D440E	He		PFIC2	D	N			Déstabilisation structurale locale	1, 5, 12	
	V444A	HeC	Asie	PFIC2, BRIC2, ICP, DILI, AUTRES	N	N	Classe II		Polymorphisme	1, 5, 6, 9, 11, 13, 15	
	V444D				N	N				1, 5	
	V444G				N	N				1, 5	
Walker A (GxxxGxKST)	G455E	HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 13, 18	
	P456P/624X			PFIC2			Classe I			1	
	S457V/623X	Ho		PFIC2			Classe I			12	
	A459V				D	N				1, 5	
	K461E	Ho		PFIC2	D	D	Classe II			1, 2, 5, 13, 18	
	S462R	HeC		PFIC2	D	D			Abolir la liaison des nucléotides	12	
	T463I	He, HeC	Asie, AF	PFIC2	D	D	Classe III ou IV, Epissage		Abolir la liaison à l'ATP	1, 2, 4, 5, 6, 13, 18	
	L465T/639	HeC		PFIC2	D	D	Classe I			18	
	Q466K	He	CA/AR	PFIC2	D	D		Anormal		1, 2, 4, 5, 13	
	I468I				N	N				1	
	R470Q	Ho, He,	UE, CA/AR	PFIC2	D	D	Classe II			1, 2, 4, 5, 13, 14, 16, 18	
	R470X	HeC		PFIC2			Classe I				
		Y472C	Ho, He,	UE, Asie	PFIC2	D	D				1, 4, 5, 13, 15, 18
	Y472X	HeC	CA/AR	PFIC2			Classe I			1, 4, 5, 13, 18	
	D473V	He		PFIC2	D	D			Déstabilisation locale	12	
	V481E	He	UE	PFIC2	D	D				1, 2, 4, 5, 13	
	V481Q			PFIC2	D	D				5	
	D482G	Ho, He, HeC	UE, CA/AR	PFIC2, BRIC2, ICP	D	D	Classe II, Epissage	Présent, anormal ou absent		1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 12, 13, 14, 16, 18	
	H484R/65X	HeC		PFIC2			Classe I			1, 18	
	R487C	HeC			D	D				18	
	R487H	HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 12, 13, 18	
	R487L				D	D				1, 5	
	R487P	Ho, HeC	UE	PFIC2	D	D				1, 4, 5, 12, 13, 18	
	N490D	He	UE	PFIC2	N	D	Classe II		Protéine immature ; le D forme un pont salin avec le Lys412 alors que le N non	1, 2, 4, 5, 13, 17	
	W493X			PFIC2			Classe I			1, 5	
	D496V	HeC		PFIC2	D	D			Pourrait découpler les mouvements entre le sous-domaine de type RecA et le sous-domaine hélicoïdal	12	
	O497X	HeC		PFIC2	D	D	Classe I			18	
	I498T	He, HeC		PFIC2, BRIC2	D	D	Classe III ou IV		Protéine mature	1, 2, 5, 13, 18	
	G499E	HeC		PFIC2	D	D	Epissage			1, 5, 13, 18	

Domaines	Variations	Ho, He, HeC	Origine	Pathologie	SNAP2	PROVEAN	Classe	IHC ABCB11	Commentaires	Références
Q-loop (xxQxx)	E504K	HeC			D	D	Classe I			18
	E504X	He		AUTRES	N	N			Polymorphisme	18
	I512T	He	UE	PFIC2	D	D				2
	N515D	Ho, HeC			D	D				1, 2, 4, 5, 13
	N515T	He, HeC	UE	PFIC2	D	D		Anormal		18
	I516M	HeC	UE	PFIC2	N	D		Intraclutaire		1, 2, 4, 5, 13, 18
	R517H	He, HeC	UE	PFIC2	N	D	Classe I	Anormal		13, 14
	R520X	He, HeC	UE	PFIC2	N	D	Classe I	Absent		1, 2, 4, 5, 13, 18
	A523G	Ho		CC	D	D				1, 4, 5, 13, 18
	I528T	Ho, HeC			D	D				13
	I528X	HeC		PFIC2			Classe I			5, 13, 18
	I528S/I521X	He, HeC	UE	PFIC2			Classe I	Absent		1, 5, 18
	A535A				N	N		Polymorphisme		1, 4, 18
	F540L			PFIC2	D	D				2
	I541L	Ho, He, HeC	UE	PFIC2	D	N	Classe I	Anormal ou absent		1, 5, 13
	I541M	Ho	UE	PFIC2	D	D				1, 2, 4, 5, 13, 16, 18
	I541T	He, HeC	UE	PFIC2	D	D	Classe II	Intraclutaire ou absent		18
	Q546H	HeC			N	N				1, 2, 4, 5, 13, 14, 18
	Q546K	HeC			N	N				5, 13, 18
	Q546Q	HeC			N	N				5, 11
	F548Y	He, HeC	UE	PFIC2	N	N		Anormal		18, 1
	D549V			PFIC2	D	D				1, 2, 4, 5, 13, 18
X-loop (TEVGERG)	G556R			PFIC2	D	D				1, 5, 13
	Q558H			ICP	N	D				1, 5
ABC (LSGGQ)	G562D	He, HeC	UE	PFIC2	D	D	Classe III ou IV	Normal		1, 2, 4, 5, 13, 18
	G562S	He			D	D				18
	A570T	Ho	UE	PFIC2, BRIC2	D	D	Classe II ou IV	Absent		1, 2, 4, 5, 6, 9, 11, 13, 16, 17, 18
	A570V	HeC	UE	PFIC2	D	D		Absent		12, 13, 16
	R575X	HeC	UE, Asie	PFIC2	N	D	Classe I	Normal ou absent		1, 3, 4, 5, 12, 13, 14, 18
	N576S				N	D				5, 13
Walker B (hhhDE)	L581F	HeC		PFIC2	N	D				1, 5, 18
	I586I	He			D	D	Classe III ou IV, Epissage			1, 2, 5, 13
	S587X	HeC		BRIC2	D	D				5, 13, 18
	A588P	He, HeC	UE	PFIC2	D	D	Classe I			13
	A588V	Ho, He	UE	PFIC2, BRIC2, ICP	D	N	Classe II	Absent		1, 2, 4, 5, 13, 18
	N591S	Ho, He	UE	PFIC2, BRIC2, ICP	D	N				1, 2, 5, 9, 11, 12, 13, 14
	E592Q	He, HeC	UE	DILI	N	N				1, 5
	S593R	He, HeC	UE	PFIC2	D	D		Absent		1, 2, 3, 5, 13, 14, 18
	V597M	Ho, He			D	D				1, 5
	V597V	Ho, HeC		PFIC2, BRIC2	N	N	Classe I	Polymorphisme		2, 12
	Q598X	Ho, HeC					Classe I			18
	I610K/45X	Ho, HeC		PFIC2			Classe I			1, 12, 18
	H615R	HeC	UE	PFIC2	D	D		Partiel		13, 16
H-loop (xxHxx)	R616G	HeC			D	D				1, 5
	R616H	HeC			D	D				13, 18
	T619A	Ho			D	D				1, 5
	A625E	Ho			D	D				18
	T625N/65X	He	UE	PFIC2			Classe I			16
	I627T	He		PFIC2	N	N				1, 2, 5, 13
	T633P	He	CA/AR	PFIC2	N	N				13
	E636G			PFIC2	D	D				1, 5, 13
Fin NBD1										

Domaines	Variations	H ₀ , He, HeC	Origine	Pathologie	SNAP2	PROVEAN	Classe	IHC ABCB11	Commentaires	Références
Interaction HAX-1	G648V	Ho		BRIC2	D	D	Classe I	Normal	Susceptible d'affecter la structure et la fonction du linker	1, 5, 12, 13
	G648Y/65X	He, HeC	UE	PFIC2			Classe I	Absent		1
	G648Y/60X									4, 18
	T655I	He		BRIC2, ICP, DILLI, AUTRES	N	D	Classe II			1, 2, 5, 13
	I669V	HeC	UE	PFIC2	N	N		Réduit ou Absent		12, 13, 15
	D676Y			DILLI, AUTRES	N	N				1, 5, 9
	M677L	He		PFIC2, BRIC2	D	N		Normal ou réduit	Polymorphisme	1, 5
	M677V				N	N				1, 2, 5, 12
	R696Q	HeC	Asie	PFIC2	N	N				1, 5
	R696W				D	D				5, 13, 15
R698H	He, HeC		PFIC2, BRIC2 PFIC2, BRIC2, ICP	D	D		Normal ou absent	Site probable de phosphorylation, influence la spécificité du ligand et le couplage conformationnel Polymorphisme	1, 5, 12, 13 1, 2, 5, 12, 13	
S699P	HeC		PFIC2	N	D				1, 5, 13, 18	
K700S/612X			PFIC2	N	N				1	
S701P				N	N	Classe I			1, 5	
Q702X			PFIC2	N	N				1, 5, 13	
E709K	He, HeC		PFIC2	N	N	Classe I Classe III ou IV			1, 2, 5, 18	
P710P			AUTRES	N	N			Polymorphisme	1, 2	
L712L	He		BRIC2	N	N				1, 12	
Y721C	He		PFIC2	N	N			Site probable de phosphorylation, influence la spécificité du ligand et le couplage conformationnel	1, 12	
P731S			ICP	N	N				12	
Q733X	HeC			N	N	Classe I			5, 13	
G738R	Ho	CA/AR	PFIC2	D	D		Absent		18	
G766R	Ho	CA/AR	PFIC2	D	D		Absent		1, 4, 5, 13	
Y772X	Ho	UE	PFIC2	D	D	Classe I	Absent		1, 4, 5, 12, 13, 18	
Q791X	Ho		PFIC2			Classe I			1, 4, 5, 13	
A804A	He		PFIC2	N	N			Polymorphisme	1, 5, 12, 13	
G806D			PFIC2	D	D	Classe II			2, 12	
G817G	He		BRIC2	N	N				6	
Y818F	Ho, HeC		PFIC2	N	N	Classe II		Polymorphisme	12	
E825G				N	D				1, 2, 5, 11, 13, 18	
L827I			AUTRES	N	N				13	
R830C/6X28	HeC			N	N	Classe I			1, 5, 13	
R832C	Ho, He,	CA/AR, UE	PFIC2	D	D	Epissage	Normal ou absent		18	
R832H	HeC		PFIC2	D	D				1, 2, 4, 5, 6, 12, 13, 15, 18	
M839V	HeC			N	D				1, 5, 13, 18	
D848N	HeC			D	D				18	
G855R			DILLI, AUTRES	D	D				13, 18	
T859R	He, HeC	UE	PFIC2	D	D				1, 5, 9, 13	
A865D				D	D				1, 2, 4, 5, 13, 18	
A865G				D	D				1, 5	
A865V	HeC	Asie	PFIC2, BRIC2	D	D				1, 5	
O869P	HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 12, 15, 18	
S874P				D	D				13	
Q875X				D	D				1, 5	
G877R			PFIC2	D	D				13	
I879R	HeC		PFIC2	D	D			Insertion membranaire altérée ou perte de fonction	1, 5, 13	
W898G	Ho			D	D	Classe I			12	
S901I	Ho, HeC	UE	PFIC2	D	D		Normal, réduit ou absent		18	
V903E	Ho			D	D				13	
T919A			BRIC2	N	N			Région flexible participant au changement de conformation pendant la translocation du substrat	1, 5, 12, 13, 14, 18	
T919del	He, HeC		PFIC2	D	D	Classe III ou IV	Normal		18	
				N	D				1, 6, 10, 12	

Domaines	Variations	Ho, He, HeC	Origine	Pathologie	SNAP2	PROVEAN	Classe	IHC ABCB11	Commentaires	Références
TM11	T923P	He		BRIC2	D	D				1, 2, 5, 13
	A926P	He		BRIC2	D	D	Epissage			1, 2, 5, 13
	R928Q	HeC	Asie	PFIC2	N	N	Classe I			5, 13
	R928X	HeC	Asie	PFIC2			Classe I			1, 5, 13, 15, 18
	K930Els79X	He, HeC	UE	PFIC2			Classe I	Réduit ou absent		1, 4, 5, 12, 18
	K930Els92X	He, HeC	UE	PFIC2			Classe I			1
	Q931P		Asie		D	D				5, 15
	I939M				N	D				1, 5
	R948C	Ho, He, HeC	UE	PFIC2, BRIC2	D	D	Classe II	Absent		1, 2, 4, 5, 13, 16, 18
	E956K	HeC			D	D				18
	R958Q				N	N				1, 5
	F959C				N	D				1
	F959V				N	D				1
	F959Hls1X				N	D	Classe I			1
	F959Gls48X				N	D	Classe I			1
	D965S				N	N				1, 5
	K969K	Ho		ICP	N	N				12
	K969de1972	He, HeC	UE	PFIC2	N	D	Classe I	Absent		1, 4, 18
F971L				N	D				1	
F971Y				N	N				1	
Q976X	Ho		PFIC2				Absent		12	
A978Pfs9X	HeC					Classe I			18	
R979D	Ho, HeC	UE	PFIC2	N	N				1, 2, 4, 5, 13, 18	
G982R	Ho, He, HeC	CA/AR, UE	PFIC2, BRIC2	D	D	Classe II	Absent		1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 18	
R1001R	He, HeC		PFIC2	N	N	Epissage			1, 6, 18	
Y1002del1019					D				18	
G1003E	HeC		PFIC2	D	D				5, 13, 18	
G1003R	HeC		PFIC2						13	
G1004D	Ho		PFIC2, BRIC2	D	D				1, 2, 5, 13	
L1006F			N.D.	N	D				1, 5	
N1009H			N.D.	N	N				1, 5	
R1019K	HeC			N	N				18	
S1027R	HeC	UE	PFIC2	D	D				13, 16	
A1028A	Ho, He, HeC	Asie	PFIC2, BRIC2	N	N	Epissage			12	
A1028E	HeC		PFIC2	D	D			Polymorphisme	12, 13, 15	
T1029K	He, HeC	UE	PFIC2	D	N			Entrave probablement la translocation du substrat	1, 4, 5, 13, 18	
T1029Tfs25X	HeC								18	
L1031P	HeC			D	D				18	
G1032R	HeC		PFIC2	D	D	Classe III ou IV	Normal ou légèrement réduit		1, 5, 10, 12	
Y1041X	HeC		PFIC2			Classe I	Entrave probablement la translocation du substrat		1, 5, 13, 18	
A1044P	He		PFIC2	D	D				1, 5, 12, 13	
R1050C	Ho, He, HeC	UE	PFIC2, BRIC2	D	D	Classe II	Normal		2, 5, 9, 11, 12, 13, 15, 18	
L1055P			PFIC2	D	D			Communication TMD-NBD altérée	1, 5, 13	
R1057C			PFIC2	N	D				5	
R1057X	HeC		PFIC2	N	D	Classe I	Absent		1, 3, 5, 6, 9, 12, 13, 18	
Q1058X			PFIC2			Classe I			1, 5, 13, 18	
Q1058Hfs38X	HeC		PFIC2			Classe I	Absent		1, 5, 13, 18	
Q1058Hfs39X			PFIC2			Classe I			18	
I1061Vfs44X	HeC		PFIC2			Classe I			1	
I1061Vfs35X	Ho					Classe I			18	
D1072Tfs25X						Classe I			18	

Domaines	Variations	Ho, He, HeC	Origine	Pathologie	SNAP2	PROVEAN	Classe	IHC ABCB11	Commentaires	Références
Début NBD2										
	I1078T	HeC			N	D				5, 13, 18
	C1083R	Ho			D	D				18
	C1083Y	HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 13
A-loop (xxxx)										
	R1090X	Ho, He, HeC	UE	PFIC2			Classe I	Normal, anormal ou absent		1, 3, 4, 5, 6, 12, 13, 18
	A1110E	He	UE (24)	PFIC2	D	D	Epiissage	Normal ou anormal		1, 2, 4, 5, 13
	F1111S	HeC		PFIC2	D	D				13
	V1112F				D	D				5
Walker A	S1114R			PFIC2	D	D				1, 5, 13
	G1116E			PFIC2	D	D				1, 5, 13
	G1116F		UE	PFIC2	D	D				1, 5, 14
	G1116R			PFIC2, BRIC2	D	D	Epiissage	Intracellulaire		1, 2, 5, 13
GxGxGKST	S1120N	HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 12, 13
	R1128C	Ho, HeC	Asté	PFIC2, BRIC2, ICP	D	D	Classe II, Epiissage	Absent (32)		1, 2, 4, 5, 6, 9, 13, 18
	R1128H	Ho		BRIC2	D	D	Classe II, Epiissage	Absent		1, 2, 5, 13
	D1131V	HeC	Asté	PFIC2, ICP	D	D				5, 13, 15, 18
	Q1134X	Ho			N	D	Classe I			18
	D1140G	Ho			N	D				18
	S1144R	He		PFIC2	N	N	Epiissage			1, 2, 5
	K1145N				N	D				1, 5
	V1147X	He	UE	PFIC2			Classe I	Anormal		1, 4, 5
	R1153C	He, HeC	UE, CA/AR	PFIC2, BRIC2, ICP	D	D	Classe II	Absent		1, 2, 4, 5, 8, 9, 12, 13, 16, 18
	R1153H	Ho, He	UE, Asté	PFIC2	D	D	Classe II, Epiissage	Présent ou absent		1, 2, 4, 5, 13, 15, 18
	R1153L	HeC			D	D				13
	S1154P	He	UE	PFIC2	D	D	Epiissage			1, 2, 4, 5, 13
Q-loop (xxOxx)										
	V1164Gf67X	He, HeC	UE				Classe I			4, 18
	L1165d4l	Ho		PFIC2		D				1, 12
	N1173D	Ho, HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 12, 13, 18
	Y1176S	HeC			D	D				18
	I1183T				D	D				1, 5
	E1186K			ICP, AUTRES	D	D	Epiissage			1, 2, 5, 9, 13
	A1192E850X	He		PFIC2			Classe I			1
	A1192E851X						Classe I			18
	Q1196X	Ho		PFIC2						12
	L1197G	He		BRIC2	N	D				1, 2, 5
	H1198R	Ho, HeC	CA/AR, Asté	PFIC2	D	D				5, 13, 15, 18
	L1204P	He		BRIC2	D	D				12
	Y1208C	HeC			D	D				5, 13, 18
X-loop (TEVGERG)	T1210P	Ho, HeC	UE	PFIC2, BRIC2, ICP	D	D	Classe II	Réduit ou absent		1, 2, 4, 5, 6, 9, 12, 13, 18
	N1211D	He		PFIC2	N	N	Classe III ou IV			1, 2, 5
	V1212F			PFIC2	D	D				1, 5, 13, 18
	G1213R	Ho			D	D				18
	Q1215X	He, HeC	Asté, AF	PFIC2			Classe I	Absent (24)		1, 4, 5, 13, 18
ABC signature (LSGG)	E1223D	He, HeC			D	N				2, 5, 13, 18
	E1223K	HeC			D	N				18
	R1226C	Ho			D	D				18
	R1226H				D	D				5, 13
	R1226P	HeC			D	D				5, 13, 18
	A1228V			DILI	D	D				2, 5
	A1230P				D	D				13
	R1231Q	Ho, He	UE	PFIC2, BRIC2	D	D	Classe II, Epiissage	Normal		1, 2, 4, 5, 6, 12, 13, 18
	R1231W	Ho, He	UE	PFIC2	D	D	Classe II, Epiissage	CB, réduit ou absent		1, 2, 4, 5, 12, 13, 14, 18
	A1232D	Ho	UE	PFIC2	D	D		Intracellulaire		13, 14, 18
	R1235X	Ho, He, HeC	UE	PFIC2			Classe I	Normal, réduit ou absent		1, 4, 5, 6, 10, 12, 13

Domaines	Variations	Ho, He, HeC	Origine	Pathologie	SNAP2	PROVEAN	Classe	IHC ABCB11	Commentaires	Références	
Walker E (hhhhDE)	LI242I	He	UE (24)	PFIC2	D	N	Classe III ou IV			1, 2, 4, 5, 13	
	DI243G			PFIC2	D	D				1, 5, 13	
	TI246I	Ho			D	D				18	
	LI249X	HeC					Classe I			5, 13, 18	
	TI256T ^{640X}			PFIC2			Classe I			1	
	RI268Q	Ho		PFIC2, BRIC2, ICP	D	D	Classe II			1, 2, 5, 8, 9, 13, 18	
	FH-loop (xxHxx)										
	LI280S	He			D	D				18	
	AI283V	He		PFIC2	D	D			Altération de la liaison des nucléotides	1, 5, 12, 13	
	GI292V	HeC		PFIC2	D	D				1, 5, 13, 18	
GI298R	He		PFIC2	D	D		Absent		1, 4, 5, 6, 13		
GI298V	Ho		UE		D	D			18		
Fin NBD2											
Interaction AP-2	EI302X	Ho, He, HeC	UE	PFIC2			Classe I	Anormal ou absent		1, 4, 5, 6, 13, 18	
	YI311A				D	D				5	
	YI311X	HeC		PFIC2, ICP			Classe I		Perte du motif d'interaction avec AP-2	5, 13, 17, 18	
	TI316L ^{8X64}	HeC					Classe I			18	
AI312IN	He			PFIC2	N	N		Pas d'influence évidente sur la stabilité locale, pourrait servir de cible aux kinases	12		

Annexe 1 : Variations identifiées dans le gène ABCB11. On retrouve des variants non-sens (rouge), des décalages du cadre de lecture (orange), des délétions (marron), des variants faux sens (violet) et des variants synonymes (noir). He : hétérozygote, HeC : Hétérozygote composite, Ho : Homozygote, AF : Afrique, CA/AR : Centre Afrique/Arabe, UE : Union Européenne, BRIC2 : Cholestase intrahépatique récurrente bénigne de type 2, DILL : Lésions hépatiques provoquées par les médicaments, ICP : Cholestase gravidique, PFIC2 : Cholestase intrahépatique progressive familiale de type 2, D : délétère, N : non délétère. ¹Kubitz 2012 PMID 22795478, ²Byrne 2009 PMID 19101985, ³Jansen 1999 PMID 10579978, ⁴Strauknieks 2008 PMID 18395098, ⁵<http://abcm2.hegelab.org>, ⁶sohail 2021 PMID 33466755, ⁷Imagawa 2018 PMID 29507376, ⁸Wang 2002 PMID 12370274, ⁹Telbiz 2016 PMID 26573700, ¹⁰Ellinger 2017 PMID 28839429, ¹¹Kubitz 2014 PMID 25027376, ¹²Droge 2017 PMID 28733223, ¹³<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>, ¹⁴Varma 2015 PMID 25847299, ¹⁵Hu 2014 PMID 24969679, ¹⁶Giovannoni 2015 PMID 26678486, ¹⁷Wang 2020 PMID 32203132, ¹⁸Van Wessel 2020 PMID 32087350.

~ BILAN SCIENTIFIQUE ~

Cette thèse a donné lieu à la rédaction d'un article scientifique publié dans la revue *Liver International*, d'un article soumis dans la revue *Orphanet Journal of Rare Diseases* et d'un article en préparation pour la revue *Liver International* (cf. Résultats). De plus, j'ai contribué à cinq articles publiés dans les revues *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *Hepatology*, *Liver International* et *International Journal of Molecular Sciences*. Ce travail a également fait l'objet de plusieurs communications lors de congrès nationaux et internationaux (communications orales, communications affichées et discutées). Par ailleurs, j'ai également eu la possibilité d'enseigner en tant que monitrice de TP de physiologie animale de deuxième année de licence à l'université Paris-Saclay pour une durée annuelle de 64 heures.

→ Contribution aux articles

Almes M, Jobert A, Lapalus M, **Mareux E**, Gonzales E, Jacquemin E. Glycerol Phenylbutyrate Therapy in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 2. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2020 Jun;70(6):e139-e140. doi: 10.1097/MPG.0000000000002713.

Amzal R, Thébaut A, Lapalus M, Almes M, Grosse B, **Mareux E**, Collado-Hilly M, Davit-Spraul A, Bidou L, Namy O, Jacquemin E, Gonzales E. Pharmacological Premature Termination Codon Readthrough of ABCB11 in Bile Salt Export Pump Deficiency: An In Vitro Study. *Hepatology.* 2021 Apr;73(4):1449-1463. doi: 10.1002/hep.31476.

Ben Saad A, Vauthier V, Tóth Á, Janaszkiwicz A, Durand-Schneider AM, Bruneau A, Delaunay JL, Lapalus M, **Mareux E**, Garcin I, Gonzales E, Housset C, Aït-Slimane T, Jacquemin E, Di Meo F, Falguières T. Effect of CFTR correctors on the traffic and the function of intracellularly retained ABCB4 variants. *Liver Int.* 2021 Jun;41(6):1344-1357. doi: 10.1111/liv.14839.

Ben Saad A*, Bruneau A*, **Mareux E***, Lapalus M, Delaunay JL, Gonzales E, Jacquemin E, Aït-Slimane T[§], Falguières T[§]. Molecular Regulation of Canalicular ABC Transporters. *Int J Mol Sci.* 2021 Feb 20;22(4):2113. doi: 10.3390/ijms22042113. ***These authors share first co-authorship.** [§]These authors share last co-authorship.

Ben Saad A, Vauthier V, Lapalus M, **Mareux E**, Bennana E, Durand-Schneider AM, Bruneau A, Delaunay JL, Gonzales E, Housset C, Aït-Slimane T, Guillonneau F, Jacquemin E, Falguières T. RAB10 Interacts with ABCB4 and Regulates Its Intracellular Traffic. *Int J Mol Sci.* 2021 Jun 30;22(13):7087. doi: 10.3390/ijms22137087.

→ **Communications orales, affichées et discutées**

Congrès de l'European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), Juin 2019, Glasgow, Royaume-Uni. Functional rescue of a bile salt export pump mutant by ivacaftor: a new targeted pharmacotherapy approach in bsep deficiency. **Elodie Mareux**, Martine Lapalus, Rachida Amzal, Marion Almes, Tounsia Aït-Slimane, Jean-Louis Delaunay, Anne Davit-Spraul, Isabelle Callebaut, Emmanuel Gonzales, Emmanuel Jacquemin.

VIII colloque de Génomique Fonctionnelle du Foie (GFF), Mars 2020, Rennes, France. Functional rescue of an ABCB11 mutant by ivacaftor: a new targeted pharmacotherapy approach in bile salt export pump deficiency. **Elodie Mareux**, Martine Lapalus, Rachida Amzal, Marion Almes, Tounsia Aït-Slimane, Jean-Louis Delaunay, Pauline Adnot, Mauricette Collado-Hilly, Anne Davit-Spraul, Isabelle Callebaut⁵, Emmanuel Gonzales, Emmanuel Jacquemin.

ABC meeting FEBS, Mars 2020, Innsbruck, Autriche. Functional rescue of an ABCB11 mutant by ivacaftor: a new targeted pharmacotherapy approach in bile salt export pump deficiency. **Elodie Mareux**, Martine Lapalus, Rachida Amzal, Marion Almes, Tounsia Aït-Slimane, Jean-Louis Delaunay, Pauline Adnot, Mauricette Collado-Hilly, Anne Davit-Spraul, Isabelle Callebaut, Emmanuel Gonzales, Emmanuel Jacquemin.

Journée Recherche Filfoie, Octobre 2021, Paris, France. Correction *in vitro* de la fonction de variants d'ABCB11 par des molécules potentiatrices : une thérapie ciblée pour la PFIC2. **Elodie Mareux**, Martine Lapalus, Mounia Lakli, Marion Almes, Isabelle Callebaut, Thomas Falguières, Emmanuel Jacquemin, Emmanuel Gonzales.

→ **Prix**

Prix jeune chercheur « ESPGHAN Young Investigator Award », Congrès de l'European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), Juin 2019, Glasgow, Royaume-Uni.

Prix Recherche et innovation catégorie « Recherche fondamentale », Plateforme d'expertise maladies rares Paris-Sud, Juin 2019, France.

Prix communication jeune chercheur de la filière FILFOIE (2ème place), Journée de Recherche Filfoie, Octobre 2021, Paris, France.

~ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ~

- Abboud G. and Kaplowitz N. 2007. "Drug-induced liver injury." *Drug Saf* 30(4): 277-294. DOI: 10.2165/00002018-200730040-00001.
- Accurso F. J., Rowe S. M., Clancy J. P., Boyle M. P., Dunitz J. M., Durie P. R., *et al.* 2010. "Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation." *N Engl J Med* 363(21): 1991-2003. DOI: 10.1056/NEJMoa0909825.
- Adachi Y., Kobayashi H., Kurumi Y., Shouji M., Kitano M. and Yamamoto T. 1991. "ATP-dependent taurocholate transport by rat liver canalicular membrane vesicles." *Hepatology* 14(4 Pt 1): 655-659. DOI: 10.1016/0270-9139(91)90053-x.
- Admirand W. H. and Small D. M. 1968. "The physicochemical basis of cholesterol gallstone formation in man." *J Clin Invest* 47(5): 1043-1052. DOI: 10.1172/JCI105794.
- Aida K., Hayashi H., Inamura K., Mizuno T. and Sugiyama Y. 2014. "Differential roles of ubiquitination in the degradation mechanism of cell surface-resident bile salt export pump and multidrug resistance-associated protein 2." *Mol Pharmacol* 85(3): 482-491. DOI: 10.1124/mol.113.091090.
- Almes M., Jobert A., Lapalus M., Mareux E., Gonzales E. and Jacquemin E. 2020. "Glycerol Phenylbutyrate Therapy in Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis Type 2." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 70(6): e139-e140. DOI: 10.1097/MPG.0000000000002713.
- Alvarez L., Jara P., Sanchez-Sabate E., Hierro L., Larrauri J., Diaz M. C., *et al.* 2004. "Reduced hepatic expression of farnesoid X receptor in hereditary cholestasis associated to mutation in ATP8B1." *Hum Mol Genet* 13(20): 2451-2460. DOI: 10.1093/hmg/ddh261.
- Amirneni S., Haep N., Gad M. A., Soto-Gutierrez A., Squires J. E. and Florentino R. M. 2020. "Molecular overview of progressive familial intrahepatic cholestasis." *World J Gastroenterol* 26(47): 7470-7484. DOI: 10.3748/wjg.v26.i47.7470.
- Amzal R., Thebaut A., Lapalus M., Almes M., Grosse B., Mareux E., *et al.* 2021. "Pharmacological Premature Termination Codon Readthrough of ABCB11 in Bile Salt Export Pump Deficiency: An In Vitro Study." *Hepatology* 73(4): 1449-1463. DOI: 10.1002/hep.31476.
- Ananthanarayanan M., Li S., Balasubramanian N., Suchy F. J. and Walsh M. J. 2004. "Ligand-dependent activation of the farnesoid X-receptor directs arginine methylation of histone H3 by CARM1." *J Biol Chem* 279(52): 54348-54357. DOI: 10.1074/jbc.M410021200.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ananthanarayanan M., Li Y., Surapureddi S., Balasubramanian N., Ahn J., Goldstein J. A., *et al.* 2011. "Histone H3K4 trimethylation by MLL3 as part of ASCOM complex is critical for NR activation of bile acid transporter genes and is downregulated in cholestasis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300(5): G771-781. DOI: 10.1152/ajpgi.00499.2010.
- Anderson J. M. and Van C. M. Itallie 1995. "Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability." *Am J Physiol* 269(4 Pt 1): G467-475. DOI: 10.1152/ajpgi.1995.269.4.G467.
- Anwer M. S. 2012. "Intracellular Signaling by Bile Acids." *J Biosci (Rajshari)* 20: 1-23. DOI: 10.3329/jbs.v20i0.17647.
- Arnell H., Papadogiannakis N., Zemack H., Knisely A. S., Nemeth A. and X Fischler A. 2010. "Follow-up in children with progressive familial intrahepatic cholestasis after partial external biliary diversion." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51(4): 494-499. DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181df99d5.
- Aronson S. J., Bakker R. S., Shi X., Duijst S., Ten Bloemendaal L., de Waart D. R., *et al.* 2019. "Liver-directed gene therapy results in long-term correction of progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 in mice." *J Hepatol* 71(1): 153-162. DOI: 10.1016/j.jhep.2019.03.021.
- Ballatori N., Christian W. V., Lee J. Y., Dawson P. A., Soroka C. J., Boyer J. L., *et al.* 2005. "OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia." *Hepatology* 42(6): 1270-1279. DOI: 10.1002/hep.20961.
- Banales J. M., Huebert R. C., Karlsen T., Strazzabosco M., LaRusso N. F. and Gores G. J. 2019. "Cholangiocyte pathobiology." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 16(5): 269-281. DOI: 10.1038/s41575-019-0125-y.
- Barbieri A., Thonghin N., Shafi T., Prince S. M., Collins R. F. and Ford R. C. 2021. "Structure of ABCB1/P-glycoprotein bound to the CFTR potentiator ivacaftor." *bioRxiv*: 2021.2006.2011.448073. DOI: 10.1101/2021.06.11.448073.
- Bedwell D. M., Kaenjak A., Benos D. J., Bebok Z., Bubien J. K., Hong J., *et al.* 1997. "Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line." *Nat Med* 3(11): 1280-1284. DOI: 10.1038/nm1197-1280.
- Beis K. 2015. "Structural basis for the mechanism of ABC transporters." *Biochem Soc Trans* 43(5): 889-893. DOI: 10.1042/BST20150047.
- Ben Saad A., Bruneau A., Mareux E., Lapalus M., Delaunay J. L., Gonzales E., *et al.* 2021. "Molecular Regulation of Canalicular ABC Transporters." *Int J Mol Sci* 22(4). DOI: 10.3390/ijms22042113.

- Benhabiles H., Gonzalez-Hilarion S., Amand S., Bailly C., Prevotat A., Reix P., *et al.* 2017. "Optimized approach for the identification of highly efficient correctors of nonsense mutations in human diseases." *PLoS One* 12(11): e0187930. DOI: 10.1371/journal.pone.0187930.
- Beuers U. 2006. "Drug insight: Mechanisms and sites of action of ursodeoxycholic acid in cholestasis." *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3(6): 318-328. DOI: 10.1038/ncpgasthep0521.
- Beuers U., Boyer J. L. and Paumgartner G. 1998. "Ursodeoxycholic acid in cholestasis: potential mechanisms of action and therapeutic applications." *Hepatology* 28(6): 1449-1453. DOI: 10.1002/hep.510280601.
- Beuers U., Denk G. U., Soroka C. J., Wimmer R., Rust C., Paumgartner G., *et al.* 2003. "Tauroolithocholic acid exerts cholestatic effects via phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms in perfused rat livers and rat hepatocyte couplets." *J Biol Chem* 278(20): 17810-17818. DOI: 10.1074/jbc.M209898200.
- Boaglio A. C., Zucchetti A. E., Sanchez Pozzi E. J., Pellegrino J. M., Ochoa J. E., Mottino A. D., *et al.* 2010. "Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway is involved in estradiol 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis: complementarity with classical protein kinase C." *Hepatology* 52(4): 1465-1476. DOI: 10.1002/hep.23846.
- Bouscarel B., Ceryak S., Gettys T. W., Fromm H. and Noonan F. 1995. "Alteration of cAMP-mediated hormonal responsiveness by bile acids in cells of nonhepatic origin." *Am J Physiol* 268(6 Pt 1): G908-916. DOI: 10.1152/ajpgi.1995.268.6.G908.
- Boyer J. L. 2013. "Bile formation and secretion." *Compr Physiol* 3(3): 1035-1078. DOI: 10.1002/cphy.c120027.
- Bull L. N., Carlton V. E., Stricker N. L., Baharloo S., DeYoung J. A., Freimer N. B., *et al.* 1997. "Genetic and morphological findings in progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease [PFIC-1] and Byler syndrome): evidence for heterogeneity." *Hepatology* 26(1): 155-164. DOI: 10.1002/hep.510260121.
- Byrne J. A., Strautnieks S. S., Ihrke G., Pagani F., Knisely A. S., Linton K. J., *et al.* 2009. "Missense mutations and single nucleotide polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre-messenger RNA splicing." *Hepatology* 49(2): 553-567. DOI: 10.1002/hep.22683.
- Cai S. Y., Wang L., Ballatori N. and Boyer J. L. 2001. "Bile salt export pump is highly conserved during vertebrate evolution and its expression is inhibited by PFIC type II mutations." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(2): G316-322. DOI: 10.1152/ajpgi.2001.281.2.G316.
- Cantore M., Reinehr R., Sommerfeld A., Becker M. and Haussinger D. 2011. "The Src family kinase Fyn mediates hyperosmolarity-induced Mrp2 and Bsep retrieval from canalicular membrane." *J Biol Chem* 286(52): 45014-45029. DOI: 10.1074/jbc.M111.292896.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Capurro V., Tomati V., Sondo E., Renda M., Borrelli A., Pastorino C., *et al.* 2021. "Partial Rescue of F508del-CFTR Stability and Trafficking Defects by Double Corrector Treatment." *Int J Mol Sci* 22(10). DOI: 10.3390/ijms22105262.
- Chan W., Calderon G., Swift A. L., Moseley J., Li S., Hosoya H., *et al.* 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(25): 23741-23747. DOI: 10.1074/jbc.M502767200.
- Chen F., Ananthanarayanan M., Emre S., Neimark E., Bull L. N., Knisely A. S., *et al.* 2004. "Progressive familial intrahepatic cholestasis, type 1, is associated with decreased farnesoid X receptor activity." *Gastroenterology* 126(3): 756-764. DOI: 10.1053/j.gastro.2003.12.013.
- Chen F., Ellis E., Strom S. C. and Shneider B. L. 2010. "ATPase Class I Type 8B Member 1 and protein kinase C zeta induce the expression of the canalicular bile salt export pump in human hepatocytes." *Pediatr Res* 67(2): 183-187. DOI: 10.1203/PDR.0b013e3181c2df16.
- Chen R. R., Li Y. J., Zhou X. M., Wang L., Xing J., Han S., *et al.* 2014. "The association between bile salt export pump single-nucleotide polymorphisms and primary biliary cirrhosis susceptibility and ursodeoxycholic acid response." *Dis Markers* 2014: 350690. DOI: 10.1155/2014/350690.
- Cheng Y., Freeden C., Zhang Y., Abraham P., Shen H., Wescott D., *et al.* 2016a. "Biliary excretion of pravastatin and taurocholate in rats with bile salt export pump (Bsep) impairment." *Biopharm Drug Dispos* 37(5): 276-286. DOI: 10.1002/bdd.2011.
- Cheng Y., Woolf T. F., Gan J. and He K. 2016b. "In vitro model systems to investigate bile salt export pump (BSEP) activity and drug interactions: A review." *Chem Biol Interact* 255: 23-30. DOI: 10.1016/j.cbi.2015.11.029.
- Chiang J. Y. 2009. "Bile acids: regulation of synthesis." *J Lipid Res* 50(10): 1955-1966. DOI: 10.1194/jlr.R900010-JLR200.
- Chiang J. Y. 2013. "Bile acid metabolism and signaling." *Compr Physiol* 3(3): 1191-1212. DOI: 10.1002/cphy.c120023.
- Childs S., Yeh R. L., Georges E. and Ling V. 1995. "Identification of a sister gene to P-glycoprotein." *Cancer Res* 55(10): 2029-2034.
- Chin S., Hung M., Won A., Wu Y. S., Ahmadi S., Yang D., *et al.* 2018. "Lipophilicity of the Cystic Fibrosis Drug, Ivacaftor (VX-770), and Its Destabilizing Effect on the Major CF-causing Mutation: F508del." *Mol Pharmacol* 94(2): 917-925. DOI: 10.1124/mol.118.112177.

- Cholon D. M., Quinney N. L., Fulcher M. L., Esther C. R. Jr., Das J., Dokholyan N. V., *et al.* 2014. "Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of DeltaF508 CFTR in cystic fibrosis." *Sci Transl Med* 6(246): 246ra296. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008680.
- Chopra A. R., Kommagani R., Saha P., Louet J. F., Salazar C., Song J., *et al.* 2011. "Cellular energy depletion resets whole-body energy by promoting coactivator-mediated dietary fuel absorption." *Cell Metab* 13(1): 35-43. DOI: 10.1016/j.cmet.2010.12.001.
- Clancy J. P., Rowe S. M., Accurso F. J., Aitken M. L., Amin R. S., Ashlock M. A., *et al.* 2012. "Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation." *Thorax* 67(1): 12-18. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2011-200393.
- Combettes L., Dumont M., Berthon B., Erlinger S. and Claret M. 1988. "Release of calcium from the endoplasmic reticulum by bile acids in rat liver cells." *J Biol Chem* 263(5): 2299-2303.
- Crocenzi F. A., Mottino A. D., Cao J., Veggi L. M., Pozzi E. J., Vore M., *et al.* 2003a. "Estradiol-17beta-D-glucuronide induces endocytic internalization of Bsep in rats." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(2): G449-459. DOI: 10.1152/ajpgi.00508.2002.
- Crocenzi F. A., Mottino A. D., Sanchez Pozzi E. J., Pellegrino J. M., Rodriguez Garay E. A., Milkiewicz P., *et al.* 2003b. "Impaired localisation and transport function of canalicular Bsep in tauroolithocholate induced cholestasis in the rat." *Gut* 52(8): 1170-1177. DOI: 10.1136/gut.52.8.1170.
- Crocenzi F. A., Sanchez Pozzi E. J., Ruiz M. L., Zucchetti A. E., Roma M. G., Mottino A. D., *et al.* 2008. "Ca(2+)-dependent protein kinase C isoforms are critical to estradiol 17beta-D-glucuronide-induced cholestasis in the rat." *Hepatology* 48(6): 1885-1895. DOI: 10.1002/hep.22532.
- Csanady L., Vergani P. and Gadsby D. C. 2019. "Structure, Gating, and Regulation of the Cftr Anion Channel." *Physiol Rev* 99(1): 707-738. DOI: 10.1152/physrev.00007.2018.
- Czuba L. C., Hillgren K. M. and Swaan P. W. 2018. "Post-translational modifications of transporters." *Pharmacol Ther* 192: 88-99. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.06.013.
- Davies J. C., Van de Steen O., van Koningsbruggen-Rietschel S., Drevinek P., Derichs N., McKone E. F., *et al.* 2019. "GLPG1837, a CFTR potentiator, in p.Gly551Asp (G551D)-CF patients: An open-label, single-arm, phase 2a study (SAPHIRA1)." *J Cyst Fibros* 18(5): 693-699. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.05.006.
- Davit-Spraul A., Fabre M., Branchereau S., Baussan C., Gonzales E., Stieger B., *et al.* 2010. "ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history." *Hepatology* 51(5): 1645-1655. DOI: 10.1002/hep.23539.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- De Boeck K, Munck A, Walker S, Faro A, Hiatt P, Gilmartin G, *et al.* 2014. "Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation." *J Cyst Fibros* 13(6): 674-680. DOI: 10.1016/j.jcf.2014.09.005.
- de Vree J. M., Jacquemin E., Sturm E., Cresteil D., Bosma P. J., Aten J., *et al.* 1998. "Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1): 282-287. DOI: 10.1073/pnas.95.1.282.
- Dean M. and Annilo T. 2005. "Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 123-142. DOI: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162122.
- Dean M., Rzhetsky A. and Allikmets R. 2001. "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." *Genome Res* 11(7): 1156-1166. DOI: 10.1101/gr.184901.
- Debray D., Rainteau D., Barbu V., Rouahi M., El Mourabit H., Lerondel S., *et al.* 2012. "Defects in gallbladder emptying and bile acid homeostasis in mice with cystic fibrosis transmembrane conductance regulator deficiencies." *Gastroenterology* 142(7): 1581-1591. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.02.033.
- Decaens C, Durand M, Grosse B, Cassio D. 2008. "Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity?" *Bio Cell* 100(7):387-398. DOI: 10.1042/BC20070127.
- Deeks E. D. 2021. "Odevixibat: First Approval." *Drugs*. DOI: 10.1007/s40265-021-01594-y.
- Deeley R. G., Westlake C. and Cole S. P. 2006. "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins." *Physiol Rev* 86(3): 849-899. DOI: 10.1152/physrev.00035.2005.
- Delaunay J. L., Bruneau A., Hoffmann B., Durand-Schneider A. M., Barbu V., Jacquemin E., *et al.* 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(2): 560-570. DOI: 10.1002/hep.28929.
- Delaunay J. L., Durand-Schneider A. M., Dossier C., Falguieres T., Gautherot J., Davit-Spraul A., *et al.* 2016. "A functional classification of ABCB4 variations causing progressive familial intrahepatic cholestasis type 3." *Hepatology* 63(5): 1620-1631. DOI: 10.1002/hep.28300.
- Denning G. M., Anderson M. P., Amara J. F., Marshall J., Smith A. E. and Welsh M. J. 1992. "Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive." *Nature* 358(6389): 761-764. DOI: 10.1038/358761a0.

- Dhawan A., Mitry R. R. and Hughes R. D. 2006. "Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders." *J Inher Metab Dis* 29(2-3): 431-435. DOI: 10.1007/s10545-006-0245-8.
- Di Ciaula A., Wang D. Q., Bonfrate L. and Portincasa P. 2013. "Current views on genetics and epigenetics of cholesterol gallstone disease." *Cholesterol* 2013: 298421. DOI: 10.1155/2013/298421.
- Dixon P. H., van Mil S. W., Chambers J., Strautnieks S., Thompson R. J., Lammert F., *et al.* 2009. "Contribution of variant alleles of ABCB11 to susceptibility to intrahepatic cholestasis of pregnancy." *Gut* 58(4): 537-544. DOI: 10.1136/gut.2008.159541.
- Dixon P. H. and Williamson C. 2016. "The pathophysiology of intrahepatic cholestasis of pregnancy." *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 40(2): 141-153. DOI: 10.1016/j.clinre.2015.12.008.
- Dombrowski F., Stieger B. and Beuers U. 2006. "Tauroursodeoxycholic acid inserts the bile salt export pump into canalicular membranes of cholestatic rat liver." *Lab Invest* 86(2): 166-174. DOI: 10.1038/labinvest.3700371.
- Doshi R., Ali A., Shi W., Freeman E. V., Fagg L. A. and van Veen H. W. 2013. "Molecular disruption of the power stroke in the ATP-binding cassette transport protein MsbA." *J Biol Chem* 288(10): 6801-6813. DOI: 10.1074/jbc.M112.430074.
- Dover G. J., Brusilow S. and Samid D. 1992. "Increased fetal hemoglobin in patients receiving sodium 4-phenylbutyrate." *N Engl J Med* 327(8): 569-570. DOI: 10.1056/NEJM199208203270818.
- Droge C., Bonus M., Baumann U., Klindt C., Lainka E., Kathemann S., *et al.* 2017. "Sequencing of FIC1, BSEP and MDR3 in a large cohort of patients with cholestasis revealed a high number of different genetic variants." *J Hepatol* 67(6): 1253-1264. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.07.004.
- Duane W. C. and Javitt N. B. 1999. "27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects." *J Lipid Res* 40(7): 1194-1199.
- Dumont M., Jacquemin E. and Erlinger S. 2002. "Effect of Ursodeoxycholic Acid on the Expression of the Hepatocellular Bile Acid Transporters (Ntcp and bsep) in Rats With Estrogen-Induced Cholestasis." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35(2): 185-191. DOI: 10.1097/00005176-200208000-00015.
- Eckford P. D., Li C., Ramjeesingh M. and Bear C. E. 2012. "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner." *J Biol Chem* 287(44): 36639-36649. DOI: 10.1074/jbc.M112.393637.
- Elferink M. G., Olinga P., Draaisma A. L., Merema M. T., Faber K. N., Slooff M. J., *et al.* 2004. "LPS-induced downregulation of MRP2 and BSEP in human liver is due to a posttranscriptional process." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287(5): G1008-1016. DOI: 10.1152/ajpgi.00071.2004.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ellinger P., Stindt J., Droge C., Sattler K., Stross C., Kluge S., *et al.* 2017. "Partial external biliary diversion in bile salt export pump deficiency: Association between outcome and mutation." *World J Gastroenterol* 23(29): 5295-5303. DOI: 10.3748/wjg.v23.i29.5295.
- Ellis J. L., Bove K. E., Schuetz E. G., Leino D., Valencia C. A., Schuetz J. D., *et al.* 2018. "Zebrafish *abcb11b* mutant reveals strategies to restore bile excretion impaired by bile salt export pump deficiency." *Hepatology* 67(4): 1531-1545. DOI: 10.1002/hep.29632.
- Esteller A. 2008. "Physiology of bile secretion." *World J Gastroenterol* 14(37): 5641-5649. DOI: 10.3748/wjg.14.5641.
- Feng Y. X., Copeland T. D., Oroszlan S., Rein A. and Levin J. G. 1990. "Identification of amino acids inserted during suppression of UAA and UGA termination codons at the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(22): 8860-8863. DOI: 10.1073/pnas.87.22.8860.
- Ferreira R. J., Ferreira M. J. and Dos Santos D. J. 2013. "Assessing the Stabilization of P-Glycoprotein's Nucleotide-Binding Domains by the Linker, Using Molecular Dynamics." *Mol Inform* 32(5-6): 529-540. DOI: 10.1002/minf.201200175.
- Fickert P., Wagner M., Marschall H. U., Fuchsbichler A., Zollner G., Tsybrovskyy O., *et al.* 2006. "24-norUrsodeoxycholic acid is superior to ursodeoxycholic acid in the treatment of sclerosing cholangitis in *Mdr2* (*Abcb4*) knockout mice." *Gastroenterology* 130(2): 465-481. DOI: 10.1053/j.gastro.2005.10.018.
- Fiorucci S., Clerici C., Antonelli E., Orlandi S., Goodwin B., Sadeghpour B. M., *et al.* 2005. "Protective effects of 6-ethyl chenodeoxycholic acid, a farnesoid X receptor ligand, in estrogen-induced cholestasis." *J Pharmacol Exp Ther* 313(2): 604-612. DOI: 10.1124/jpet.104.079665.
- Floquet C., Rousset J. P. and Bidou L. 2012. "[Allele-specific therapy: suppression of nonsense mutations by readthrough inducers]." *Med Sci (Paris)* 28(2): 193-199. DOI: 10.1051/medsci/2012282018.
- Froux L., Elbahnsi A., Boucherle B., Billet A., Baatallah N., Hoffmann B., *et al.* 2020. "Targeting different binding sites in the CFTR structures allows to synergistically potentiate channel activity." *Eur J Med Chem* 190: 112116. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112116.
- Fuchs C. D., Paumgartner G., Wahlstrom A., Schwabl P., Reiberger T., Leditznig N., *et al.* 2017. "Metabolic preconditioning protects BSEP/ABCB11(-/-) mice against cholestatic liver injury." *J Hepatol* 66(1): 95-101. DOI: 10.1016/j.jhep.2016.08.017.
- Gatmaitan Z. C., Nies A. T. and Arias I. M. 1997. "Regulation and translocation of ATP-dependent apical membrane proteins in rat liver." *Am J Physiol* 272(5 Pt 1): G1041-1049. DOI: 10.1152/ajpgi.1997.272.5.G1041.

- Gautherot J., Durand-Schneider A. M., Delautier D., Delaunay J. L., Rada A., Gabillet J., *et al.* 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(7): 5070-5078. DOI: 10.1074/jbc.M111.275438.
- Gerloff T., Stieger B., Hagenbuch B., Madon J., Landmann L., Roth J., *et al.* 1998. "The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver." *J Biol Chem* 273(16): 10046-10050. DOI: 10.1074/jbc.273.16.10046.
- Giovannoni I., Callea F., Bellacchio E., Torre G., De Ville De Goyet J. and Francalanci P. 2015. "Genetics and Molecular Modeling of New Mutations of Familial Intrahepatic Cholestasis in a Single Italian Center." *PLoS One* 10(12): e0145021. DOI: 10.1371/journal.pone.0145021.
- Glantz A., Marschall H. U. and Mattsson L. A. 2004. "Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates." *Hepatology* 40(2): 467-474. DOI: 10.1002/hep.20336.
- Gomez-Ospina N., Potter C. J., Xiao R., Manickam K., Kim M. S., Kim K. H., *et al.* 2016. "Mutations in the nuclear bile acid receptor FXR cause progressive familial intrahepatic cholestasis." *Nat Commun* 7: 10713. DOI: 10.1038/ncomms10713.
- Gonzales E., Grosse B., Cassio D., Davit-Spraul A., Fabre M. and Jacquemin E. 2012. "Successful mutation-specific chaperone therapy with 4-phenylbutyrate in a child with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2." *J Hepatol* 57(3): 695-698. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.04.017.
- Gonzales E., Grosse B., Schuller B., Davit-Spraul A., Conti F., Guettier C., *et al.* 2015. "Targeted pharmacotherapy in progressive familial intrahepatic cholestasis type 2: Evidence for improvement of cholestasis with 4-phenylbutyrate." *Hepatology* 62(2): 558-566. DOI: 10.1002/hep.27767.
- Gonzales E., Taylor S. A., Davit-Spraul A., Thebaut A., Thomassin N., Guettier C., *et al.* 2017. "MYO5B mutations cause cholestasis with normal serum gamma-glutamyl transferase activity in children without microvillous inclusion disease." *Hepatology* 65(1): 164-173. DOI: 10.1002/hep.28779.
- Guicciardi M. E. and Gores G. J. 2002. "Ursodeoxycholic acid cytoprotection: dancing with death receptors and survival pathways." *Hepatology* 35(4): 971-973. DOI: 10.1053/jhep.2002.32931.
- Harris MJ, Kagawa T, Dawson PA, Arias IM. 2004. "Taurocholate transport by hepatic and intestinal bile acid transporters is independent of FIC1 overexpression in Madin-Darby canine kidney cells." *J Gastroenterol Hepatol* 19(7): 819-825. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2004.03347.x.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Hayashi H., Inamura K., Aida K., Naoi S., Horikawa R., Nagasaka H., *et al.* 2012. "AP2 adaptor complex mediates bile salt export pump internalization and modulates its hepatocanalicular expression and transport function." *Hepatology* 55(6): 1889-1900. DOI: 10.1002/hep.25591.
- Hayashi H., Naoi S., Hirose Y., Matsuzaka Y., Tanikawa K., Igarashi K., *et al.* 2016. "Successful treatment with 4-phenylbutyrate in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 refractory to biliary drainage and bilirubin absorption." *Hepatol Res* 46(2): 192-200. DOI: 10.1111/hepr.12561.
- Hayashi H. and Sugiyama Y. 2009. "Short-chain ubiquitination is associated with the degradation rate of a cell-surface-resident bile salt export pump (BSEP/ABCB11)." *Mol Pharmacol* 75(1): 143-150. DOI: 10.1124/mol.108.049288.
- Hayashi H., Takada T., Suzuki H., Akita H. and Sugiyama Y. 2005a. "Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11." *Hepatology* 41(4): 916-924. DOI: 10.1002/hep.20627.
- Hayashi H., Takada T., Suzuki H., Onuki R., Hofmann A. F. and Sugiyama Y. 2005b. "Transport by vesicles of glycine- and taurine-conjugated bile salts and tauro lithocholate 3-sulfate: a comparison of human BSEP with rat Bsep." *Biochim Biophys Acta* 1738(1-3): 54-62. DOI: 10.1016/j.bbali.2005.10.006.
- Henkel S. A., Squires J. H., Ayers M., Ganoza A., McKiernan P. and Squires J. E. 2019. "Expanding etiology of progressive familial intrahepatic cholestasis." *World J Hepatol* 11(5): 450-463. DOI: 10.4254/wjh.v11.i5.450.
- Hirano M., Maeda K., Hayashi H., Kusuhara H. and Sugiyama Y. 2005. "Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin." *J Pharmacol Exp Ther* 314(2): 876-882. DOI: 10.1124/jpet.105.084830.
- Hirschfield G. M., Chapman R. W., Karlsen T. H., Lammert F., Lazaridis K. N. and Mason A. L. 2013. "The genetics of complex cholestatic disorders." *Gastroenterology* 144(7): 1357-1374. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.03.053.
- Hofmann A. F., Zakko S. F., Lira M., Clerici C., Hagey L. R., Lambert K. K., *et al.* 2005. "Novel biotransformation and physiological properties of norursodeoxycholic acid in humans." *Hepatology* 42(6): 1391-1398. DOI: 10.1002/hep.20943.
- Holt J. A., Luo G., Billin A. N., Bisi J., McNeill Y. Y., Kozarsky K. F., *et al.* 2003. "Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis." *Genes Dev* 17(13): 1581-1591. DOI: 10.1101/gad.1083503.

- Homolya L., Fu D., Sengupta P., Jarnik M., Gillet J. P., Vitale-Cross L., *et al.* 2014. "LKB1/AMPK and PKA control ABCB11 trafficking and polarization in hepatocytes." *PLoS One* 9(3): e91921. DOI: 10.1371/journal.pone.0091921.
- Housset C., Chretien Y., Debray D. and Chignard N. 2016. "Functions of the Gallbladder." *Compr Physiol* 6(3): 1549-1577. DOI: 10.1002/cphy.c150050.
- Hoy S. M. 2019. "Elexacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor: First Approval." *Drugs* 79(18): 2001-2007. DOI: 10.1007/s40265-019-01233-7.
- Ismail H., Kalicinski P., Markiewicz M., Jankowska I., Pawlowska J., Kluge P., *et al.* 1999. "Treatment of progressive familial intrahepatic cholestasis: liver transplantation or partial external biliary diversion." *Pediatr Transplant* 3(3): 219-224. DOI: 10.1034/j.1399-3046.1999.00046.x.
- Jacquemin E. 2000. "Progressive familial intrahepatic cholestasis. Genetic basis and treatment." *Clin Liver Dis* 4(4): 753-763. DOI: 10.1016/s1089-3261(05)70139-2.
- Jacquemin E. 2012. "Progressive familial intrahepatic cholestasis." *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36 Suppl 1: S26-35. DOI: 10.1016/S2210-7401(12)70018-9.
- Jain S., Grandits M., Richter L. and Ecker G. F. 2017. "Structure based classification for bile salt export pump (BSEP) inhibitors using comparative structural modeling of human BSEP." *J Comput Aided Mol Des* 31(6): 507-521. DOI: 10.1007/s10822-017-0021-x.
- Jayaprakash N. G. and Surolia A. 2017. "Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability." *Biochem J* 474(14): 2333-2347. DOI: 10.1042/BCJ20170111.
- Jih K. Y. and Hwang T. C. 2013. "Vx-770 potentiates CFTR function by promoting decoupling between the gating cycle and ATP hydrolysis cycle." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(11): 4404-4409. DOI: 10.1073/pnas.1215982110.
- Kagawa T., Orii R., Hirose S., Arase Y., Shiraishi K., Mizutani A., *et al.* 2014. "Ursodeoxycholic acid stabilizes the bile salt export pump in the apical membrane in MDCK II cells." *J Gastroenterol* 49(5): 890-899. DOI: 10.1007/s00535-013-0833-y.
- Kagawa T., Watanabe N., Mochizuki K., Numari A., Ikeno Y., Itoh J., *et al.* 2008. "Phenotypic differences in PFIC2 and BRIC2 correlate with protein stability of mutant Bsep and impaired taurocholate secretion in MDCK II cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294(1): G58-67. DOI: 10.1152/ajpgi.00367.2007.
- Kalicinski P. J., Ismail H., Jankowska I., Kaminski A., Pawlowska J., Drewniak T., *et al.* 2003. "Surgical treatment of progressive familial intrahepatic cholestasis: comparison of partial external biliary diversion and ileal bypass." *Eur J Pediatr Surg* 13(5): 307-311. DOI: 10.1055/s-2003-43570.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kapitulnik J., Pelkonen O., Gundert-Remy U., Dahl S. G. and Boobis A. R. 2009. "Effects of pharmaceuticals and other active chemicals at biological targets: mechanisms, interactions, and integration into PB-PK/PD models." *Expert Opin Ther Targets* 13(7): 867-887. DOI: 10.1517/14728220903018965.
- Keitel V., Burdelski M., Vojnisek Z., Schmitt L., Haussinger D. and Kubitz R. 2009. "De novo bile salt transporter antibodies as a possible cause of recurrent graft failure after liver transplantation: a novel mechanism of cholestasis." *Hepatology* 50(2): 510-517. DOI: 10.1002/hep.23083.
- Keitel V., Vogt C., Haussinger D. and Kubitz R. 2006. "Combined mutations of canalicular transporter proteins cause severe intrahepatic cholestasis of pregnancy." *Gastroenterology* 131(2): 624-629. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.05.003.
- Kerem E. 2005. "Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy." *Pediatr Pulmonol* 40(3): 183-196. DOI: 10.1002/ppul.20200.
- Kim D. J., Yoon S., Ji S. C., Yang J., Kim Y. K., Lee S., *et al.* 2018a. "Ursodeoxycholic acid improves liver function via phenylalanine/tyrosine pathway and microbiome remodelling in patients with liver dysfunction." *Sci Rep* 8(1): 11874. DOI: 10.1038/s41598-018-30349-1.
- Kim Y. and Chen J. 2018b. "Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation." *Science* 359(6378): 915-919. DOI: 10.1126/science.aar7389.
- Kinting S., Li Y., Forstner M., Delhommel F., Sattler M. and Griese M. 2019. "Potentiation of ABCA3 lipid transport function by ivacaftor and genistein." *J Cell Mol Med* 23(8): 5225-5234. DOI: 10.1111/jcmm.14397.
- Kipp H. and Arias I. M. 2000a. "Intracellular trafficking and regulation of canalicular ATP-binding cassette transporters." *Semin Liver Dis* 20(3): 339-351. DOI: 10.1055/s-2000-9388.
- Kipp H. and Arias I. M. 2000b. "Newly synthesized canalicular ABC transporters are directly targeted from the Golgi to the hepatocyte apical domain in rat liver." *J Biol Chem* 275(21): 15917-15925. DOI: 10.1074/jbc.M909875199.
- Kipp H. and Arias I. M. 2002. "Trafficking of canalicular ABC transporters in hepatocytes." *Annu Rev Physiol* 64: 595-608. DOI: 10.1146/annurev.physiol.64.081501.155793.
- Kipp H., Pichetshote N. and Arias I. M. 2001. "Transporters on demand: intrahepatic pools of canalicular ATP binding cassette transporters in rat liver." *J Biol Chem* 276(10): 7218-7224. DOI: 10.1074/jbc.M007794200.
- Kis E., Ioja E., Nagy T., Szente L., Heredi-Szabo K. and Krajcsi P. 2009. "Effect of membrane cholesterol on BSEP/Bsep activity: species specificity studies for substrates and inhibitors." *Drug Metab Dispos* 37(9): 1878-1886. DOI: 10.1124/dmd.108.024778.

- Kolb P. S., Ayaub E. A., Zhou W., Yum V., Dickhout J. G. and Ask K. 2015. "The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis." *Int J Biochem Cell Biol* 61: 45-52. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.01.015.
- Kolling R. and Losko S. 1997. "The linker region of the ABC-transporter Ste6 mediates ubiquitination and fast turnover of the protein." *EMBO J* 16(9): 2251-2261. DOI: 10.1093/emboj/16.9.2251.
- Konstan M. W., VanDevanter D. R., Rowe S. M., Wilschanski M., Kerem E., Sermet-Gaudelus I., *et al.* 2020. "Efficacy and safety of ataluren in patients with nonsense-mutation cystic fibrosis not receiving chronic inhaled aminoglycosides: The international, randomized, double-blind, placebo-controlled Ataluren Confirmatory Trial in Cystic Fibrosis (ACT CF)." *J Cyst Fibros* 19(4): 595-601. DOI: 10.1016/j.jcf.2020.01.007.
- Kruglov E. A., Gautam S., Guerra M. T. and Nathanson M. H. 2011. "Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates bile salt export pump activity in rat hepatocytes." *Hepatology* 54(5): 1790-1799. DOI: 10.1002/hep.24548.
- Kubitz R., Droge C., Kluge S., Stindt J. and Haussinger D. 2014. "Genetic variations of bile salt transporters." *Drug Discov Today Technol* 12: e55-67. DOI: 10.1016/j.ddtec.2014.03.006.
- Kubitz R., Droge C., Kluge S., Stross C., Walter N., Keitel V., *et al.* 2015. "Autoimmune BSEP disease: disease recurrence after liver transplantation for progressive familial intrahepatic cholestasis." *Clin Rev Allergy Immunol* 48(2-3): 273-284. DOI: 10.1007/s12016-014-8457-4.
- Kubitz R., Droge C., Stindt J., Weissenberger K. and Haussinger D. 2012. "The bile salt export pump (BSEP) in health and disease." *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 36(6): 536-553. DOI: 10.1016/j.clinre.2012.06.006.
- Kubitz R., Sutfels G., Kuhlkamp T., Kolling R. and Haussinger D. 2004. "Trafficking of the bile salt export pump from the Golgi to the canalicular membrane is regulated by the p38 MAP kinase." *Gastroenterology* 126(2): 541-553. DOI: 10.1053/j.gastro.2003.11.003.
- Kurbegov A. C., Setchell K. D., Haas J. E., Mierau G. W., Narkewicz M., Bancroft J. D., *et al.* 2003. "Biliary diversion for progressive familial intrahepatic cholestasis: improved liver morphology and bile acid profile." *Gastroenterology* 125(4): 1227-1234. DOI: 10.1016/s0016-5085(03)01199-5.
- Kurz A. K., Graf D., Schmitt M., Vom Dahl S. and Haussinger D. 2001. "Tauroursodesoxycholate-induced choleresis involves p38(MAPK) activation and translocation of the bile salt export pump in rats." *Gastroenterology* 121(2): 407-419. DOI: 10.1053/gast.2001.26262.
- Lam P., Pearson C. L., Soroka C. J., Xu S., Mennone A. and Boyer J. L. 2007. "Levels of plasma membrane expression in progressive and benign mutations of the bile salt export pump (Bsep/Abcb11) correlate with severity of cholestatic diseases." *Am J Physiol Cell Physiol* 293(5): C1709-1716. DOI: 10.1152/ajpcell.00327.2007.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lam P., Wang R. and Ling V. 2005. "Bile acid transport in sister of P-glycoprotein (ABCB11) knockout mice." *Biochemistry* 44(37): 12598-12605. DOI: 10.1021/bi050943e.
- Lam P., Xu S., Soroka C. J. and Boyer J. L. 2012. "A C-terminal tyrosine-based motif in the bile salt export pump directs clathrin-dependent endocytosis." *Hepatology* 55(6): 1901-1911. DOI: 10.1002/hep.25523.
- Lamri Y., Erlinger S., Dumont M., Roda A. and Feldmann G. 1992. "Immunoperoxidase localization of ursodeoxycholic acid in rat biliary epithelial cells. Evidence for a cholehepatic circulation." *Liver* 12(5): 351-354. DOI: 10.1111/j.1600-0676.1992.tb00585.x.
- Lang C., Meier Y., Stieger B., Beuers U., Lang T., Kerb R., *et al.* 2007. "Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury." *Pharmacogenet Genomics* 17(1): 47-60. DOI: 10.1097/01.fpc.0000230418.28091.76.
- Lapierre L. A., Kumar R., Hales C. M., Navarre J., Bhartur S. G., Burnette J. O., *et al.* 2001. "Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems." *Mol Biol Cell* 12(6): 1843-1857. DOI: 10.1091/mbc.12.6.1843.
- Laselva O., Bartlett C., Gunawardena T. N. A., Ouyang H., Eckford P. D. W., Moraes T. J., *et al.* 2021a. "Rescue of multiple class II CFTR mutations by elexacaftor+tezacaftor+ivacaftor mediated in part by the dual activities of elexacaftor as both corrector and potentiator." *Eur Respir J* 57(6). DOI: 10.1183/13993003.02774-2020.
- Laselva O., Qureshi Z., Zeng Z. W., Petrotchenko E. V., Ramjeesingh M., Hamilton C. M., *et al.* 2021b. "Identification of binding sites for ivacaftor on the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *iScience* 24(6): 102542. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102542.
- Le Saux O, Fülöp K, Yamaguchi Y, Iliás A, Szabó Z, Brampton CN, Pomozi V, Huszár K, Arányi T, Váradi A. 2011. "Expression and in vivo rescue of human ABCC6 disease-causing mutants in mouse liver." *PLoS One* 6(9): e24738. DOI: 10.1371/journal.pone.0024738.
- Lecureur V., Courtois A., Payen L., Verhnet L., Guillouzo A. and Fardel O. 2000. "Expression and regulation of hepatic drug and bile acid transporters." *Toxicology* 153(1-3): 203-219. DOI: 10.1016/s0300-483x(00)00315-2.
- Lee H., Zhang Y., Lee F. Y., Nelson S. F., Gonzalez F. J. and Edwards P. A. 2006. "FXR regulates organic solute transporters alpha and beta in the adrenal gland, kidney, and intestine." *J Lipid Res* 47(1): 201-214. DOI: 10.1194/jlr.M500417-JLR200.
- Lee N. P. and Luk J. M. 2010. "Hepatic tight junctions: from viral entry to cancer metastasis." *World J Gastroenterol* 16(3): 289-295. DOI: 10.3748/wjg.v16.i3.289.
- Li C., Ramjeesingh M., Wang W., Garami E., Hewryk M., Lee D., *et al.* 1996. "ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." *J Biol Chem* 271(45): 28463-28468. DOI: 10.1074/jbc.271.45.28463.

- Lipiński P, Jankowska I. 2018. [Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3]. *Dev Period Med* 22(4): 385-389.
- Lingam S., Thonghin N. and Ford R. C. 2017. "Investigation of the effects of the CFTR potentiator ivacaftor on human P-glycoprotein (ABCB1)." *Sci Rep* 7(1): 17481. DOI: 10.1038/s41598-017-17773-5.
- Liu F., Zhang Z., Levit A., Levring J., Touhara K. K., Shoichet B. K., *et al.* 2019. "Structural identification of a hotspot on CFTR for potentiation." *Science* 364(6446): 1184-1188. DOI: 10.1126/science.aaw7611.
- Loo T. W. and Clarke D. M. 1994. "Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis." *J Biol Chem* 269(46): 28683-28689.
- Lu X., Liu L., Shan W., Kong L., Chen N., Lou Y., *et al.* 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(5): 377-389. DOI: 10.2174/1389200220666190426152830.
- Macalou S., Robey R. W., Jabor Gozzi G., Shukla S., Grosjean I., Hegedus T., *et al.* 2016. "The linker region of breast cancer resistance protein ABCG2 is critical for coupling of ATP-dependent drug transport." *Cell Mol Life Sci* 73(9): 1927-1937. DOI: 10.1007/s00018-015-2118-5.
- Makishima M., Okamoto A. Y., Repa J. J., Tu H., Learned R. M., Luk A., *et al.* 1999. "Identification of a nuclear receptor for bile acids." *Science* 284(5418): 1362-1365. DOI: 10.1126/science.284.5418.1362.
- Malatack J. J. and Doyle D. 2018. "A Drug Regimen for Progressive Familial Cholestasis Type 2." *Pediatrics* 141(1). DOI: 10.1542/peds.2016-3877.
- Mareux E., Lapalus M., Amzal R., Almes M., Ait-Slimane T., Delaunay J. L., *et al.* 2020. "Functional rescue of an ABCB11 mutant by ivacaftor: A new targeted pharmacotherapy approach in bile salt export pump deficiency." *Liver Int* 40(8): 1917-1925. DOI: 10.1111/liv.14518.
- Marinelli R. A., Lehmann G. L., Soria L. R. and Marchissio M. J. 2011. "Hepatocyte aquaporins in bile formation and cholestasis." *Front Biosci (Landmark Ed)* 16: 2642-2652. DOI: 10.2741/3877.
- Marteau P., Chazouilleres O., Myara A., Jian R., Rambaud J. C. and Poupon R. 1990. "Effect of chronic administration of ursodeoxycholic acid on the ileal absorption of endogenous bile acids in man." *Hepatology* 12(5): 1206-1208. DOI: 10.1002/hep.1840120521.
- Martin G. M., Chen P. C., Devaraneni P. and Shyng S. L. 2013. "Pharmacological rescue of trafficking-impaired ATP-sensitive potassium channels." *Front Physiol* 4: 386. DOI: 10.3389/fphys.2013.00386.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Meier Y., Zodan T., Lang C., Zimmermann R., Kullak-Ublick G. A., Meier P. J., *et al.* 2008. "Increased susceptibility for intrahepatic cholestasis of pregnancy and contraceptive-induced cholestasis in carriers of the 1331T>C polymorphism in the bile salt export pump." *World J Gastroenterol* 14(1): 38-45. DOI: 10.3748/wjg.14.38.
- Milona A., Owen B. M., Cobbold J. F., Willemsen E. C., Cox I. J., Boudjelal M., *et al.* 2010. "Raised hepatic bile acid concentrations during pregnancy in mice are associated with reduced farnesoid X receptor function." *Hepatology* 52(4): 1341-1349. DOI: 10.1002/hep.23849.
- Misra S., Varticovski L. and Arias I. M. 2003. "Mechanisms by which cAMP increases bile acid secretion in rat liver and canalicular membrane vesicles." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(2): G316-324. DOI: 10.1152/ajpgi.00048.2003.
- Mita S, Suzuki H, Akita H, Stieger B, Meier PJ, Hofmann AF, Sugiyama Y. 2005. "Vectorial transport of bile salts across MDCK cells expressing both rat Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide and rat bile salt export pump." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288(1): G159-167. DOI: 10.1152/ajpgi.00360.2003.
- Mita S., Suzuki H., Akita H., Hayashi H., Onuki R., Hofmann A. F., *et al.* 2006. "Inhibition of bile acid transport across Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB 11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs." *Drug Metab Dispos* 34(9): 1575-1581. DOI: 10.1124/dmd.105.008748.
- Mochizuki K., Kagawa T., Numari A., Harris M. J., Itoh J., Watanabe N., *et al.* 2007. "Two N-linked glycans are required to maintain the transport activity of the bile salt export pump (ABCB11) in MDCK II cells." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(3): G818-828. DOI: 10.1152/ajpgi.00415.2006.
- Moreno M., Molina H., Amigo L., Zanlungo S., Arrese M., Rigotti A., *et al.* 2003. "Hepatic overexpression of caveolins increases bile salt secretion in mice." *Hepatology* 38(6): 1477-1488. DOI: 10.1016/j.hep.2003.09.011.
- Nevens F., Andreone P., Mazzella G., Strasser S. I., Bowlus C., Invernizzi P., *et al.* 2016. "A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis." *N Engl J Med* 375(7): 631-643. DOI: 10.1056/NEJMoa1509840.
- Nishida T., Gatmaitan Z., Che M. and Arias I. M. 1991. "Rat liver canalicular membrane vesicles contain an ATP-dependent bile acid transport system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(15): 6590-6594. DOI: 10.1073/pnas.88.15.6590.
- Noe B., Schliess F., Wettstein M., Heinrich S. and Haussinger D. 1996. "Regulation of taurocholate excretion by a hypo-osmolarity-activated signal transduction pathway in rat liver." *Gastroenterology* 110(3): 858-865. DOI: 10.1053/gast.1996.v110.pm8608896.

- Noe J., Hagenbuch B., Meier P. J. and St-Pierre M. V. 2001. "Characterization of the mouse bile salt export pump overexpressed in the baculovirus system." *Hepatology* 33(5): 1223-1231. DOI: 10.1053/jhep.2001.24171.
- Olsen J. A., Alam A., Kowal J., Stieger B. and Locher K. P. 2020. "Structure of the human lipid exporter ABCB4 in a lipid environment." *Nat Struct Mol Biol* 27(1): 62-70. DOI: 10.1038/s41594-019-0354-3.
- Ortiz D. F., Moseley J., Calderon G., Swift A. L., Li S. and Arias I. M. 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(31): 32761-32770. DOI: 10.1074/jbc.M404337200.
- Overeem A. W., Li Q., Qiu Y. L., Carton-Garcia F., Leng C., Klappe K., *et al.* 2020. "A Molecular Mechanism Underlying Genotype-Specific Intrahepatic Cholestasis Resulting From MYO5B Mutations." *Hepatology* 72(1): 213-229. DOI: 10.1002/hep.31002.
- Pan S., Li X., Jiang P., Jiang Y., Shuai L., He Y., *et al.* 2015. "Variations of ABCB4 and ABCB11 genes are associated with primary intrahepatic stones." *Mol Med Rep* 11(1): 434-446. DOI: 10.3892/mmr.2014.2645.
- Pankowicz F. P., Barzi M., Kim K. H., Legras X., Martins C. S., Wooton-Kee C. R., *et al.* 2018. "Rapid Disruption of Genes Specifically in Livers of Mice Using Multiplex CRISPR/Cas9 Editing." *Gastroenterology* 155(6): 1967-1970 e1966. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.08.037.
- Parks D. J., Blanchard S. G., Bledsoe R. K., Chandra G., Consler T. G., Kliewer S. A., *et al.* 1999. "Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor." *Science* 284(5418): 1365-1368. DOI: 10.1126/science.284.5418.1365.
- Paulusma C. C., de Waart D. R., Kunne C., Mok K. S. and Elferink R. P. 2009. "Activity of the bile salt export pump (ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content." *J Biol Chem* 284(15): 9947-9954. DOI: 10.1074/jbc.M808667200.
- Paulusma C. C., Groen A., Kunne C., Ho-Mok K. S., Spijkerboer A. L., Rudi de Waart D., *et al.* 2006. "Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport." *Hepatology* 44(1): 195-204. DOI: 10.1002/hep.21212.
- Pedersen J. M., Matsson P., Bergstrom C. A., Hoogstraate J., Noren A., LeCluyse E. L., *et al.* 2013. "Early identification of clinically relevant drug interactions with the human bile salt export pump (BSEP/ABCB11)." *Toxicol Sci* 136(2): 328-343. DOI: 10.1093/toxsci/kft197.
- Perez M. J. and Briz O. 2009. "Bile-acid-induced cell injury and protection." *World J Gastroenterol* 15(14): 1677-1689. DOI: 10.3748/wjg.15.1677.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Plass J. R., Mol O., Heegsma J., Geuken M., de Bruin J., Elling G., *et al.* 2004. "A progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 mutation causes an unstable, temperature-sensitive bile salt export pump." *J Hepatol* 40(1): 24-30. DOI: 10.1016/s0168-8278(03)00483-5.
- Plass J. R., Mol O., Heegsma J., Geuken M., Faber K. N., Jansen P. L., *et al.* 2002. "Farnesoid X receptor and bile salts are involved in transcriptional regulation of the gene encoding the human bile salt export pump." *Hepatology* 35(3): 589-596. DOI: 10.1053/jhep.2002.31724.
- Portincasa P. and Calamita G. 2012. "Water channel proteins in bile formation and flow in health and disease: when immiscible becomes miscible." *Mol Aspects Med* 33(5-6): 651-664. DOI: 10.1016/j.mam.2012.03.010.
- 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. DOI: 10.1016/S2210-7401(12)70015-3.
- Poupon R., Arrive L. and Rosmorduc O. 2010. "The cholangiographic features of severe forms of ABCB4/MDR3 deficiency-associated cholangiopathy in adults." *Gastroenterol Clin Biol* 34(6-7): 380-387. DOI: 10.1016/j.gcb.2010.04.011.
- Pranke I., Bidou L., Martin N., Blanchet S., Hatton A., Karri S., *et al.* 2018. "Factors influencing readthrough therapy for frequent cystic fibrosis premature termination codons." *ERJ Open Res* 4(1). DOI: 10.1183/23120541.00080-2017.
- Printsev I., Curiel D. and Carraway K. L., 3rd 2017. "Membrane Protein Quantity Control at the Endoplasmic Reticulum." *J Membr Biol* 250(4): 379-392. DOI: 10.1007/s00232-016-9931-0.
- Procko E., O'Mara M. L., Bennett W. F., Tieleman D. P. and Gaudet R. 2009. "The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter." *FASEB J* 23(5): 1287-1302. DOI: 10.1096/fj.08-121855.
- Quaglia A., Lehec S. C., Hughes R. D., Mitry R. R., Knisely A. S., Devereaux S., *et al.* 2008. "Liver after hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders in children." *Cell Transplant* 17(12): 1403-1414. DOI: 10.3727/096368908787648083.
- Ramachandran P., Shanmugam N. P., Sinani S. A., Shanmugam V., Srinivas S., Sathiyasekaran M., *et al.* 2014. "Outcome of partial internal biliary diversion for intractable pruritus in children with cholestatic liver disease." *Pediatr Surg Int* 30(10): 1045-1049. DOI: 10.1007/s00383-014-3559-x.

- Rao Y. P., Studer E. J., Stravitz R. T., Gupta S., Qiao L., Dent P., *et al.* 2002. "Activation of the Raf-1/MEK/ERK cascade by bile acids occurs via the epidermal growth factor receptor in primary rat hepatocytes." *Hepatology* 35(2): 307-314. DOI: 10.1053/jhep.2002.31104.
- Reshetnyak V. I. 2013. "Physiological and molecular biochemical mechanisms of bile formation." *World J Gastroenterol* 19(42): 7341-7360. DOI: 10.3748/wjg.v19.i42.7341.
- Roman I. D., Fernandez-Moreno M. D., Fueyo J. A., Roma M. G. and Coleman R. 2003. "Cyclosporin A induced internalization of the bile salt export pump in isolated rat hepatocyte couplets." *Toxicol Sci* 71(2): 276-281. DOI: 10.1093/toxsci/71.2.276.
- Russell D. W. 2003. "The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis." *Annu Rev Biochem* 72: 137-174. DOI: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712.
- Russell D. W. 2009. "Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism." *J Lipid Res* 50 Suppl: S120-125. DOI: 10.1194/jlr.R800026-JLR200.
- Sambrotta M. and Thompson R. J. 2015. "Mutations in TJP2, encoding zona occludens 2, and liver disease." *Tissue Barriers* 3(3): e1026537. DOI: 10.1080/21688370.2015.1026537.
- Sasse D., Spornitz U. M. and Maly I. P. 1992. "Liver architecture." *Enzyme* 46(1-3): 8-32. DOI: 10.1159/000468776.
- Sato S., Ward C. L., Krouse M. E., Wine J. J. and Kopito R. R. 1996. "Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation." *J Biol Chem* 271(2): 635-638. DOI: 10.1074/jbc.271.2.635.
- Schliess F., Kurz A. K., vom Dahl S. and Haussinger D. 1997. "Mitogen-activated protein kinases mediate the stimulation of bile acid secretion by tauroursodeoxycholate in rat liver." *Gastroenterology* 113(4): 1306-1314. DOI: 10.1053/gast.1997.v113.pm9322526.
- Schneider E. K. 2018. "Cytochrome P450 3A4 Induction: Lumacaftor versus Ivacaftor Potentially Resulting in Significantly Reduced Plasma Concentration of Ivacaftor." *Drug Metab Lett* 12(1): 71-74. DOI: 10.2174/1872312812666180328105259.
- Siew S. M., Cunningham S. C., Zhu E., Tay S. S., Venuti E., Bolitho C., *et al.* 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(6): 2047-2061. DOI: 10.1002/hep.30773.
- Slavetinsky C. and Sturm E. 2020. "Odevixibat and partial external biliary diversion showed equal improvement of cholestasis in a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis." *BMJ Case Rep* 13(6). DOI: 10.1136/bcr-2019-234185.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Sohail M. I., Donmez-Cakil Y., Szollosi D., Stockner T. and Chiba P. 2021. "The Bile Salt Export Pump: Molecular Structure, Study Models and Small-Molecule Drugs for the Treatment of Inherited BSEP Deficiencies." *Int J Mol Sci* 22(2). DOI: 10.3390/ijms22020784.
- Sohail M. I., Schmid D., Wlcek K., Spork M., Szakacs G., Trauner M., *et al.* 2017. "Molecular Mechanism of Taurocholate Transport by the Bile Salt Export Pump, an ABC Transporter Associated with Intrahepatic Cholestasis." *Mol Pharmacol* 92(4): 401-413. DOI: 10.1124/mol.117.108688.
- Song X., Kaimal R., Yan B. and Deng R. 2008. "Liver receptor homolog 1 transcriptionally regulates human bile salt export pump expression." *J Lipid Res* 49(5): 973-984. DOI: 10.1194/jlr.M700417-JLR200.
- Song X., Vasilenko A., Chen Y., Valanejad L., Verma R., Yan B., *et al.* 2014. "Transcriptional dynamics of bile salt export pump during pregnancy: mechanisms and implications in intrahepatic cholestasis of pregnancy." *Hepatology* 60(6): 1993-2007. DOI: 10.1002/hep.27171.
- Sperber I. 1959. "Secretion of organic anions in the formation of urine and bile." *Pharmacol Rev* 11(1): 109-134.
- Stefkova J., Poledne R. and Hubacek J. A. 2004. "ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases." *Physiol Res* 53(3): 235-243.
- Stieger B. 2011. "The role of the sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) and of the bile salt export pump (BSEP) in physiology and pathophysiology of bile formation." *Handb Exp Pharmacol*(201): 205-259. DOI: 10.1007/978-3-642-14541-4_5.
- Stieger B., Fattinger K., Madon J., Kullak-Ublick G. A. and Meier P. J. 2000. "Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver." *Gastroenterology* 118(2): 422-430. DOI: 10.1016/s0016-5085(00)70224-1.
- Stieger B. and Mahdi Z. M. 2017. "Model Systems for Studying the Role of Canalicular Efflux Transporters in Drug-Induced Cholestatic Liver Disease." *J Pharm Sci* 106(9): 2295-2301. DOI: 10.1016/j.xphs.2017.03.023.
- Stieger B., O'Neill B. and Meier P. J. 1992. "ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles." *Biochem J* 284 (Pt 1): 67-74. DOI: 10.1042/bj2840067.
- Stindt J., Kluge S., Droge C., Keitel V., Stross C., Baumann U., *et al.* 2016. "Bile salt export pump-reactive antibodies form a polyclonal, multi-inhibitory response in antibody-induced bile salt export pump deficiency." *Hepatology* 63(2): 524-537. DOI: 10.1002/hep.28311.
- Stockner T., Gradisch R. and Schmitt L. 2020. "The role of the degenerate nucleotide binding site in type I ABC exporters." *FEBS Lett* 594(23): 3815-3838. DOI: 10.1002/1873-3468.13997.

- Strautnieks S. S., Bull L. N., Knisely A. S., Kocoshis S. A., Dahl N., Arnell H., *et al.* 1998. "A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis." *Nat Genet* 20(3): 233-238. DOI: 10.1038/3034.
- Strautnieks S. S., Byrne J. A., Pawlikowska L., Cebecauerova D., Rayner A., Dutton L., *et al.* 2008. "Severe bile salt export pump deficiency: 82 different ABCB11 mutations in 109 families." *Gastroenterology* 134(4): 1203-1214. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.01.038.
- Szollosi D., Rose-Sperling D., Hellmich U. A. and Stockner T. 2018. "Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters." *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860(4): 818-832. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.10.028.
- Talamo Guevara M. and McColley S. A. 2017. "The safety of lumacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis." *Expert Opin Drug Saf* 16(11): 1305-1311. DOI: 10.1080/14740338.2017.1372419.
- Taylor-Cousar J. L., Munck A., McKone E. F., van der Ent C. K., Moeller A., Simard C., *et al.* 2017. "Tezacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del." *N Engl J Med* 377(21): 2013-2023. DOI: 10.1056/NEJMoa1709846.
- Telbisz A. and Homolya L. 2016. "Recent advances in the exploration of the bile salt export pump (BSEP/ABCB11) function." *Expert Opin Ther Targets* 20(4): 501-514. DOI: 10.1517/14728222.2016.1102889.
- Trauner M. and Boyer J. L. 2003. "Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation." *Physiol Rev* 83(2): 633-671. DOI: 10.1152/physrev.00027.2002.
- Trauner M., Nevens F., Shiffman M. L., Drenth J. P. H., Bowlus C. L., Vargas V., *et al.* 2019. "Long-term efficacy and safety of obeticholic acid for patients with primary biliary cholangitis: 3-year results of an international open-label extension study." *Lancet Gastroenterol Hepatol* 4(6): 445-453. DOI: 10.1016/S2468-1253(19)30094-9.
- Treyer A. and Musch A. 2013. "Hepatocyte polarity." *Compr Physiol* 3(1): 243-287. DOI: 10.1002/cphy.c120009.
- Trzaska C., Amand S., Bailly C., Leroy C., Marchand V., Duvernois-Berthet E., *et al.* 2020. "2,6-Diaminopurine as a highly potent corrector of UGA nonsense mutations." *Nat Commun* 11(1): 1509. DOI: 10.1038/s41467-020-15140-z.
- Tsui L. C. 1995. "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene." *Am J Respir Crit Care Med* 151(3 Pt 2): S47-53. DOI: 10.1164/ajrccm/151.3_Pt_2.S47.
- Urdaneta V. and Casadesus J. 2017. "Interactions between Bacteria and Bile Salts in the Gastrointestinal and Hepatobiliary Tracts." *Front Med (Lausanne)* 4: 163. DOI: 10.3389/fmed.2017.00163.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Vallejo M., Briz O., Serrano M. A., Monte M. J. and Marin J. J. 2006. "Potential role of trans-inhibition of the bile salt export pump by progesterone metabolites in the etiopathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy." *J Hepatol* 44(6): 1150-1157. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.09.017.
- Van der Plas S. E., Kelgtermans H., De Munck T., Martina S. L. X., Dropsit S., Quinton E., *et al.* 2018. "Discovery of N-(3-Carbamoyl-5,5,7,7-tetramethyl-5,7-dihydro-4H-thieno[2,3-c]pyran-2-yl)-1H-pyr azole-5-carboxamide (GLPG1837), a Novel Potentiator Which Can Open Class III Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Channels to a High Extent." *J Med Chem* 61(4): 1425-1435. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01288.
- Van Goor F., Hadida S., Grootenhuis P. D., Burton B., Cao D., Neuberger T., *et al.* 2009. "Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(44): 18825-18830. DOI: 10.1073/pnas.0904709106.
- van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. 2011. "Cell sensitivity assays: the MTT assay." *Methods Mol Biol.* 731:237-45. DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- van Mil S. W., van der Woerd W. L., van der Brugge G., Sturm E., Jansen P. L., Bull L. N., *et al.* 2004. "Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11." *Gastroenterology* 127(2): 379-384. DOI: 10.1053/j.gastro.2004.04.065.
- van Wessel D. B. E., Thompson R. J., Gonzales E., Jankowska I., Sokal E., Grammatikopoulos T., *et al.* 2020. "Genotype correlates with the natural history of severe bile salt export pump deficiency." *J Hepatol* 73(1): 84-93. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.02.007.
- Veit G., Avramescu R. G., Perdomo D., Phuan P. W., Bagdany M., Apaja P. M., *et al.* 2014. "Some gating potentiators, including VX-770, diminish DeltaF508-CFTR functional expression." *Sci Transl Med* 6(246): 246ra297. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008889.
- Wakabayashi Y., Dutt P., Lippincott-Schwartz J. and Arias I. M. 2005. "Rab11a and myosin Vb are required for bile canalicular formation in WIF-B9 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(42): 15087-15092. DOI: 10.1073/pnas.0503702102.
- Wakabayashi Y., Lippincott-Schwartz J. and Arias I. M. 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(7): 3485-3496. DOI: 10.1091/mbc.e03-10-0737.
- Wang D. Q. and Carey M. C. 2014. "Therapeutic uses of animal biles in traditional Chinese medicine: an ethnopharmacological, biophysical chemical and medicinal review." *World J Gastroenterol* 20(29): 9952-9975. DOI: 10.3748/wjg.v20.i29.9952.

- Wang D. Q., Cohen D. E. and Carey M. C. 2009. "Biliary lipids and cholesterol gallstone disease." *J Lipid Res* 50 Suppl: S406-411. DOI: 10.1194/jlr.R800075-JLR200.
- Wang L., Dong H., Soroka C. J., Wei N., Boyer J. L. and Hochstrasser M. 2008. "Degradation of the bile salt export pump at endoplasmic reticulum in progressive familial intrahepatic cholestasis type II." *Hepatology* 48(5): 1558-1569. DOI: 10.1002/hep.22499.
- Wang L., Hou W. T., Chen L., Jiang Y. L., Xu D., Sun L., *et al.* 2020. "Cryo-EM structure of human bile salts exporter ABCB11." *Cell Res* 30(7): 623-625. DOI: 10.1038/s41422-020-0302-0.
- Wang L., Soroka C. J. and Boyer J. L. 2002. "The role of bile salt export pump mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type II." *J Clin Invest* 110(7): 965-972. DOI: 10.1172/JCI15968.
- Wang R., Lam P., Liu L., Forrest D., Yousef I. M., Mignault D., *et al.* 2003. "Severe cholestasis induced by cholic acid feeding in knockout mice of sister of P-glycoprotein." *Hepatology* 38(6): 1489-1499. DOI: 10.1016/j.hep.2003.09.037.
- Wang R., Salem M., Yousef I. M., Tuchweber B., Lam P., Childs S. J., *et al.* 2001. "Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4): 2011-2016. DOI: 10.1073/pnas.031465498.
- Webb B. and Sali A. 2017. "Protein Structure Modeling with MODELLER." *Methods Mol Biol* 1654: 39-54. DOI: 10.1007/978-1-4939-7231-9_4.
- Weber N. D., Odriozola L., Martinez-Garcia J., Ferrer V., Douar A., Benichou B., *et al.* 2019. "Gene therapy for progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 in a clinically relevant mouse model." *Nat Commun* 10(1): 5694. DOI: 10.1038/s41467-019-13614-3.
- Weerachayaphorn J., Cai S. Y., Soroka C. J. and Boyer J. L. 2009. "Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 is a positive regulator of human bile salt export pump expression." *Hepatology* 50(5): 1588-1596. DOI: 10.1002/hep.23151.
- Welsh MJ, Smith AE. 1993. "Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis". *Cell* 73(7): 1251-1254. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90353-r.
- Wietholtz H., Marschall H. U., Sjovall J. and Matern S. 1996. "Stimulation of bile acid 6 alpha-hydroxylation by rifampin." *J Hepatol* 24(6): 713-718. DOI: 10.1016/s0168-8278(96)80268-6.
- Wolkoff A. W. 2014. "Organic anion uptake by hepatocytes." *Compr Physiol* 4(4): 1715-1735. DOI: 10.1002/cphy.c140023.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Woods A., Heslegrave A. J., Muckett P. J., Levene A. P., Clements M., Mobberley M., *et al.* 2011. "LKB1 is required for hepatic bile acid transport and canalicular membrane integrity in mice." *Biochem J* 434(1): 49-60. DOI: 10.1042/BJ20101721.
- Wright J. M., Zeitlin P. L., Cebotaru L., Guggino S. E. and Guggino W. B. 2004. "Gene expression profile analysis of 4-phenylbutyrate treatment of IB3-1 bronchial epithelial cell line demonstrates a major influence on heat-shock proteins." *Physiol Genomics* 16(2): 204-211. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00160.2003.
- Yeh HI, Sohma Y, Conrath K, Hwang TC. 2017. A common mechanism for CFTR potentiators. *J Gen Physiol* 149(12): 1105-1118. DOI: 10.1085/jgp.201711886.
- Yerushalmi B., Sokol R. J., Narkewicz M. R., Smith D. and Karrer F. M. 1999. "Use of rifampin for severe pruritus in children with chronic cholestasis." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 29(4): 442-447. DOI: 10.1097/00005176-199910000-00013.
- Zimmer V., Krawczyk M., Mahler M., Weber S. N., Mullenbach R. and Lammert F. 2012. "Severe hepatocellular dysfunction in obstetric cholestasis related to combined genetic variation in hepatobiliary transporters." *Clin Exp Obstet Gynecol* 39(1): 32-35.
- Zucchetti A. E., Barosso I. R., Boaglio A., Pellegrino J. M., Ochoa E. J., Roma M. G., *et al.* 2011. "Prevention of estradiol 17beta-D-glucuronide-induced canalicular transporter internalization by hormonal modulation of cAMP in rat hepatocytes." *Mol Biol Cell* 22(20): 3902-3915. DOI: 10.1091/mbc.E11-01-0047.

Titre : Pharmacothérapie ciblée des déficits en ABCB11

Mots clés : BSEP, Cholestases génétiques, PFIC2, Potentiators, Sécrétion biliaire, Transporteurs ABC

Résumé : ABCB11/BSEP (Bile Salt Export Pump) est exprimé à la membrane canaliculaire des hépatocytes. Sa fonction de transport d'acides biliaires dans la bile est essentielle à la sécrétion biliaire. Près de 400 variations du gène *ABCB11* ont été identifiées et sont associées à des maladies hépatobiliaires rares, la plus sévère étant la cholestase intrahépatique progressive familiale de type 2 (PFIC2). L'efficacité des traitements médicaux est limitée. Par conséquent, une transplantation hépatique est indiquée avant l'âge adulte pour près de deux tiers des patients. Dans ce contexte, l'identification de thérapies alternatives est un enjeu capital.

Cette thèse s'intéresse à la recherche de stratégies thérapeutiques personnalisées permettant de corriger les conséquences pathologiques de certains variants d'*ABCB11* identifiés chez des patients. Dans le cadre d'une stratégie de traitement par des molécules potentiatrices, nous avons étudié les variants A257V, G562D et T463I d'*ABCB11* par modélisation moléculaire 3D. L'étude de l'expression et de la fonction de ces variants dans différents modèles cellulaires a confirmé que ces variants étaient responsables d'un défaut de fonction du transporteur Abcb11. L'ivacaftor (VX-770, Kalydeco®), approuvé cliniquement pour le traitement de la mucoviscidose, corrigeait le défaut d'activité de ces trois variants.

Des effets similaires ont été observés avec les molécules GLPG1837, SBC040 et SBC219, connues comme potentiators de CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Dans une optique de thérapie combinatoire, nous avons également mis en évidence la capacité de ces potentiators à corriger le défaut de fonction des variants R1090C et R1090W, produits potentiels de la translecture du variant non-sens R1090X. Nous avons également évalué les molécules correctrices elxacaftor (VX-445) et tezacaftor (VX-661). Ces correcteurs, en monothérapie ou en combinaison, permettaient de restaurer l'adressage du variant R1128C, s'accompagnant d'une augmentation significative du transport de taurocholate. De façon intéressante, l'addition de molécules potentiatrices réduisait ces effets. L'ensemble de ces travaux constitue une preuve de concept que les défauts de certains variants d'*ABCB11* peuvent être corrigés par ces molécules potentiatrices à haut potentiel thérapeutique. Ce type de traitements pourrait être envisagé pour les patients atteints de déficit en *ABCB11* et permettrait ainsi d'augmenter la pharmacopée disponible pour traiter ce genre de pathologies et ainsi repousser voir palier à la transplantation hépatique pour les cas les plus sévères.

Title: Targeted pharmacotherapy in ABCB11 deficiency

Keywords: ABC transporters, Biliary secretion, BSEP, Genetic cholestasis, PFIC2, Potentiators

Abstract: ABCB11/BSEP (Bile Salt Export Pump) is expressed at the canalicular membrane of hepatocytes. It ensures bile acids secretion into bile which is essential for biliary secretion. Nearly 400 variations of the *ABCB11* gene have been identified and are associated with rare hepatobiliary diseases, the most severe being progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2). The effectiveness of medical treatments is limited. Consequently, liver transplantation is required before adulthood for almost 2/3 of PFIC2 patients. In this context, the identification of alternative therapies is a major challenge.

This thesis focuses on personalized therapeutic strategies to correct the pathological consequences of some *ABCB11* variations identified in patients. The A257V, G562D and T463I variations of ABCB11 were studied by 3D molecular modelling. These variations were responsible for a defect in Abcb11 transport function. Ivacaftor (VX-770, Kalydeco®), a clinically approved cystic fibrosis treatment, corrects the activity defect of the three variants.

Similar effects were observed with GLPG1837, SBC040 and SBC219, known as potentiators of CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator).

From a combinatory therapy perspective, we also demonstrated the ability of these potentiators to correct the transport defect of the R1090C and R1090W variants, potential readthrough products of the R1090X nonsense variant. We also evaluated the ability of Elexacaftor (VX-445) and Tezacaftor (VX-661) correctors of CFTR. These correctors, alone or in combination, restored trafficking of the R1128C missense variant, leading to a significant increase in the transport function. Interestingly, the addition of potentiators abolishes this effect.

Altogether, this thesis constitutes a proof of concept that molecules with high therapeutic potential can correct the molecular defects of ABCB11 variants. These treatments could increase the pharmacopoeia available for patients with ABCB11 deficiency and thus delay or even suppress the need for liver transplantation.