

Université de Montréal

**Étude de la perméabilité intestinale des médicaments  
par la reconstitution du transporteur BCRP/ABCG2  
dans des protéoliposomes**

par Wided Akik

Axe Formulation et Analyse du Médicament  
Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté de Pharmacie  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en Sciences Pharmaceutiques  
option Technologie Pharmaceutique

Août, 2017

© Wided Akik, 2017



## Résumé

La perméabilité membranaire des cellules régule l'absorption et la distribution des médicaments dans le corps. Des modèles *in vitro* comme le test cellulaire Caco-2 et le test non cellulaire PAMPA sont utilisés pour prédire la biodisponibilité des médicaments. Cependant, le premier est limité par sa reproductibilité et l'hétérogénéité des conditions de culture et le second ne permet que d'étudier le transport passif. Par ailleurs, aucun modèle ne permet l'analyse d'un transporteur membranaire spécifique de façon isolée.

Il est proposé d'étudier la perméabilité membranaire en utilisant une nouvelle approche basée sur l'incorporation de transporteurs recombinants dans des liposomes. Le transporteur choisi pour ce projet est la protéine humaine ABCG2/BCRP qui a le potentiel de limiter la biodisponibilité orale des médicaments. BCRP a été exprimé dans la levure *Pichia pastoris* et a été purifié par chromatographie d'affinité.

L'isoforme 1 de BCRP a été modifié par PCR et cloné dans le vecteur d'expression pJ902-15. Le plasmide résultant contient la région codante pour BCRP avec une étiquette de 10 histidines sous le contrôle du promoteur AOX1. La transformation dans *P. pastoris* est effectuée par électroporation avec le vecteur pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub> linéarisé. Le clone possédant le plus haut niveau d'expression de BCRP a été déterminé par immunobuvardage à l'aide de l'anticorps monoclonal BXP-21. Ce clone a été inoculé dans 1 L de milieu MGY puis les cellules ont été induites dans le milieu MM contenant du méthanol. Les cellules ont été lysées à l'aide du Freezer/Mill et les microsomes ont été solubilisés et purifiés sur une colonne HisTrap HP par le système ÄKTA-FPLC.

Un système d'expression a été établi pour la production de l'isoforme 1 de BCRP recombinant chez *P. pastoris*. L'immunobuvardage montre que BCRP-His<sub>10</sub> a un poids apparent de 65 kDa. À partir d'une culture de levures de 1 L, environ 125 mg de BCRP a pu être partiellement purifié. La prochaine étape pour cette partie du projet est de confirmer que BCRP-His<sub>10</sub> est fonctionnel en mesurant son activité ATPase en présence de la prazosine. Les protéoliposomes de BCRP recombinant serviront de preuve-de-concept pour la génération d'une librairie de transporteurs recombinants incorporé dans des liposomes. Ce modèle facilitera la

compréhension des mécanismes structuraux et fonctionnels du transport des médicaments dans les cellules.

**Mots-clés** : BCRP, ABCG2, biodisponibilité des médicaments, perméabilité intestinale, *Pichia pastoris*, protéoliposomes

## Abstract

Intestinal membrane transporters play a critical role in the pharmacokinetics of orally administered drugs. Membrane permeability of cells regulate the absorption of drugs by modulating their distribution in the body. *In vitro* models like the Caco-2 cell-based assay and the non-cellular PAMPA assay are used to predict the bioavailability of drugs. However, the Caco-2 assay is limited by its reproducibility and heterogeneity of the culture conditions while the PAMPA assay is only used to observe passive permeability. Thus, no model allows the study of isolated and specific membrane transporters.

We propose to study membrane permeability with a new approach using a non-cellular lipid bilayer constituted of recombinant transporter. In this study, the isoform 1 of the human BCRP/ABCG2, which is known to limit the intestinal absorption of drug substrates, was expressed in the yeast *Pichia pastoris* and purified by affinity chromatography.

The isoform 1 of BCRP cDNA was modified by PCR and cloned into the expression vector pJ902-15. The resulting construct contain the coding region of BCRP with a 10 histidines tag under the control of the AOX1 promoter. *P. pastoris* transformation was carried by electroporation with the linearized vector pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub>. The clone with the highest BCRP expression was determined immunoblotting using mAb BXP-21. This clone was inoculated in 1 L of MGY media and induced in the MM media containing methanol. The cells were lysed using a Freezer/Mill and the microsomes were solubilized and purified on an ÄKTA-FPLC system using a HisTrap HP column.

We have established a *P. pastoris* expression system for the production of the recombinant transporter BCRP. Immunoblotting of whole cell lysates shows that the recombinant BCRP has an apparent weight of 65 kDa. From a 1 L yeast culture, approximately 125 mg of BCRP was partially purified. To confirm that BCRP-His<sub>10</sub> is functional, further studies are necessary by measuring the ATPase activity in presence of prazosin. The proteoliposomes of the recombinant BCRP will serve as a proof-of-concept for the generation of a library of recombinant transporter proteins incorporated into liposomes. This model will facilitate the assessment and understanding of the bioavailability of drug candidates.

**Keywords:** BCRP, ABCG2, drug bioavailability, intestinal permeability, *Pichia pastoris*, proteoliposomes

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 - Introduction.....	1
1.1 Mise en contexte.....	1
1.2 Perméabilité membranaire.....	3
1.2.1 Barrière intestinale.....	3
1.2.2 Transport à travers la membrane cellulaire.....	5
1.3 Transporteurs de médicaments.....	8
1.4 Évaluation de la perméabilité membranaire <i>in vitro</i> .....	11
1.4.1 Systèmes de membrane artificielle.....	12
1.4.2 Systèmes cellulaires.....	15
1.5 Transporteurs <i>ATP-binding cassette</i> (ABC).....	17
1.5.1 Transporteurs associés à la résistance aux médicaments.....	17
1.5.2 Structure des transporteurs.....	19
1.5.3 Mécanisme de transport.....	19
1.6 ABCG2/BCRP.....	21
1.6.1 Expression et fonction.....	21
1.6.2 Structure.....	22
1.6.3 Mécanisme de transport.....	23
1.7 Synthèse, purification et analyse d'une protéine membranaire recombinante.....	25
1.7.1 Système d'expression.....	25
1.7.2 Clonage moléculaire.....	28

1.7.3 Production et purification de la protéine recombinante .....	29
1.8 Hypothèse .....	31
1.9 Objectifs .....	32
Chapitre 2 – Matériel et méthodes .....	33
2.1 Clonage de BCRP .....	34
2.2 Transformation de <i>P. pastoris</i> .....	36
2.3 Expression de BCRP chez <i>P. pastoris</i> .....	38
2.4 Extraction des vésicules membranaires .....	39
2.5 Solubilisation et purification de BCRP .....	40
2.6 Analyse des échantillons .....	41
2.6.1 Quantification des protéines .....	41
2.6.2 SDS-PAGE et Western blot .....	42
Chapitre 3 – Résultats .....	44
3.1 Clonage de BCRP .....	44
3.2 Expression de BCRP chez <i>P. pastoris</i> .....	47
3.3 Extraction des vésicules membranaires .....	49
3.4 Solubilisation et purification de BCRP .....	50
Chapitre 4 – Discussion .....	53
4.1 Clonage de BCRP .....	53
4.2 Expression de BCRP chez <i>P. pastoris</i> .....	54
4.3 Extraction des vésicules membranaires .....	57
4.4 Solubilisation et purification de BCRP .....	58
4.5 Résumé .....	61
Chapitre 5 – Conclusion et perspectives .....	61
Bibliographie .....	65



## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Exemples de médicaments interagissant avec les transporteurs ABC et SLC.....	10
<b>Tableau II.</b> Séquences des amorces utilisées lors de la réaction de PCR .....	35
<b>Tableau III.</b> Conditions de la réaction de PCR pour l'amplification du gène recombinant....	35

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Tests de criblage à réaliser sur un candidat durant la phase de découverte d'un médicament.....	2
<b>Figure 2.</b> L'intestin humain absorbe les nutriments et forme une barrière .....	4
<b>Figure 3.</b> Routes d'absorption à travers l'épithélium intestinal et les barrières physique et biochimique régulant l'absorption des médicaments.....	5
<b>Figure 4.</b> Classification des protéines membranaires.....	7
<b>Figure 5.</b> Localisation des transporteurs influençant l'absorption des médicaments dans les tissus humains .....	8
<b>Figure 6.</b> Techniques permettant d'évaluer le potentiel d'un médicament à passer à travers les barrières biologiques.....	12
<b>Figure 7.</b> Processus de reconstitution de protéoliposomes.....	14
<b>Figure 8.</b> Les transporteurs ABC et leur implication dans la résistance aux médicaments .....	18
<b>Figure 9.</b> Structure d'une sous-unité d'un transporteur ABC .....	19
<b>Figure 10.</b> Mécanisme d'efflux d'un transporteur ABC .....	20
<b>Figure 11.</b> Structure de BCRP.....	23
<b>Figure 12.</b> Mécanisme de transport proposé pour BCRP .....	24
<b>Figure 13.</b> Intégration d'un gène d'intérêt dans le génome de <i>Pichia pastoris</i> par recombinaison homologue .....	27
<b>Figure 14.</b> Résumé des procédures utilisés lors d'un clonage moléculaire.....	28
<b>Figure 15.</b> Schématisation des expériences abordés pour la mise au point de <i>P. pastoris</i> comme système d'expression de BCRP-His <sub>10</sub> .....	33
<b>Figure 16.</b> Amplification et modification du gène de l'isoforme 1 de BCRP par PCR .....	45
<b>Figure 17.</b> Sélection d'un clone positif pour le vecteur recombinant pJ902-ABCG2-His <sub>10</sub> chez <i>E. coli</i> .....	45
<b>Figure 18.</b> Vecteur d'expression pour l'isoforme 1 de BCRP chez <i>Pichia pastoris</i> pJ902-ABCG2i-His <sub>10</sub> .....	46
<b>Figure 19.</b> Variation de l'expression de BCRP chez <i>Pichia pastoris</i> .....	48
<b>Figure 20.</b> Induction de l'expression de BCRP chez <i>Pichia pastoris</i> .....	49
<b>Figure 21.</b> Extraction des membranes contenant BCRP de <i>Pichia pastoris</i> .....	50

<b>Figure 22.</b> Purification de BCRP par chromatographie d'affinité au nickel .....	52
<b>Figure 23.</b> Vecteur pJ902-ABCG2ii-His <sub>10</sub> pour l'expression de l'isoforme 2 de BCRP chez <i>Pichia pastoris</i> . .....	64

## Liste des abréviations

ABC : *ATP-binding cassette*, transporteurs ATP-dépendants

ABCG2 : *ATP-binding cassette sub-family G member 2*

ADMET : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité

ADN : Acide désoxyribonucléique

AOX1 : *Alcohol oxidase 1*, alcool oxydase 1

APS : *Ammonium persulfate*, persulfate d'ammonium

ATP : Adénosine triphosphate

BCRP : *Breast cancer resistance protein*

BSA : *Bovin serum albumin*, albumine sérique bovine

Caco-2 : *Caucasian colon adenocarcinoma cell line*, lignée cellulaire d'épithélium d'adénocarcinome colique humain

CHO : *Chinese hamster ovary cell line*, lignée cellulaire d'épithélium ovarien de hamster de Chine

CMC : *Critical micellar concentration*, concentration critique micellaire

Cryo-EM : *Cryo-electron microscopy*, cryomicroscopie électronique

CYP : Cytochromes P450

DDM : n-dodécyl- $\beta$ -D-maltoside

DLS : *Dynamic light scattering*, diffusion dynamique de la lumière

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

DTT : Dithiothréitol

*E. coli* : *Escherichia coli*

ECL : *Enhanced chemiluminescent*, détection améliorée de la chimiluminescence

EDTA : Éthylène diamine tétraacétique

EL3 : *Extracellular loop 3 domain*, domaine de boucle extracellulaire 3

EMA : *European Medicines Agency*, Agence européenne des médicaments

ERAD : *Endoplasmic reticulum-associated protein degradation*, dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique

FDA : *Food and Drug Administration*, Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux

FPLC : *Fast protein liquid chromatography*, chromatographie en phase liquide rapide des protéines

GPCR : *G protein-coupled receptors*, récepteurs couplés aux protéines G

GST : Glutathione S-transférase

HEK : *Human embryonic kidney cell line*, lignée cellulaire d'épithélium rénal embryonique humain

His : Histidine

HPLC : *High performance liquid chromatography*, chromatographie en phase liquide à haute performance

HRP : *Horseradish peroxidase*, peroxydase de raifort

JAM : *Junctional adhesion molecules*, molécules d'adhésion jonctionnelles

LC-MS : *Liquid chromatography-mass spectrometry*, Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse

MBP : *Maltose-binding protein*, protéine liant le maltose

MDCK : *Madin Darby canine kidney cell line*, lignée cellulaire d'épithélium rénal de chien Madin-Darby

MDR : *Multiple drug resistance*, de résistance à de multiples médicaments

MGY : *Minimal glycerol medium*, milieu minimal de glycérol

MM : *Minimal methanol medium*, milieu minimal de méthanol

MRP1 : *Multidrug resistance protein 1*

Mut<sup>+</sup> : *Methanol utilization Plus*, utilisation du méthanol plus

NBD : *Nucleotide-binding domain*, domaine de liaison à l'ATP

P-gp : P-glycoprotéine

*P. pastoris* : *Pichia pastoris*

PAMPA : *Parallel artificial membrane permeability assay*, essai de perméabilité sur membrane parallèle artificielle

PCR : *Polymerase chain reaction*, réaction en chaîne par polymérase

SDS : *Sodium dodecyl sulfate*, dodécylsulfate de sodium

SDS-PAGE : *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*, électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Sf9 : *Spodoptera frugiperda cell line*, lignée cellulaire d'ovaire de *Spodoptera frugiperda*

SLC : *Solute carrier*, transporteurs de soluté

SNP : *Single-nucleotide polymorphism*, polymorphisme d'un seul nucléotide

TAE : Tris, Acétate, EDTA

TBS : *Tris-buffered saline*, tampon Tris salin

TBS-T : *Tris-buffered saline with Tween 20*, tampon Tris salin avec Tween 20

TEMED : Tétraméthyléthylènediamine

TMD : *Transmembrane domain*, domaine transmembranaire

Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane, trishydroxyméthylaminométhane

UTR : *Untranslated regions*, régions non traduites

UV : Ultraviolets

YNB : *Yeast nitrogen base*, base azotée pour levures

YPD : *Yeast extract Peptone Dextrose medium*, milieu contenant l'extrait de levure, la peptone et le dextrose

YPDS : *Yeast extract Peptone Dextrose Sorbitol medium*, milieu contenant l'extrait de levure, la peptone, le dextrose et le sorbitol

*Per aspera ad astra*

« *Par des sentiers ardu jusqu'aux étoiles* »

## Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Pr. Grégoire Leclair, de m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire. Je suis reconnaissante de la confiance et du support qu'il m'a donné pour faire avancer le projet.

Je remercie également mon co-directeur, le Pr. Marc Servant, pour son support et ses judicieux conseils tout au long de ma formation.

Je remercie aussi les membres de mon comité aviseur, les Prs. Denis deBlois et Isabelle Marcotte, pour leurs précieux conseils.

Merci à mon collègue Alex pour son aide et à Nesrine avec qui une amitié s'est bien nouée. Les pauses café entre deux expériences ont été d'un grand bonheur ! Merci à Priscilla pour son encadrement et ses précieuses idées et merci à Étienne pour ses nombreux conseils.

Merci aux professeurs de l'AFAM pour leur aide. J'ai grandement appris auprès de l'équipe. Mes remerciements vont également à tous mes collègues du 4<sup>ième</sup> pour votre agréable compagnie !

Sans oublier un merci à mes collègues du 3<sup>ième</sup> et aux techniciennes Josée et Julie-Ève pour leur aide. Merci au Pr. Martine Raymond et à Sandra Weber pour leurs précieux conseils.

Enfin, je remercie mes parents, mes sœurs et mon petit frère, le reste de ma grande famille en Tunisie et mes amis pour leur amour et leur grand support tout au long de ma formation.

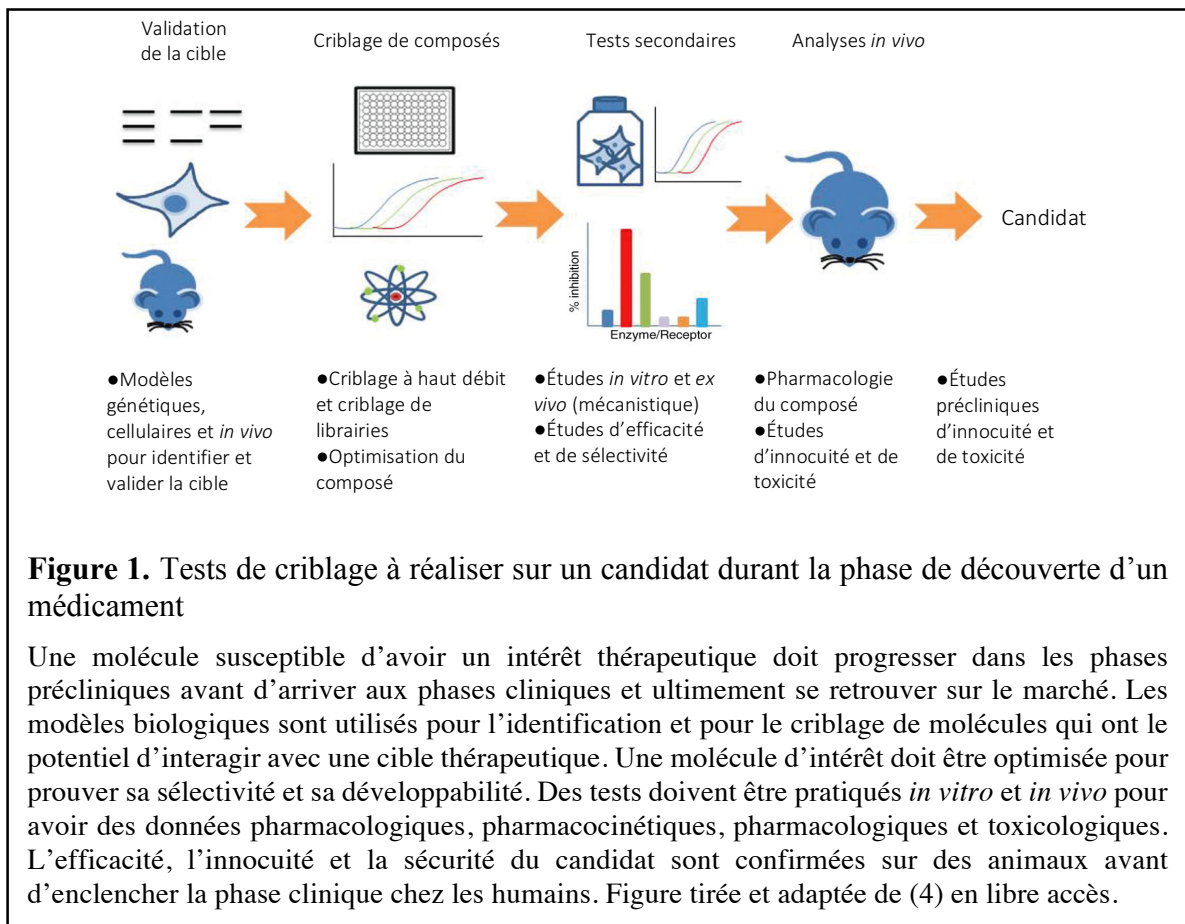


# Chapitre 1 - Introduction

## 1.1 Mise en contexte

La recherche de nouveaux médicaments est un processus complexe nécessitant plusieurs années de travail et beaucoup de ressources financières, tant au niveau industriel qu'au niveau académique. Malgré les investissements, le nombre d'approbations de nouveaux médicaments auprès de la Food and Drug Administration (FDA) est en décroissance (1, 2). De nombreux efforts sont mis en place dans la phase de découverte et développement du médicament afin d'augmenter le taux de succès de la mise en marché d'un médicament.

L'industrie pharmaceutique a adopté une nouvelle approche où les propriétés pharmacologiques sont criblées en parallèle avec les profils pharmacocinétiques. Afin de maximiser les chances de sélectionner un candidat qui se retrouvera rapidement commercialisé, l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et la toxicité (ADMET) des composées doivent être analysés (figure 1) (3). Ainsi, les étapes d'identification, de sélection et d'optimisation d'une nouvelle molécule susceptible d'avoir un intérêt thérapeutique sont critiques. Les propriétés biopharmaceutiques (solubilité, perméabilité intestinale, inhibition des cytochromes P450 (CYP), stabilité métabolique), les profils ADMET et les interactions potentielles médicament-médicament et médicament-transporteur doivent être déterminés (3).



La phase d'essais précliniques demande l'utilisation de modèles expérimentaux *in silico*, *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* et *in vivo* comme outils de prédiction de l'absorption chez l'humain (5, 6). Les modèles animaux sont les plus fiables pour évaluer l'absorption des médicaments. Cependant, leurs coûts sont élevés, demandent un grand investissement de temps et ils ne sont aussi pas en mesure de prédire exactement le comportement d'un médicament dans le corps humain (6). Dans le cas des études *in vitro*, le coût est moins élevé, elles sont plus rapides à réaliser que les études *in vivo* et plus faciles à accepter d'un point de vue éthique (6). Le développement de modèles *in vitro* s'avère essentiel pour faciliter la détermination du statut d'un candidat en tant que substrat ou inhibiteur d'un transporteur, mais aussi pour prédire la biodisponibilité chez l'humain. L'administration orale d'un médicament étant la voie la plus pratique pour un patient, la perméabilité d'une nouvelle entité chimique doit être déterminée par les modèles *in vitro* de la barrière intestinale (7).

## 1.2 Perméabilité membranaire

Pour déterminer la voie d'administration d'un médicament, la présence de plusieurs barrières biologiques dans le corps humain doit être prise en compte. Ces barrières biologiques protègent les organes et les tissus des toxines et des xénobiotiques (8). Les barrières biologiques incluent les barrières buccale, gastrique, intestinale, pulmonaire, nasale, vaginale, testiculaire, oculaire, hépatique, rénale, placentaire, hématoencéphalique et de la peau (6). La compréhension de la structure et des propriétés des barrières permet de trouver de nouvelles stratégies pour améliorer les propriétés physicochimiques et la biodisponibilité d'un médicament.

Suite à l'administration d'un médicament par une route extravasculaire, la molécule doit être absorbée pour se retrouver dans la circulation systémique et être distribuée dans les tissus et les organes. Pour que la molécule se retrouve dans les cellules, elle peut traverser la membrane cellulaire de façon passive ou interagir avec un récepteur ou un transporteur sur un site d'action afin d'obtenir un effet pharmacologique (9). Ainsi, la biodisponibilité d'un médicament est définie comme la fraction de la dose qui atteint la circulation sanguine (10). Elle est fonction de la libération du principe actif et d'autre part de l'absorption (10). Une même molécule sera absorbée différemment selon la voie et la forme d'administration.

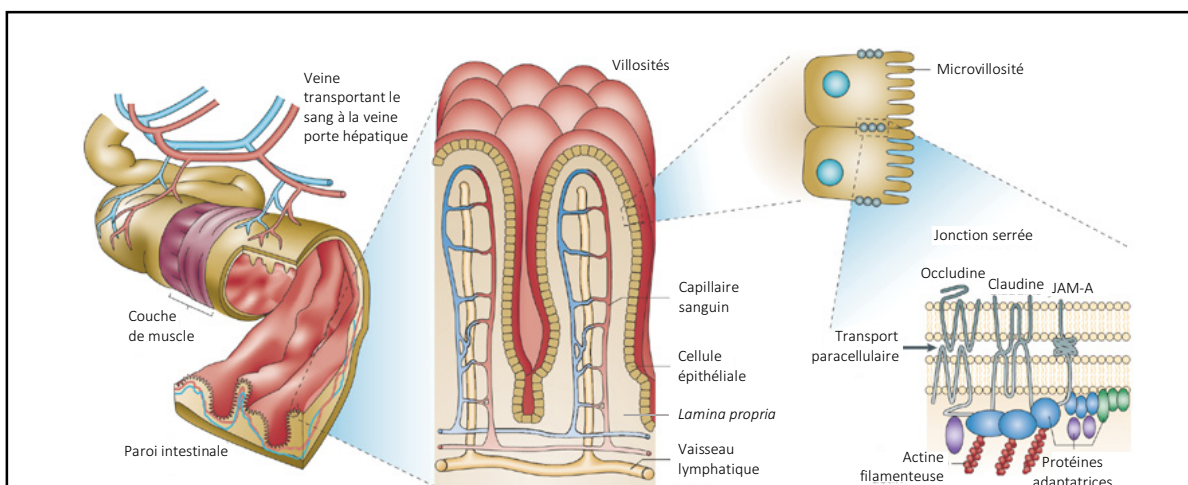
Les processus d'absorption, de distribution, de biotransformation et d'excrétion impliquent le passage des substances à travers les membranes cellulaires selon divers mécanismes biologiques (11). Dans le cas des médicaments oraux, l'absorption se déroule au niveau de la muqueuse intestinale du tractus gastro-intestinal. Malgré les nombreuses avancées dans l'industrie pharmaceutique, l'administration orale des médicaments reste un défi à relever en raison des conditions complexes dans l'intestin (7).

### 1.2.1 Barrière intestinale

La barrière intestinale couvre une surface d'environ 400 m<sup>2</sup> comprenant une monocouche de cellules organisées en cryptes et en villosités (figure 2) (12-14). Elle possède des fonctions métaboliques, digestives et immunologiques (12, 15). Elle permet de protéger

l'organisme de l'invasion de microorganismes pathogènes tout en permettant l'absorption des fluides et des nutriments. Ce système consiste en une barrière externe « physique » et en une barrière interne « biochimique » qui sépare la muqueuse de la lumière de l'intestin.

La barrière physique inclut la membrane cellulaire de l'endothélium vasculaire et des cellules épithéliales. Celles-ci comprennent les entérocytes, les cellules de Paneth, les cellules caliciformes, les cellules M (microplis, *microfold cells*) et les cellules entéro-endocrines. Les jonctions serrées occludine, claudine et JAM scellent cette barrière épithéliale, séparent la lumière de la *lamina propria* et contrôlent la route paracellulaire des solutés et des ions (7, 16, 17). La barrière biochimique est formée par la couche de mucus, les peptides microbiens, les médiateurs inflammatoires, les enzymes du métabolisme et les transporteurs d'efflux sur la membrane cellulaire (7, 13, 17-19).

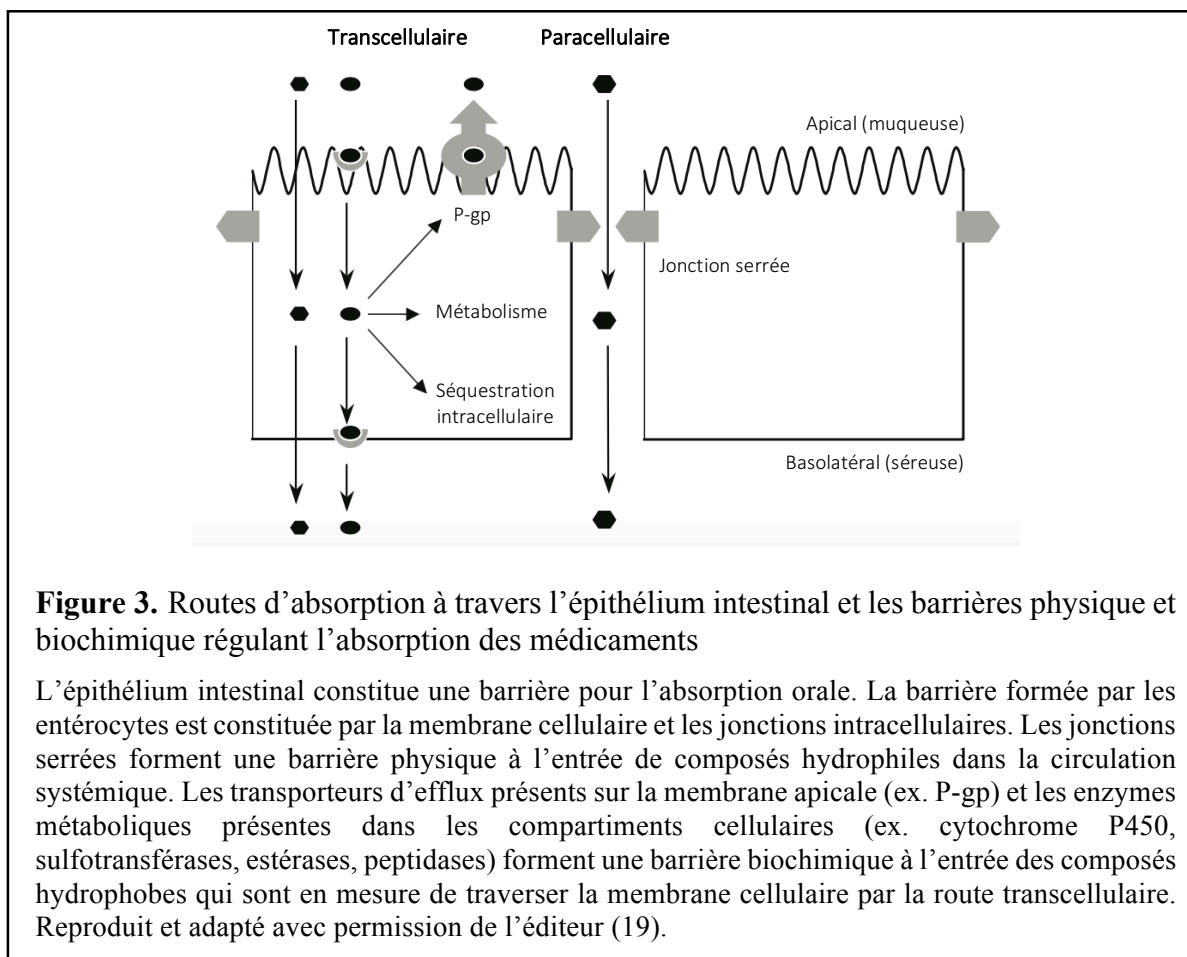


**Figure 2.** L'intestin humain absorbe les nutriments et forme une barrière

La surface absorbante de l'intestin est maximisée par la présence de crêtes, l'organisation de la muqueuse en villosités et en cryptes et les microvillosités des cellules épithéliales. Une couche de cellules épithéliales polarisées repose sur la mince couche de tissu vasculaire (*lamina propria*) et la couche de muscle lisse. La partie apicale de la membrane latérale des entérocytes contient les jonctions serrées qui servent de barrière entre la lumière et la séreuse intestinale de la monocouche de cellules épithéliales. De plus, les jonctions serrées restreignent le mouvement libre de composés des parties apicale et basolatérale et maintiennent la polarité de la membrane permettant le mouvement directionnel de l'eau, électrolytes et nutriments. Reproduit et adapté avec permission de l'éditeur (14).

## 1.2.2 Transport à travers la membrane cellulaire

Pour qu'un médicament soit absorbé, la molécule doit traverser la muqueuse intestinale. Ceci peut se faire selon différents mécanismes, dépendamment de ses propriétés physicochimiques comme la distribution des charges, la taille et l'hydrophobicité. Le transport de molécules à travers la membrane plasmique est médié par des processus passifs ou actifs comme montré à la figure 3.



**Figure 3.** Routes d'absorption à travers l'épithélium intestinal et les barrières physique et biochimique régulant l'absorption des médicaments

L'épithélium intestinal constitue une barrière pour l'absorption orale. La barrière formée par les entérocytes est constituée par la membrane cellulaire et les jonctions intracellulaires. Les jonctions serrées forment une barrière physique à l'entrée de composés hydrophiles dans la circulation systémique. Les transporteurs d'efflux présents sur la membrane apicale (ex. P-gp) et les enzymes métaboliques présentes dans les compartiments cellulaires (ex. cytochrome P450, sulfotransférases, estérases, peptidases) forment une barrière biochimique à l'entrée des composés hydrophobes qui sont en mesure de traverser la membrane cellulaire par la route transcellulaire. Reproduit et adapté avec permission de l'éditeur (19).

### 1.2.2.1 Transport paracellulaire

Le transport paracellulaire implique le passage des molécules dans l'espace entre les jonctions serrées des cellules épithéliales. Ce type de passage est favorisé pour les petites molécules hydrophiles qui ont un rayon hydrodynamique de moins de 11 Å (8, 18, 19). Les

facteurs limitants de cette route sont le diamètre des jonctions cellulaires et la solubilité de la molécule. De plus, la surface disponible pour les molécules au niveau de l'espace intercellulaire est relativement faible comparativement à la grande surface présentée par la membrane apicale des entérocytes par les microvillosités (19).

### **1.2.2.1 Transport transcellulaire**

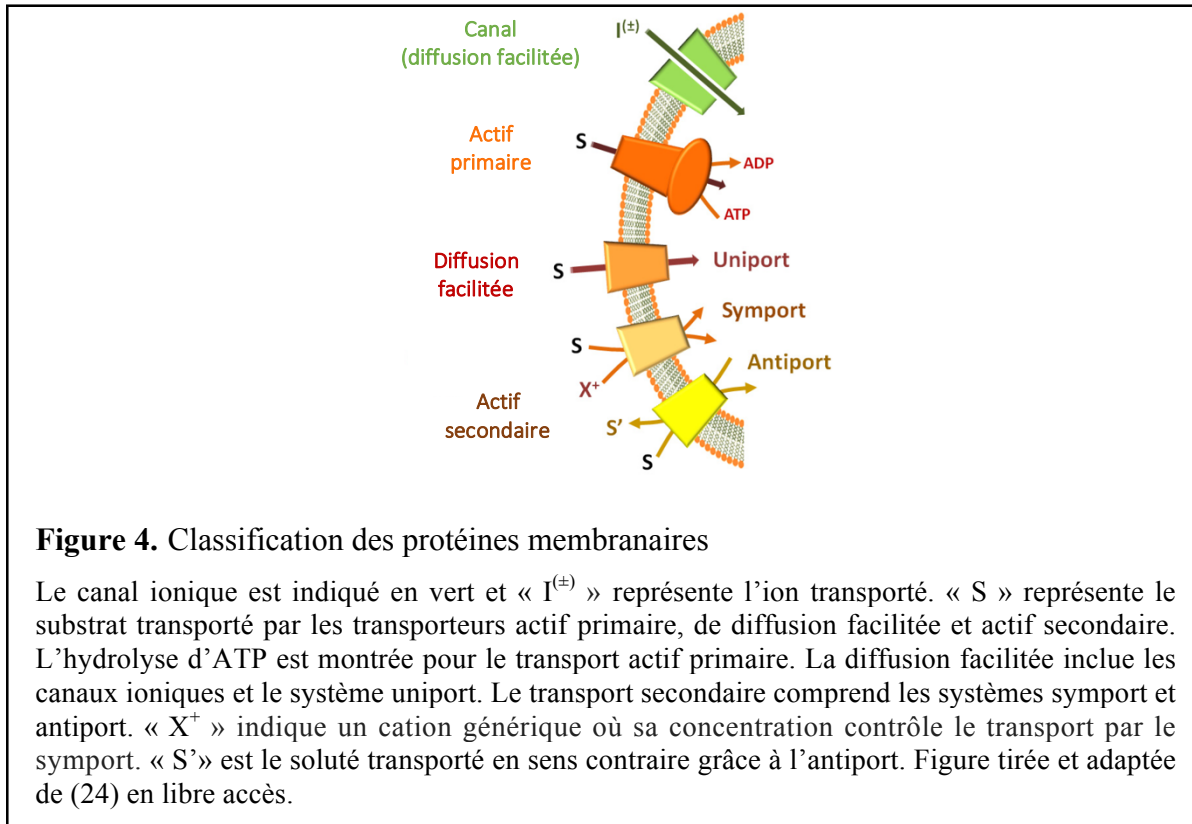
La voie transcellulaire inclut la diffusion passive, la diffusion facilitée, l'endocytose et le transport actif. Typiquement, les molécules neutres lipophiles traversent l'épithélium par la route transcellulaire en se partitionnant dans la membrane cellulaire et diffusent à travers la membrane (19).

Pour la diffusion passive, les molécules traversent la membrane cellulaire selon un gradient de concentration. Les paramètres qui gouvernent la diffusion transmembranaire sont le caractère liposoluble, la polarité et la taille (11, 20). L'oxygène, le dioxyde de carbone, les hormones stéroïdiennes, l'urée et l'éthanol diffuse facilement à travers la membrane.

La diffusion facilitée ressemble à la diffusion passive à l'exception qu'elle implique la participation de protéines transmembranaires et d'un gradient de concentration. Les canaux ioniques et les protéines uniports permettent la diffusion unidirectionnelle d'un soluté selon un gradient de concentration (21, 22). L'eau, le glucose, les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Cl}^-$  utilisent la diffusion facilitée pour être transportés.

Enfin, le transport actif utilise des protéines transmembranaires pour qu'une molécule traverse la membrane contre un gradient de concentration (figure 4). Les molécules hydrophiles comme les sucres, peptides, vitamines utilisent cette voie via des canaux ou des transporteurs. Le transport actif primaire (comme les pompes) utilise l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie, par exemple les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase et  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase (21). Le transport actif secondaire (protéines symport et antiport) utilise l'énergie potentielle provenant d'un gradient électrochimique (21, 23, 24). Les symports permettent le mouvement de deux solutés dans le même sens (par exemple le cotransporteur  $\text{Na}^+$ -glucose) (21). Les antiports permettent le mouvement d'un soluté vers l'intérieur de la cellule couplé à un

mouvement d'un second soluté vers l'extérieur de la cellule (par exemple le cotransporteur  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ ) (21).



**Figure 4.** Classification des protéines membranaires

Le canal ionique est indiqué en vert et «  $I^{(\pm)}$  » représente l'ion transporté. «  $S$  » représente le substrat transporté par les transporteurs actif primaire, de diffusion facilitée et actif secondaire. L'hydrolyse d'ATP est montrée pour le transport actif primaire. La diffusion facilitée inclut les canaux ioniques et le système uniport. Le transport secondaire comprend les systèmes symport et antiport. «  $X^+$  » indique un cation générique où sa concentration contrôle le transport par le symport. «  $S'$  » est le soluté transporté en sens contraire grâce à l'antiport. Figure tirée et adaptée de (24) en libre accès.

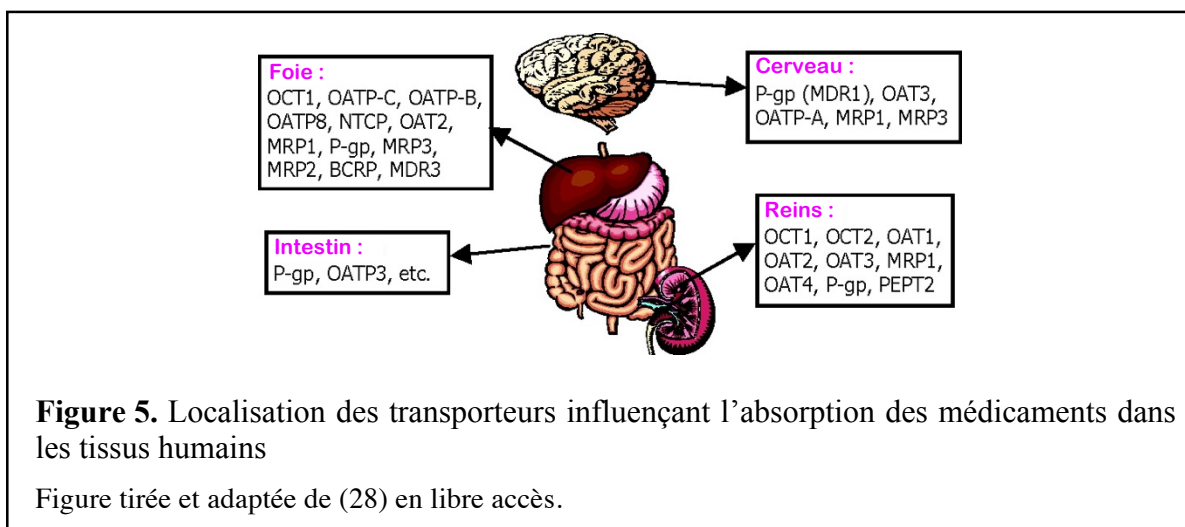
Les transporteurs d'efflux permettent d'exporter une vaste gamme de molécules hors de la cellule vers la lumière de l'intestin. Compte tenu de leur localisation sur la membrane apicale et basolatérale des entérocytes, ils jouent un rôle clé dans la réduction de l'absorption intestinale des médicaments. Les transporteurs de la famille ABC, P-gp, MRP1 et BCRP, sont notamment responsables du phénomène de résistance aux médicaments par leur présence dans plusieurs barrières du corps humain (18, 20, 25).

Les cellules sont aussi en mesure d'utiliser des processus vésiculaires pour transporter des macromolécules dans le cytoplasme (18). Certains mécanismes nécessitent l'aide de protéines, comme la clathrine et des récepteurs de surface, pour former les vésicules à partir de la membrane plasmique. L'endocytose à récepteur (*receptor-mediated endocytosis*) se déroule lorsque la molécule à transporter, par exemple l'insuline et le cholestérol, se lie aux récepteurs

à la surface de la membrane. Puis, le complexe se fait internaliser par la formation de la cage de clathrine et la vésicule se retrouve dans le réseau endolysosomal (18).

### 1.3 Transporteurs de médicaments

Les transporteurs facilitent les échanges des composés endogènes et exogènes à travers la membrane. Sur plus de 400 transporteurs annotés dans le génome humain, environ une trentaine sont impliquées dans l'ADMET des médicaments au niveau des intestins, du foie, des reins, du cerveau et du placenta (26). Ces transporteurs de médicaments ont une influence considérable sur la pharmacocinétique, l'efficacité et la toxicité des composés (26, 27). Ils participent aux interactions médicament-médicament, où les médicaments peuvent potentiellement compétitionner pour lier un transporteur. Ceci change la concentration des substrats dans le sérum et dans les tissus ce qui peut mener à des effets secondaires (27). Les protéines qui influencent le profil pharmacologique des médicaments sont séparées en deux superfamilles : les transporteurs de soluté (*solute carrier*, SLC) et les transporteurs ATP-dépendants (*ATP-binding cassette*, ABC). Diverses isoformes des transporteurs SLC et ABC sont exprimées dans les cellules épithéliales des barrières biologiques (figure 5).





Les transporteurs SLC comptent 395 membres et sont généralement des transporteurs à influx (22). Les membres de cette famille utilisent une variété de mécanismes de transport actif secondaire (symport et antiport) ou de diffusion facilitée (canaux ioniques et uniport) pour transporter des ions organiques, acides aminés, vitamines, neurotransmetteurs et xénobiotiques (22). Ces transporteurs augmentent la perméabilité et donc l'absorption intestinale des médicaments.

Les transporteurs ABC comptent 49 membres et sont des pompes à efflux ATP-dépendantes chez les eucaryotes. Ces protéines empêchent le passage des molécules à travers les barrières cellulaires et tissulaires ce qui assure la défense contre des xénobiotiques. Elles limitent l'absorption d'une variété de médicaments comme les statines, les antibiotiques, les immunosuppresseurs et les anticancéreux (25). Elles sont impliquées dans le phénomène de résistance à de multiples médicaments (*multidrug resistance*, MDR) dans le cancer et les maladies infectieuses. Les transporteurs jouent un rôle dans le métabolisme des médicaments aux phases 0 et III (29, 30). Dans la phase 0, avant que le médicament atteigne sa cible intracellulaire, les transporteurs contrôlent l'entrée et la sortie des molécules. Ceci entraîne l'augmentation ou la réduction d'un effet pharmacologique. Dans la phase III, les transporteurs assurent l'élimination des molécules métabolisées. Les transporteurs d'importance clinique sont la glycoprotéine P (P-gp, ABCB1), MRP1 et MRP2 (*multidrug resistance-associated protein*, ABCC1/2) et BCRP (*breast cancer resistance protein*, ABCG2).

Plusieurs molécules peuvent être des substrats pour les différents membres de ces deux superfamilles. De nombreux médicaments sont en mesure d'interagir avec divers transporteurs (tableau 1). La prédiction des paramètres biopharmaceutiques d'un médicament et l'évaluation de l'implication des transporteurs sont nécessaires durant le développement d'un médicament.

**Tableau I.** Exemples de médicaments interagissant avec les transporteurs ABC et SLC

Médicament (type de médicament)	Transporteurs*			
	ABC	SLC22	SLCO	SLC47
Méthotrexate (anticancéreux, antirhumatismal)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ABCC1</li> <li>• ABCC2</li> <li>• ABCC3</li> <li>• ABCC4</li> <li>• ABCC5</li> <li>• ABCG2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SLC22A6</li> <li>• SLC22A8</li> <li>• SLC22A11</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SLCO1A2</li> <li>• SLCO1B3</li> </ul>	-
Acyclovir (antiviral)	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SLC22A1</li> <li>• SLC22A6</li> <li>• SLC22A7</li> <li>• SLC22A8</li> </ul>	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SLC47A1</li> <li>• SLC47A2</li> </ul>
Adefovir (antiviral)	ABCC4	SLC22A6	-	-
Pravastatine (statine)	ABCB11	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SLC22A8</li> <li>• SLC22A11</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SCLO1B1</li> <li>• SLCO2B1</li> </ul>	-
Rosuvastatine (statine)	ABCG2	SLC22A8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SLCO1A2</li> <li>• SLCO1B1</li> <li>• SLCO1B3</li> <li>• SLCO2B1</li> </ul>	-
Cimétidine (antagoniste du récepteur histaminique H <sub>2</sub> )	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SLC22A2</li> <li>• SLC22A8</li> </ul>	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SLC47A1</li> <li>• SLC47A2</li> </ul>
Metformine (antidiabétique)	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SLC22A1</li> <li>• SLC22A2</li> <li>• SLC22A3</li> </ul>	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• SLC47A1</li> <li>• SLC47A2</li> </ul>

« - » : non disponible, non applicable ou information insuffisante; ABC, ATP-binding cassette; SLC, solute carrier; SLCO, solute carrier organic anion.

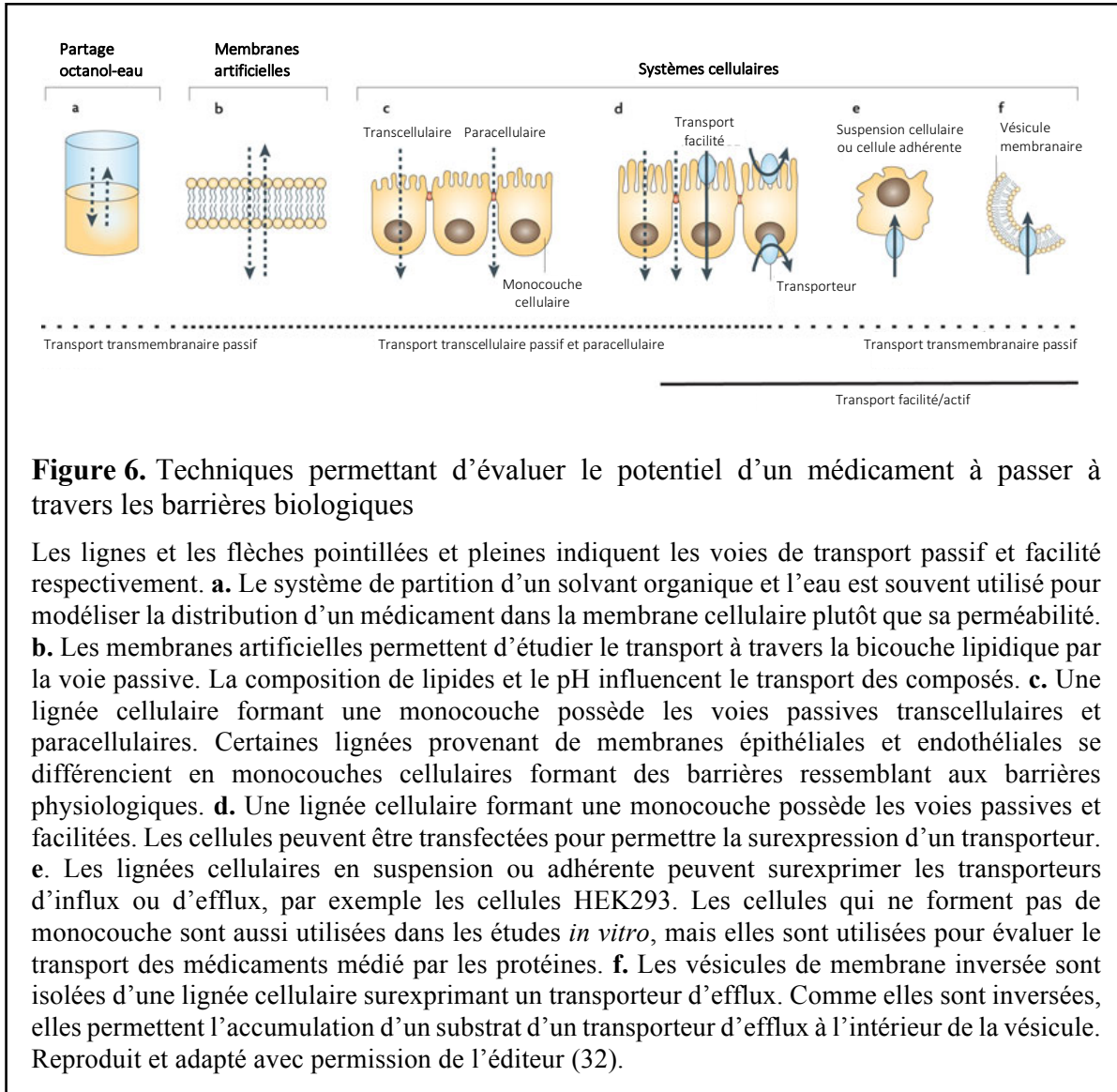
\*Noms communs des transporteurs dans la liste : ABCC1 (MRP1); ABCC2 (MRP2); ABCC3 (MRP3); ABCC4 (MRP4); ABCC5 (MRP5); ABCB11 (BSEP); ABCG2 (BCRP); SLC22A1 (OCT1); SLC22A2 (OCT2); SLC22A3 (OCT3); SLC22A6 (OAT1); SLC22A8 (OAT3); SLC22A11 (OAT4); SLCO1A2 (OATP1A2); SLCO1B1 (OATP1B1); SLCO1B3 (OATP1B3); SLCO2B1 (OATP2B1); SLC47A1 (MATE1); SLC47A2 (MATE2).

Reproduit et adapté avec permission de l'éditeur (27).

## 1.4 Évaluation de la perméabilité membranaire *in vitro*

La caractérisation d'une molécule en tant que substrat ou inhibiteur d'un transporteur est une étape critique pour le développement d'un médicament. La sélection de la dose, l'anticipation de la toxicité et les interactions potentielles médicament-médicament et médicament-transporteurs doivent être considérés (29). Des outils de criblage *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires afin de prédire l'absorption d'un candidat durant les phases précliniques. Les tests doivent permettre d'étudier la capacité d'une molécule de traverser la membrane épithéliale, de prédire son absorption orale et d'évaluer les mécanismes de transports.

Les modèles *in vivo* sont physiologiquement plus représentatifs de la complexité d'un organisme, mais les essais demandent une grande quantité de matériels, des contraintes éthiques et de hauts coûts. Avec des modèles *in vitro*, l'évaluation de la perméabilité se fait avec de moindres coûts tout en respectant les considérations éthiques. Cependant, il n'est pas possible d'incorporer les facteurs physiologiques (âge, maladies, effets environnementaux) dans l'interprétation des résultats et il est laborieux d'extrapoler les données *in vivo* (31). Bien qu'il soit difficile de développer un seul modèle *in vitro* pour simuler la barrière intestinale *in vivo*, plusieurs systèmes *in vitro* avec différents niveaux de complexité ont été développés pour déterminer l'absorption orale d'une molécule (figure 6).



### 1.4.1 Systèmes de membrane artificielle

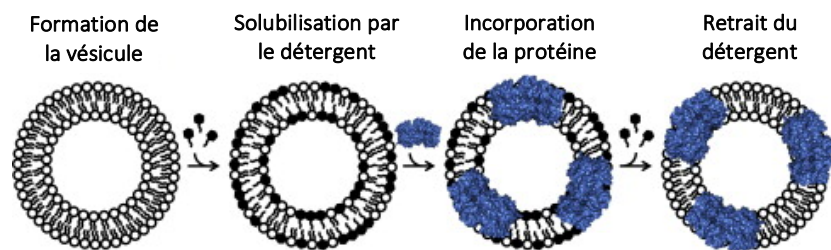
Ces techniques sont utilisées pour estimer la diffusion passive de composés à travers une membrane lipidique artificielle (figure 6b). Ces modèles non cellulaires permettent de mimer l'environnement lipidique de la membrane cellulaire et donc d'évaluer les interactions membrane-médicament (9).

La chromatographie par membrane artificielle immobilisée est une technique de la chromatographie en phase liquide à haute performance (*high performance liquid*

*chromatography*, HPLC) utilisant des lipides comme phase stationnaire. Les molécules qui interagissent fortement avec les lipides sont retenues dans la colonne. Le principe repose sur le fait que la couche lipidique est la principale barrière de la perméabilité de la majorité des solutés et qu'un composé qui a un long temps de rétention dans la colonne devrait avoir une bonne perméabilité à travers la membrane cellulaire (18).

Le test PAMPA (*parallel artificial membrane permeability assay*) est grandement utilisé dans l'industrie pharmaceutique. Il est réalisé sur une plaque de 96 puits séparés en deux compartiments par un filtre imbibé d'un mélange de phospholipides. Le compartiment receveur contient du tampon aqueux et le compartiment donneur contient la solution du composé à tester. Le taux d'apparition du médicament dans le compartiment receveur reflète la diffusion à travers la membrane (18, 33). Les données de perméabilité sont déterminées par des mesures aux UV, par HPLC, LC-MS ou LC-MS/MS (34).

Une alternative à ces stratégies est l'utilisation de protéoliposomes. De nombreux transporteurs ont été exprimés et purifiés à partir de systèmes d'expression hétérologues dans le but de les caractériser dans un environnement isolé, sans interférences moléculaires. Contrairement aux récepteurs membranaires ou aux enzymes, les transporteurs membranaires conservent leur intégrité fonctionnelle s'ils sont reconstitués dans un milieu lipidique (35). Les liposomes sont des vésicules de phospholipides en bicouche. L'incorporation de transporteurs dans les liposomes pour former des protéoliposomes est considérée comme un bon outil pour l'élucidation de la structure et de la fonction de transporteurs (24, 35-37). Sachant que les lipides membranaires influencent la fonction, la stabilité et le repliement des protéines, plusieurs formulations de liposomes peuvent être utilisées. La présence de cholestérol est notamment cruciale dans les stratégies de formulation pour intégrer des protéines humaines puisqu'il régule la stabilité et la fonction des protéines membranaires (38). L'étape critique dans la reconstitution est la solubilisation de la protéine membranaire par un détergent, car l'intégrité de la protéine doit être préservée et la concentration de détergent ne doit pas interférer avec l'insertion. Le principe de reconstitution est résumé à la figure 7.



**Figure 7.** Processus de reconstitution de protéoliposomes

Des vésicules sont formées avec un mélange de lipides par extrusion pour former des liposomes unilamellaires. Les liposomes sont solubilisés avec un détergent, puis les protéines membranaires sont ajoutées, formant des micelles lipide-protéine-détergent. Le détergent doit être retiré par dialyse, par filtration sur gel ou par chromatographie d'adsorption à l'aide de billes de polystyrène. Lorsque la concentration du détergent atteint sa concentration critique micellaire (CMC), la protéine s'associe spontanément avec la membrane lipidique pour former des protéoliposomes. Le schéma ne reflète pas nécessairement le processus au niveau moléculaire. Reproduit et adapté avec permission de l'éditeur (39).

Le détergent non ionique n-dodécyl- $\beta$ -D-maltoside (DDM) est grandement utilisé pour travailler avec les protéines membranaires, car il a la capacité de maintenir l'état fonctionnel de la protéine (37). Suite à la purification de la protéine, les liposomes sont déstabilisés avec le détergent et un complexe lipide-protéine-détergent se forme. Le retrait du détergent, jusqu'à une concentration inférieure à la concentration critique micellaire (*critical micellar concentration*, CMC), force la protéine à s'associer aux phospholipides, ce qui résulte à la formation du protéoliposome (35, 36). La méthode la plus utilisée est la chromatographie d'adsorption hydrophobe par des billes de polystyrène (BioBeads). Dû à la nature amphiphile des détergents, ceux-ci peuvent se lier à une résine ou à des billes hydrophobes insoluble par l'interaction de leur extrémité hydrophobe avec la surface hydrophobe de la bille (37).

Enfin, les protéoliposomes peuvent être analysés par turbidimétrie et par diffusion dynamique de la lumière (*dynamic light scattering*, DLS). La structure et la fonction de la protéine membranaire peuvent être élucidées en utilisant des méthodes comme la spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire), la cristallographie aux rayons X, le dichroïsme circulaire et les essais de liaison d'un ligand (37).

Ces essais sont reconnus comme étant de bons outils de criblage et génèrent de faibles coûts (33). Il est possible d'optimiser les conditions en modifiant le pH des solutions sachant que le pH du tractus intestinal varie entre 6 et 8. La composition des lipides est aussi à considérer, car une variation dans le groupement phosphate et le degré de saturation de la chaîne d'acide gras influencent la diffusion des molécules (33). Toutefois, la couche lipidique n'est pas la seule barrière qui peut moduler l'absorption d'une molécule. Contrairement aux modèles cellulaires, le transport paracellulaire, le transport médié par les transporteurs et le métabolisme ne sont pas considérés dans l'évaluation de la perméabilité.

### 1.4.2 Systèmes cellulaires

Les cellules primaires d'entérocytes en culture ne sont pas en mesure de former une monocouche d'épithélium polarisée, soit de former les surfaces apicale et basolatérale (31, 33). Les cellules immortalisées sont grandement utilisées pour représenter l'épithélium de l'intestin humain et servent d'outils pour évaluer la perméabilité et le transport des médicaments à travers la barrière intestinale (figure 6c-f) (33). Les cellules Caco-2 (*caucasian colon adenocarcinoma*) sont la lignée cellulaire la plus utilisée pour simuler la barrière intestinale (9, 18, 31, 33). Bien qu'elles proviennent d'un adénocarcinome colorectal d'un homme, ces cellules sont en mesure de se différencier en cellules ressemblant aux entérocytes du petit intestin. En effet, les jonctions serrées et les microvillosités sont présentes et les enzymes du métabolisme et les transporteurs d'influx et d'efflux sont exprimés (9, 18, 31, 33). Les cellules Caco-2 croissent en monocouche et se différencient en entérocytes polarisés sur une membrane semi-perméable, permettant de séparer les compartiments apical et basolatéral. Par ailleurs, il y a une bonne corrélation dans le transport des médicaments par la voie paracellulaire passive dans les cellules Caco-2 et *in vivo* (18, 31, 32). Par contre, le désavantage de ce modèle est qu'il ne simule pas la couche normale de cellules épithéliales à cause de l'absence des autres types de cellules formant la barrière intestinale (40).

Une alternative aux cellules Caco-2 est la culture des cellules MDCK (*Madin Darby canine kidney*). Elles sont en mesure de former une monocouche de cellules polarisées en moins de temps (3-5 jours) contrairement aux cellules Caco-2 (17-21 jours) (18). Cependant, leur

origine non humaine et non intestinale, les niveaux d'expression des transporteurs et l'activité métabolique plus faibles que les cellules Caco-2 les désavantagent (31).

Pour augmenter la prédiction de l'hétérogénéité de l'épithélium intestinal *in vivo*, des systèmes de co-culture ont été développés. La coculture de cellules Caco-2/HT-29, Caco-2/cellules Raji et Caco-2/HT-29/cellules Raji permettrait de mieux mimer la barrière intestinale physiologiquement que la monoculture des cellules épithéliales (9, 31, 41). Les cellules HT-29 sont aussi une lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain, mais provenant d'une femme. Ce sont des cellules caliciformes qui sont en mesure de former la couche de mucus de l'épithélium intestinal. Les cellules Raji sont des lymphocytes B pouvant stimuler la différenciation des entérocytes en cellules M (microplis, *microfold cells*) (42). Celles-ci sont spécialisées dans la capture et le transport transcellulaire d'antigènes et recouvrent les lymphocytes et les macrophages intra-épithéliaux (43). Elles sont aussi responsables de l'endocytose de molécules exogènes ou encore de microorganismes présents dans la lumière intestinale (42, 43). La combinaison de ces éléments optimiserait l'obtention d'un modèle fonctionnel physiologiquement plus représentatif pour prédire l'absorption des médicaments au niveau cellulaire (40).

Enfin, les modèles cellulaires d'origine humaine sont des outils de criblage permettant d'évaluer la diffusion, le transport et la toxicité de composés durant les études précliniques. Par contre, les lignées cellulaires proviennent normalement de cellules cancéreuses, et ont donc un profil d'expression protéique différent. Elles possèdent aussi des jonctions plus serrées (environ  $3.7 \pm 0.1 \text{ \AA}$ ) que ce qui est retrouvé dans l'intestin humain (7). De plus, leur coût de maintenance est plus élevé que pour le test PAMPA et il y a plusieurs variabilités inter et intralaboratoire des résultats (9). Dans les milieux industriels et académiques, les tests *in vitro* cellulaires et non cellulaires sont utilisés en parallèle pour aider à l'élucidation de la perméabilité d'un médicament.



## **1.5 Transporteurs *ATP-binding cassette* (ABC)**

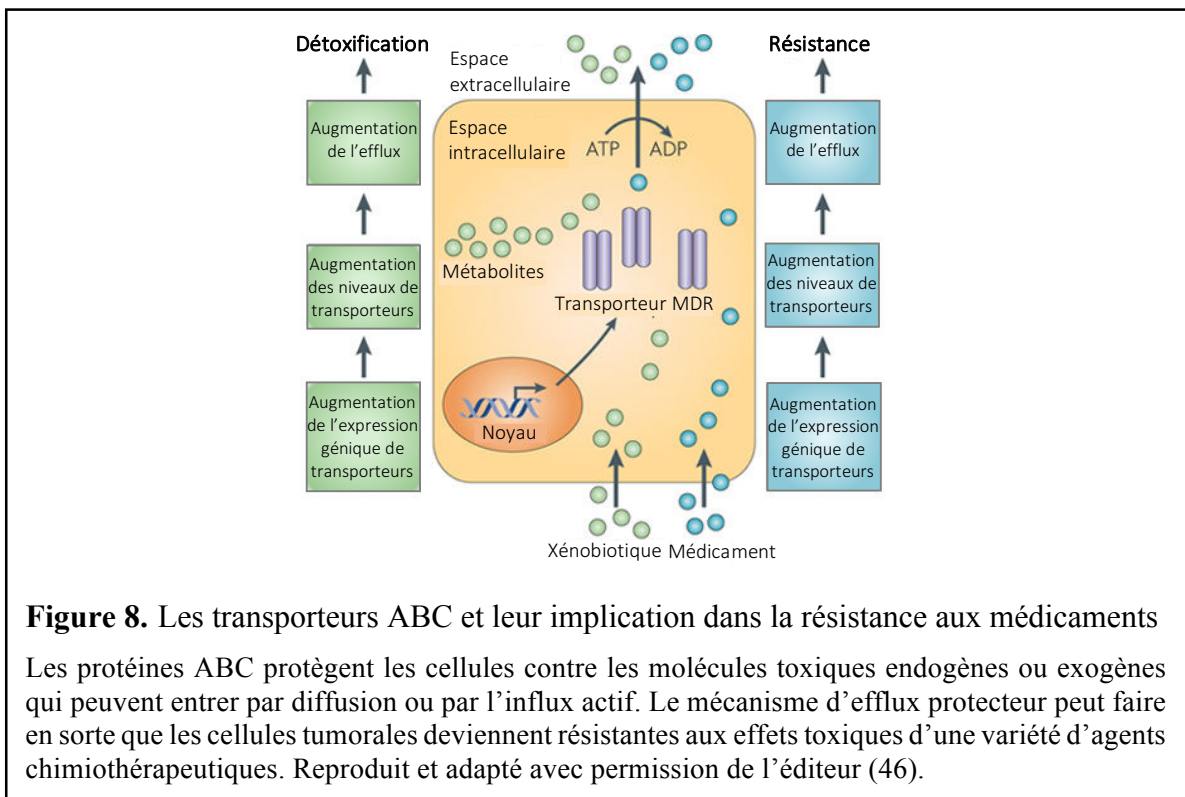
Les transporteurs ABC humains sont séparés en sept sous-familles (A-G) qui diffèrent dans leur taille, leur structure et le positionnement de leurs domaines fonctionnels. Ces transporteurs d'efflux ATP-dépendant sont exprimés dans plusieurs organes comme l'intestin, le cerveau, le foie, le placenta, les poumons, les reins. Dans l'intestin, le foie et les reins, ils réduisent la biodisponibilité des médicaments et altèrent leur pharmacocinétique. Ils participent au transport des lipides, du cholestérol, des peptides, des polysaccharides, des anions organiques et des xénobiotiques (44). Ils sont aussi impliqués dans la résistance aux médicaments, la présentation de l'antigène, l'homéostasie du fer mitochondrial et la régulation des canaux ioniques (45). Des mutations sur leurs gènes sont associées à plusieurs maladies comme la fibrose kystique, l'hypercholestérolémie, l'anémie, la dégénérescence rétinienne et le diabète (45).

### **1.5.1 Transporteurs associés à la résistance aux médicaments**

Il y a 12 transporteurs qui sont responsables de l'efflux des médicaments. Cependant, trois transporteurs majeurs sont impliqués dans le phénomène de résistance à pour une variété de médicaments (MDR) : ABCB1 (P-gp), ABCC1/2 (MRP1/2) et ABCG2 (BCRP). Ces transporteurs sont « omnivores », où leurs substrats incluent différentes classes de médicaments comme les anticancéreux, les antiviraux, les antibactériens, les antiépileptiques, les antidépresseurs, les antiparasitaires et les antifongiques (30). Ces protéines forment une barrière contre les xénobiotiques, ce qui leur donne un rôle dans le développement de la résistance à plusieurs gammes de médicaments.

La première description du rôle des protéines MDR dans la chimiorésistance a été reportée en 1974 par Ling et Thompson où ils ont réalisé que la colchicine n'entrait pas dans le cytoplasme de cellules CHO. Plus tard, ils découvrirent que ces mêmes cellules étaient résistantes à la démécoldicine, l'actinomycine D et la vinblastine. Ainsi, le premier membre des transporteurs ABC, ABCB1 (P-gp), a été identifié (9, 30). La résistance aux agents antinéoplasiques reste un des éléments limitant les taux de survie pour les patients atteints de

cancer (9). La résistance décrit un phénomène où les cellules cancéreuses deviennent résistantes à des classes de médicaments structuralement et pharmacologiquement distincts. Les cellules ont plusieurs mécanismes intrinsèques ou acquis qui leur permettent de s'adapter aux xénobiotiques, soit en réduisant l'influx ou en augmentant l'efflux des molécules. Le mécanisme le plus important est la surexpression des transporteurs ABC (figure 8).

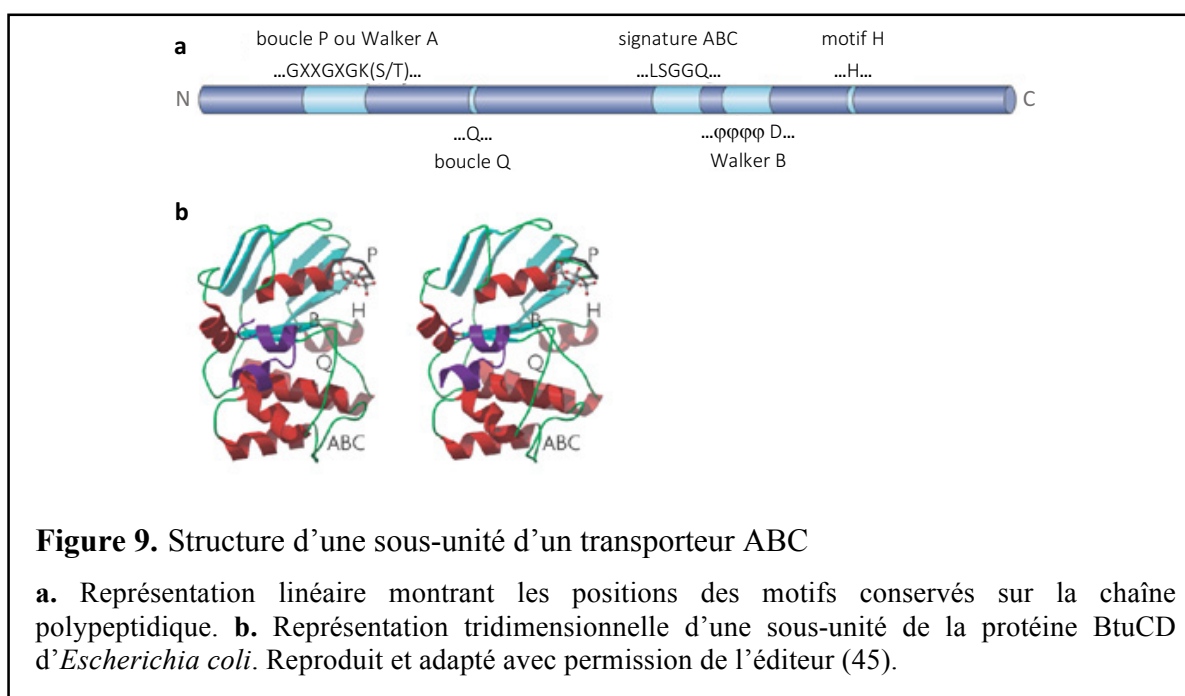


Il y a deux classes de résistance aux médicaments anticancéreux : la résistance qui empêche l'absorption dans les cellules tumorales et la résistance due à des altérations génétiques et épigénétiques qui affectent la sensibilité à un ou plusieurs médicaments (47).

En plus de leur rôle dans la résistance, les transporteurs participent aux interactions médicamenteuses qui peuvent provoquer une toxicité durant l'absorption. Par exemple, BCRP est impliqué dans l'interaction compétitive entre le méthotrexate et les benzimidazoles qui aboutit à la réduction de l'élimination du méthotrexate (30).

## 1.5.2 Structure des transporteurs

Les transporteurs ABC possèdent des motifs communs consistants à au moins un domaine de liaison à l'ATP (*nucleotide-binding domain*, NBD) et deux domaines transmembranaires (*transmembrane domain*, TMD) formés de six hélices  $\alpha$  (22). La liaison et l'hydrolyse subséquente de l'ATP sur le NBD dans le cytoplasme sont requises pour le mouvement des substrats à travers la membrane. Les motifs sur le NBD sont conservés dans la famille ABC (figure 9) : Walker A (GXXGXGK(S/T)) et Walker B ( $\phi\phi\phi\phi$ D, où  $\phi$  est un résidu hydrophobe), le motif signature (LSGGQ), la boucle Q et le motif H (45, 48, 49). La structure commune d'un monomère consiste en six hélices transmembranaires sans motif commun.

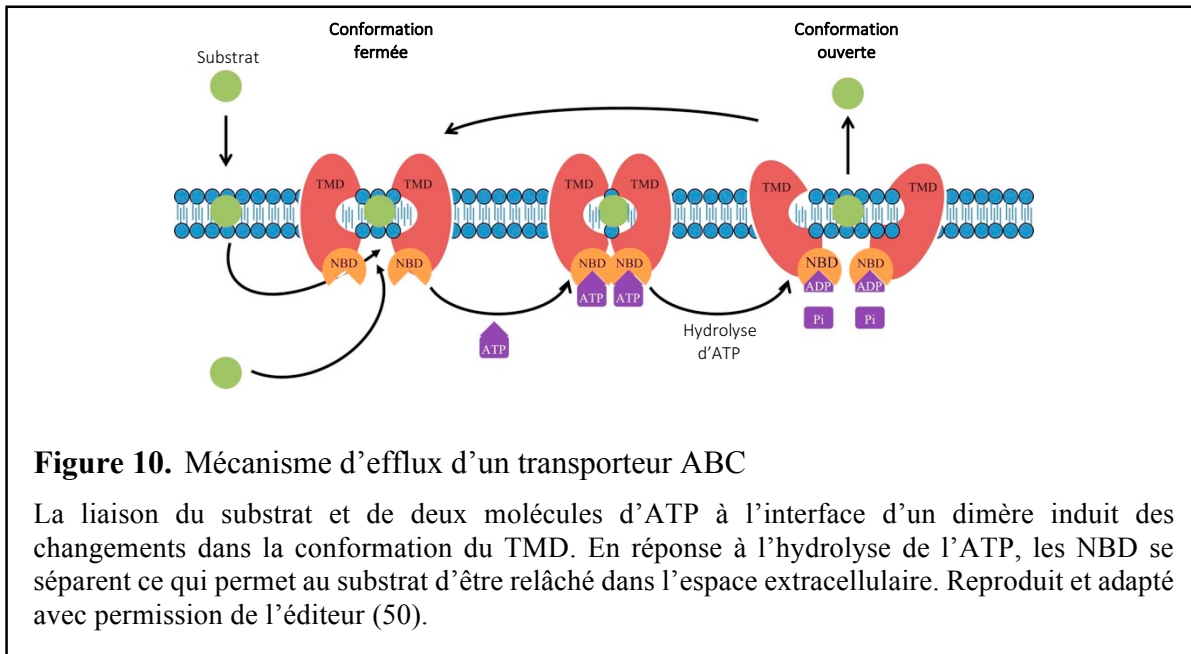


## 1.5.3 Mécanisme de transport

Le NBD catalyse l'hydrolyse de l'ATP et l'énergie résultante est utilisée par les TMD pour transférer une molécule des côtés cis ou trans de la membrane par des changements conformationnels (figure 10) (30, 50). Pour que le transporteur soit fonctionnel, deux protéines

ABC sont connectées à l'interface du NBD par l'interaction de la boucle Q avec les TMD. Cet arrangement permet l'utilisation de deux molécules d'ATP par la présence de deux NBD (50).

Au niveau du NBD, le résidu lysine sur le motif Walker A est impliqué dans la liaison du phosphate- $\beta$  de l'ATP alors que l'acide aspartique du motif Walker B interagit avec l'ion  $Mg^{2+}$ . Le glutamate agirait comme base générale polarisant une molécule d'eau (44, 45). La sérine sur le motif signature serait responsable de la reconnaissance du phosphate- $\gamma$  et l'histidine du motif H aiderait au positionnement de l'eau, de la base générale et de l'ion  $Mg^{2+}$ . La boucle Q formerait le site actif lorsque le  $Mg^{2+}$ -ATP est lié et le désassemblerait dès que l'ATP est hydrolysée (44, 48).



Les molécules sont transportées au niveau de l'interface entre les deux TMD du dimère (48). Les changements conformationnels permettent d'avoir une interconversion entre la version fermée avec les NBD largement séparés (sans présence d'ATP) et la version ouverte où les TMD sont largement éloignés (suite à l'hydrolyse d'ATP) (figure 10).

## 1.6 ABCG2/BCRP

BCRP est le second membre de la sous-famille G des transporteurs ABC. Cette protéine est encodée par le gène ABCG2 située sur le chromosome 4q22 chez l'humain. Elle est responsable de l'efflux ATP-dépendant unidirectionnel de divers composés endogènes et exogènes hors de la cellule. Ses substrats incluent l'estrone-3-sulfate, l'acide urique et la protoporphyrine IX, mais aussi des agents actifs comme la prazosine, la rosuvastatine le méthotrexate, l'imatinib et l'azidothymidine (AZT) (51). Par sa localisation dans les barrières biologiques et sa vaste spécificité de substrats, BCRP est impliqué dans le réseau de défense chimique des cellules, la résistance aux agents anticancéreux et dans les profils ADMET de plusieurs médicaments (51-53). Ainsi, comme pour P-gp et MRP1/2, BCRP fait partie des transporteurs qui doivent être analysés pour les interactions médicament-médicament selon les recommandations de la FDA et de l'EMA (53).

### 1.6.1 Expression et fonction

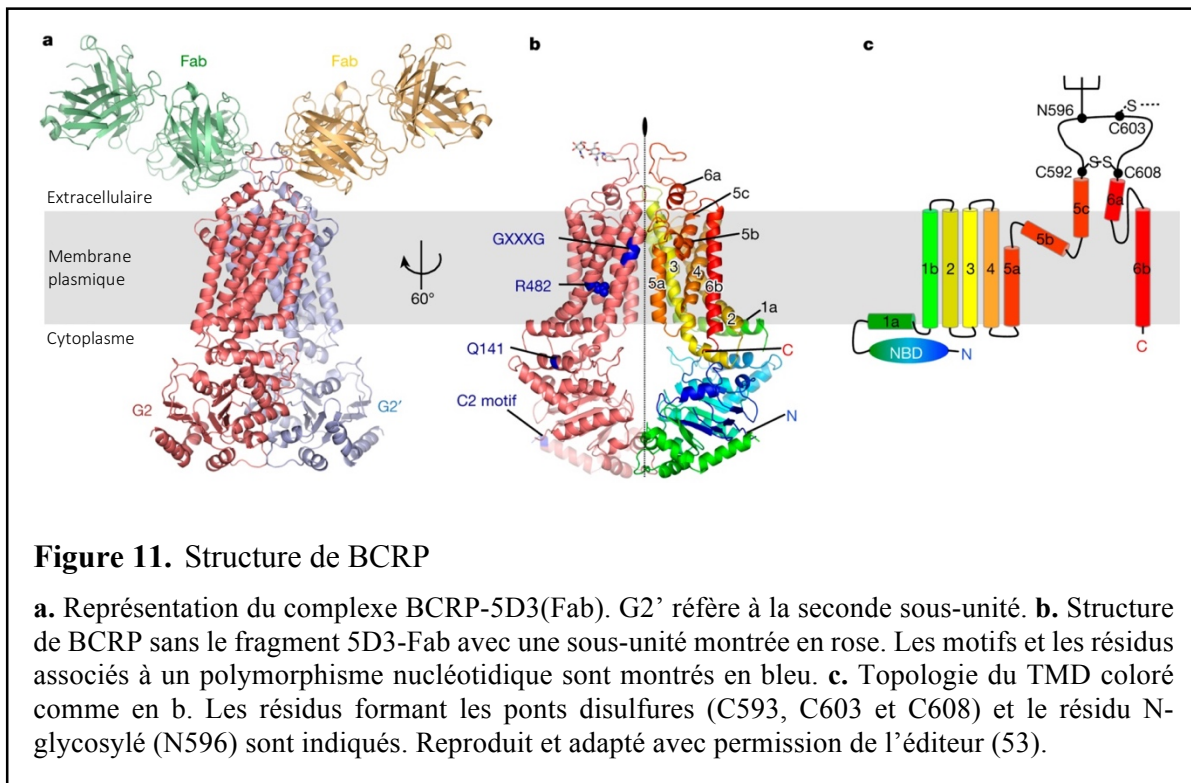
Chez l'humain, BCRP est exprimé majoritairement dans le placenta, le cerveau, la prostate, le petit intestin, le foie, les reins et les cellules souches hématopoïétiques. BCRP régule l'homéostasie des nutriments et de certaines hormones (54, 55). La protéine est localisée sur la membrane apicale de cellules polarisée. La distribution de BCRP dans les différents tissus est reliée à ses rôles physiologiques. En effet, elle limite l'absorption dans le petit intestin, elle est responsable de la distribution dans les barrières hématoencéphalique et hématoplacentaire en plus de faciliter l'élimination et l'excrétion dans le foie et les reins (56). Par ailleurs, elle régule l'efflux de l'hème et des porphyrines hors des cellules comme les érythrocytes et les cellules souches (57, 58). BCRP existe en deux isoformes, où l'isoforme 2 possède une extrémité 3' plus courte et distincte, comparé à l'isoforme 1 qui représente le transcrit le plus long et qui encode pour la protéine plus longue. Le second variant diffère dans la région 5' non traduite (*untranslated region*, UTR). Il utilise un site d'épissage alternatif dans la région codante en 3', ce qui résulte à un changement du cadre de lecture.

Le phénomène MDR est associé à la résistance de différents agents anticancéreux incluant le mitoxantrone, le méthotrexate, l'imatinib, le topotécan, la camptothécine, le flavopiridol et les antifolates (58-60). La surexpression de BCRP est trouvée dans les tumeurs solides et dans la leucémie (leucémie aiguë lymphoblastique et leucémie aiguë myéloblastique) (61). BCRP est aussi un marqueur potentiel pour les cellules souches cancéreuses. Son niveau d'expression est étroitement lié à la tumorigénicité, la prolifération, la chimiorésistance et la capacité de métastaser des cellules cancéreuses (62). Des polymorphismes génétiques altèrent l'expression, la localisation cellulaire et la reconnaissance du substrat. Une modification dans la fonction de BCRP par ces mécanismes est reliée à la variabilité dans la biodisponibilité des médicaments (59, 62, 63). La mutation Q141K, qui est notamment liée à l'hyperuricémie et à la goutte, diminue l'expression de BCRP, mène à son mauvais repliement et à sa dégradation par le système de dégradation des protéines associée au réticulum endoplasmique (*endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*, ERAD) (53). Les polymorphismes nucléotidiques (*single-nucleotide polymorphism*, SNP) R482G et R482T affectent la spécificité de BCRP pour ses substrats (53, 64). Ces mutants sont en mesure de transporter les anthracyclines (doxorubicine, daunorubicine, éirubicine) et les composés fluorescents rhodamine 123 et Lyso-Tracker Green, mais pas le méthotrexate (51, 55).

## 1.6.2 Structure

BCRP est une protéine transmembranaire de 72 kDa composée de 655 acides aminés localisée sur la membrane plasmique des cellules. Elle est considérée comme un demi-transporteur où l'unité fonctionnelle serait un homodimère ou un homooligomère (49, 53, 61, 65). Contrairement aux autres transporteurs ABC, BCRP présente une configuration où le NBD est en N-terminal et le TMD en C-terminal, donnant au dimère un arrangement NBD-TMD-NBD-TMD (56, 60). Les hélices transmembranaires et les boucles intracellulaires sont plus courtes que ceux de la sous-famille B, résultants à une plus petite distance entre les NBD et la membrane. Cette architecture fait en sorte que BCRP ressemble aux transporteurs ABC bactériens (53).

Une récente étude de Taylor *et al.* a permis de déterminer la structure de BCRP en complexe avec le fragment Fab de l'antigène 5D3 (5D3-Fab) par cryomicroscopie électronique (*cryo-electron microscopy*, cryo-EM) (figure 11) (53). L'étude a établi que l'interface du TMD est formée par les hélices TM2 et TM5a de deux monomères de BCRP. De plus, les NBD sont en contact malgré l'absence d'ATP. Chaque 5D3-Fab interagit avec la boucle extracellulaire EL3 de chaque monomère. Cette boucle connecte le TM5c et le TM6a et contient le site de N-glycosylation (N596), le site de pont disulfure intramolécule (C592-C608) et un site de pont disulfure intermolécule (C603). Le pont disulfure intramolécule stabilise la boucle EL3, qui est importante pour la maturation et l'activité de BCRP. Le pont disulfure intermolécule, qui permet de former un dimère covalent, n'est pas critique pour la fonction de BCRP (53).

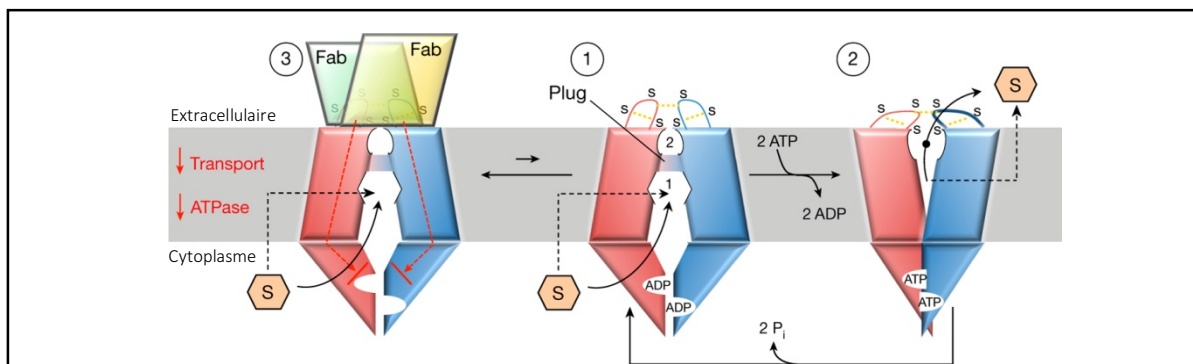


### 1.6.3 Mécanisme de transport

La fonction de BCRP est régulée par la présence de cholestérol dans la membrane plasmique (52, 53, 66). Il y a un fort couplage entre les deux TMD et NBD de l'homodimère

pour ouvrir ou fermer le transporteur et ainsi permettre l'efflux d'un substrat en réponse à la liaison de deux molécules d'ATP (figure 12). En fait, en absence d'ATP liée, le site de liaison du substrat (cavité 1) est exposé au cytoplasme et à la membrane plasmique. Un substrat peut être recruté dans le cytoplasme ou dans la membrane. Lorsque le substrat se retrouve dans sa cavité, l'ATP se lie au NBD et catalyse les changements conformationnels convertissant le transporteur de la conformation fermée (état 1) à la conformation ouverte (état 2) couplé avec la libération du phosphate inorganique (53). Ceci permet de déplacer le substrat vers la cavité 2 et mène à son relâchement dans le milieu extracellulaire.

Pour démontrer le couplage entre les TMD et les NBD, la conformation fermée peut être inhibée par le fragment 5D3-Fab (figure 12). Un fragment Fab peut se lier au transporteur sur le côté extracellulaire afin de bloquer les monomères. Ceci restreint leurs mouvements et empêche l'efflux du substrat et l'hydrolyse d'ATP (53). Ainsi, la liaison du substrat dans la cavité 1 stimule probablement l'activité ATPase du transporteur en stabilisant l'interface du TMD, résultant au rapprochement des NBD.



**Figure 12.** Mécanisme de transport proposé pour BCRP

Les monomères sont colorés en rouge et en bleu et « s » représente les ponts disulfures (ligne pointillée en jaune). Le transport du substrat (hexagone orange) est contrôlé par l'ATP et se passe entre les états 1 et 2 (cercles numérotés). Dans l'état 3, deux fragments de 5D3-Fab (en jaune et en vert) se lient au côté extracellulaire de BCRP et inhibent l'activité ATPase. Le substrat entre dans la cavité 1 par le cytoplasme ou par la membrane, mais n'a pas accès à la cavité 2. La libération du phosphate inorganique ( $P_i$ ) est accompagnée par la conversion de BCRP de l'état 2 à l'état 1. Reproduit et adapté avec permission de l'éditeur (53).



## 1.7 Synthèse, purification et analyse d'une protéine membranaire recombinante

Dans le but de caractériser une protéine, il est nécessaire d'en obtenir en grande quantité. Pour les protéines humaines, il est difficile d'en obtenir à partir des tissus ou de faire de la synthèse *de novo* (67). Afin de contourner ce problème, des systèmes d'expression hétérologues sont utilisés en biologie moléculaire où la machinerie cellulaire de cellules est exploitée pour produire des protéines à partir d'un support génétique. Les systèmes d'expression peuvent être des cellules bactériennes, des levures, des cellules mammifères et d'insectes. Des manipulations génétiques doivent être effectuées selon l'application désirée avec la protéine. Pour faciliter la purification, des étiquettes d'affinité comme polyhistidines, glutathione S-transférase (GST) ou protéine liant le maltose (MBP) peuvent être fusionnées à la protéine d'intérêt. Suite à l'isolation de la protéine recombinante, il est possible d'effectuer des analyses fonctionnelles et structurales de la protéine d'intérêt.

Les protéines membranaires ont des rôles dans plusieurs processus cellulaires et physiologiques. Elles représentent ainsi des cibles thérapeutiques de choix pour l'industrie pharmaceutique. En fait, environ 50% des médicaments développés ciblent les protéines membranaires (68-70). Toutefois, il est difficile de conserver l'intégrité de la protéine en raison de leur caractère hydrophobe et d'en produire à des quantités significatives (en gramme) afin de réaliser des analyses structurales (68-71).

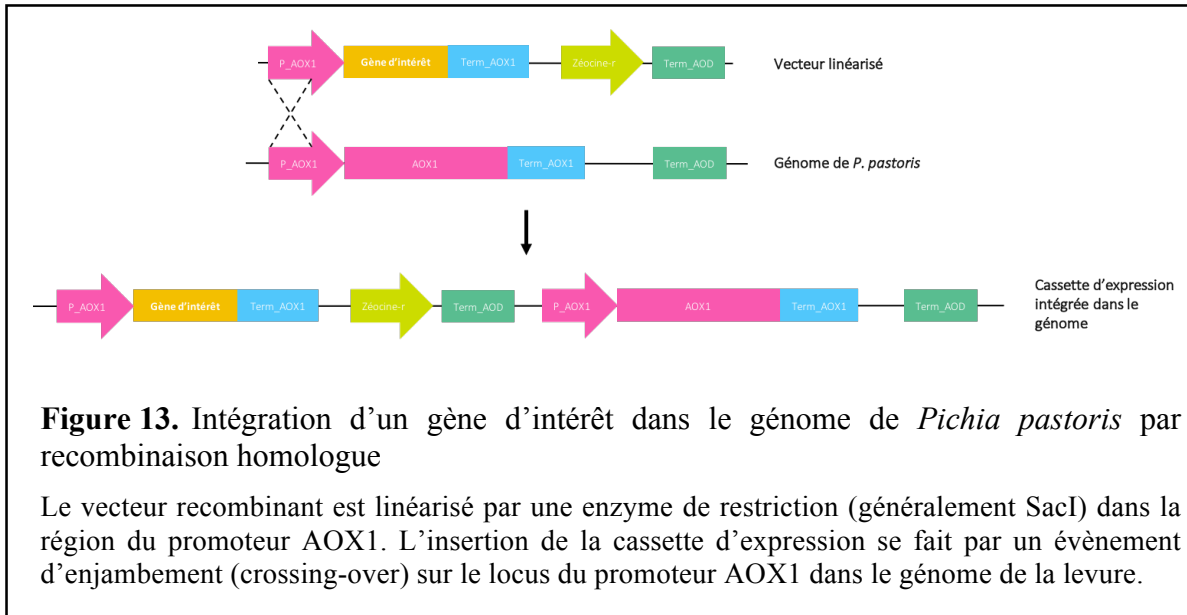
### 1.7.1 Système d'expression

Le choix d'un organisme-hôte repose sur la taille, la quantité désirée, les types de modifications post-traductionnelles ainsi que l'espèce dont la protéine est dérivée (67). De plus, le matériel requis, les coûts, le temps de production et la résolution doivent être considérés. Les systèmes les plus utilisés sont les bactéries (*Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*), les levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*), les cellules mammifères (HEK293, CHO) et les cellules d'insectes infectées par baculovirus (*Spodoptera frugiperda*, Sf9) (68, 70, 72).

Pour la production de protéines membranaires eucaryotes, il est préférable de choisir des systèmes eucaryotes. En effet, la constitution des lipides et les modifications post-traductionnelles comme les processus protéolytiques, la formation de ponts disulfures, la phosphorylation, la O- et N-glycosylation sont essentielles au repliement et à l'activité des protéines (67, 69).

La levure méthylotrrophe *P. pastoris* est devenue un organisme-hôte de choix pour l'expression de protéines membranaires. Les protéines membranaires comme les GPCR, les Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases, les aquaporines, les canaux ioniques et les transporteurs ABC ont déjà été obtenues à partir de *P. pastoris* pour des analyses structurales (38, 68, 69, 71, 73). Dans le cas des protéines membranaires humaines, elles interagissent spécifiquement avec le cholestérol et les phospholipides des membranes pour assurer leur stabilité et réguler leur activité (38). Cependant, pour les levures, c'est l'ergostérol qui est le type de stérol majeur qui régule la fluidité membranaire (38, 74). Cette différence peut influencer l'expression hétérologue des protéines humaines dans la mesure où la localisation, la structure et la fonction peuvent être aberrantes en absence de cholestérol (38). Malgré cet aspect, des protéines fonctionnelles sont tout de même obtenues et les levures sont plus faciles à manipuler que les cellules d'insectes et de mammifères (38). *P. pastoris* a notamment l'avantage de croître à une grande densité cellulaire et permet l'expression d'une protéine qui est inductible au méthanol grâce au promoteur alcool oxydase 1 (*alcohol oxidase 1*, AOX1) (38, 67, 68, 71).

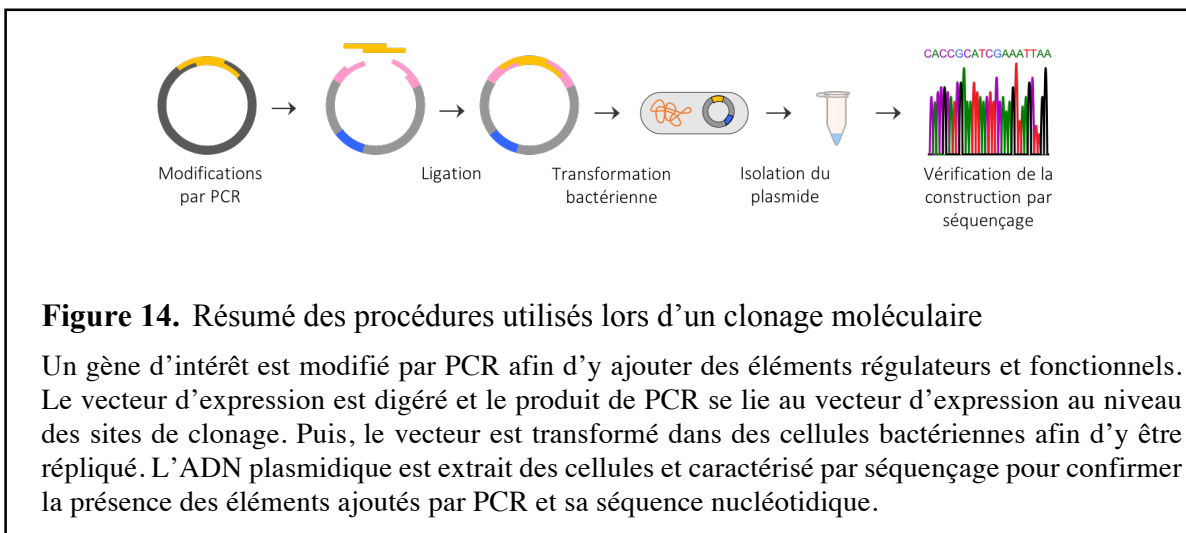
L'approche la plus utilisée pour intégrer un gène d'intérêt chez *P. pastoris* est l'insertion d'une cassette d'expression dans le génome de la levure par recombinaison homologue (figure 13) (67, 73). La recombinaison a lieu entre l'ADN transformé et les régions d'homologie dans le génome. La cible pour l'intégration génomique chez *P. pastoris* est le locus AOX1 (73). Un événement d'enjambement (crossing-over) menant à l'insertion de la cassette d'expression a plus de chance de se dérouler qu'un événement de double crossing-over qui mène au remplacement du locus AOX1 (75).



*P. pastoris* est une levure méthylotrophe capable d'utiliser le méthanol comme source de carbone. Après la transformation, des cellules avec le phénotype Mut<sup>+</sup> sont générées, car elles sont en mesure de métaboliser le méthanol. La croissance des cellules dans un milieu contenant du méthanol résulte à l'induction de l'expression des gènes dans la voie de l'oxydation de l'alcool, incluant l'alcool oxydase (AOX), la formaldéhyde déshydrogénase (FLD) et la dihydroxyacétone synthase (DHAS) (67). Ces enzymes représentent 30% du contenu protéique soluble (76). Le méthanol entre dans la cellule dans des peroxysomes et est converti en formaldéhyde et en peroxyde d'hydrogène par l'AOX1 et AOX2 (76). Puis, le peroxyde d'hydrogène est décomposé en eau et en oxygène moléculaire. Le formaldéhyde sort du peroxysome pour entrer dans les voies cytosoliques de l'énergie et de l'assimilation pour générer la biomasse (76). Le promoteur AOX1 est le plus utilisé dans les stratégies de clonage (76). Ainsi, il est réprimé en présence de glycérol, mais devient hautement stimulé en présence de méthanol (77). La culture de *P. pastoris* se déroule alors en deux étapes : la première est la génération d'une biomasse dans le milieu répressif et la seconde est l'induction de l'expression dans le milieu inducteur (78).

## 1.7.2 Clonage moléculaire

Le clonage est un processus dans lequel un ADN recombinant est produit et transformé dans un organisme-hôte où il est répliqué (figure 14). Il comprend deux composantes : un fragment d'ADN d'intérêt à répliquer (insert) et un vecteur contenant les éléments nécessaires à la réplication dans l'hôte.



**Figure 14.** Résumé des procédures utilisés lors d'un clonage moléculaire

Un gène d'intérêt est modifié par PCR afin d'y ajouter des éléments régulateurs et fonctionnels. Le vecteur d'expression est digéré et le produit de PCR se lie au vecteur d'expression au niveau des sites de clonage. Puis, le vecteur est transformé dans des cellules bactériennes afin d'y être répliqué. L'ADN plasmidique est extrait des cellules et caractérisé par séquençage pour confirmer la présence des éléments ajoutés par PCR et sa séquence nucléotidique.

Les extrémités des ADN doivent être modifiées afin de les rendre compatibles. Le clonage traditionnel permet l'utilisation d'endonucléases de restriction pour générer des fragments d'ADN avec des séquences complémentaires qui peuvent être joints par l'ADN ligase (79). En utilisant deux enzymes de restriction uniques pour l'insert et le vecteur, deux extrémités non compatibles sont générées, permettant un clonage directionnel.

La réaction de polymérisation en chaîne (*polymerase chain reaction*, PCR) est une technique permettant l'amplification d'un fragment spécifique d'ADN. Elle permet aussi la modification de l'ADN grâce à deux amorces oligonucléotidiques reconnaissant les séquences flanquant l'ADN à amplifier. Les amorces servent de substrat à l'ADN polymérase pour synthétiser de nouveaux brins complémentaires, en plus d'incorporer les sites de reconnaissance des enzymes de restriction et une étiquette d'affinité.

Le produit de PCR et le vecteur sont digérés par les deux enzymes de restriction pour créer des extrémités cohésives ou franches. Puis, l'insert et le vecteur linéarisé s'associent et

sont liés par la liaison phosphodiester entre les groupements 5'-phosphate et 3'-OH des deux brins par l'ADN ligase, créant ainsi une molécule d'ADN circulaire. Le vecteur recombinant est généralement transformé dans des cellules compétentes d'*E. coli* où il peut se répliquer de façon autonome seulement si les cellules ont acquis le gène de résistance à un antibiotique donné par le vecteur (79, 80).

### **1.7.3 Production et purification de la protéine recombinante**

Une protéine recombinante est synthétisée à partir de l'expression d'un gène recombinant dans un système d'expression. La production de protéines recombinantes a une implication majeure dans le développement de nouveaux médicaments et dans la détermination de nouvelles cibles thérapeutiques (81, 82). Environ 212 nouveaux médicaments approuvés aux États-Unis et en Europe sont des protéines et des peptides (82, 83). Ces médicaments biologiques sont des protéines recombinantes thérapeutiques comprenant des anticorps monoclonaux, des hormones, les facteurs de coagulation, des interférons et interleukines qui sont indiqués pour le cancer, l'hémophilie, le diabète et les vaccins (83).

Dans le but de produire et d'isoler une protéine recombinante fonctionnelle, il est nécessaire d'optimiser les conditions de culture des cellules. La température, le pH, l'oxygénation et le temps de culture et d'induction peuvent influencer les niveaux d'expression et la stabilité de la protéine (81, 84). Suite à la production, la protéine doit être extraite des cellules. Les conditions optimales maximisent la lyse cellulaire et la fraction de la protéine recombinante (84). L'oxydation de la protéine, la protéolyse et la contamination de l'échantillon avec l'ADN génomique doivent être minimisés (84). D'une part, le culot cellulaire doit être récupéré par centrifugation. Puis, les cellules sont lysées pour être en mesure d'extraire la protéine d'intérêt. Les techniques les plus communes pour y arriver sont l'homogénéisation à haute pression (French press), le broyage à billes (*bead mill*), l'ultrasonication, le choc osmotique, la lyse enzymatique et la lyse chimique (85). Dans le cas où la protéine d'intérêt est une protéine transmembranaire, l'échantillon doit être solubilisé dans un milieu qui satisfait leur nature hydrophobe (37). Ainsi, la stratégie consiste à utiliser un détergent pour créer des complexes

protéine-détergent-lipide pour stabiliser et conserver la structure tridimensionnelle de la protéine.

La purification de la protéine est généralement réalisée par chromatographie en phase liquide (86). Les techniques de chromatographie permettent d'isoler la protéine d'intérêt des autres protéines et contaminants. Cette étape peut être réalisée avec une ou plusieurs techniques dans le but d'obtenir la pureté désirée. Les méthodes les plus utilisées comprennent la chromatographie par échange d'ions, la chromatographie par filtration sur gel, la chromatographie d'adsorption et la chromatographie d'affinité.

Dans la chromatographie d'échange d'ions, des ions sont liés électrostatiquement à un support insoluble et chimiquement inerte (87). Les ions sont remplacés de façon réversible par les ions en solution ce qui permet l'élution des protéines. La chromatographie par filtration sur gel, ou la chromatographie d'exclusion, est basée sur la séparation des molécules selon leur taille et leur forme (87). Quant à la chromatographie d'adsorption, elle implique la séparation de substances non polaires (87). La chromatographie d'affinité utilise les propriétés des protéines de se lier à des molécules de façon non covalente (87). Dans cette technique, un ligand est fixé par covalence sur une résine poreuse et inerte et la protéine d'intérêt se lie au ligand immobilisé alors que les autres molécules sortent de la colonne en même temps que le tampon de lavage (87). Cette dernière méthode a l'avantage d'exploiter les propriétés biochimiques de la protéine d'intérêt plutôt que de se baser sur les différences physico-chimiques entre les protéines comme pour les autres techniques chromatographiques (87).

## 1.8 Hypothèse

Les tests pour évaluer la perméabilité d'un médicament ne permettent pas l'analyse d'un transporteur membranaire spécifique de façon isolée.

Nous proposons que l'incorporation de transporteurs membranaires dans des liposomes, c'est-à-dire la synthèse de protéoliposomes, facilitera l'élucidation et la distinction de leur activité et des mécanismes de transport de leurs substrats.

L'utilisation des protéoliposomes comme nouveau modèle de la perméabilité aux mêmes termes que pour les modèles Caco-2 et PAMPA serait prometteuse pour l'industrie pharmaceutique. En fait, les protéoliposomes auraient le potentiel de faciliter les analyses structurales et fonctionnelles de transporteurs recombinants spécifiques dans un milieu sans interférences moléculaires.

## 1.9 Objectifs

L'objectif général de ce projet de recherche consistait à développer un nouveau modèle de perméabilité *in vitro* par la reconstitution de transporteurs membranaires recombinants dans des liposomes. À long terme, la création d'une librairie de transporteurs recombinants incorporés dans des liposomes permettrait d'étudier les mécanismes de la perméabilité membranaire et du transport des médicaments. Plus précisément, ce travail s'inscrivait dans l'objectif général du projet où il était question de mettre au point un système d'expression d'un transporteur connu. Un travail précédent dans le laboratoire consistait à exprimer la P-gp fusionnée à une étiquette décahistidine chez *P. pastoris*. Le protocole d'extraction à l'aide du Freezer/Mill a pu être établi. Par contre, une faible quantité de la protéine fut purifiée sur une résine Ni<sup>2+</sup>-NTA. Dû à l'instabilité de la P-gp lors des processus de purification, un transporteur ABC de plus petite masse moléculaire a été choisi.

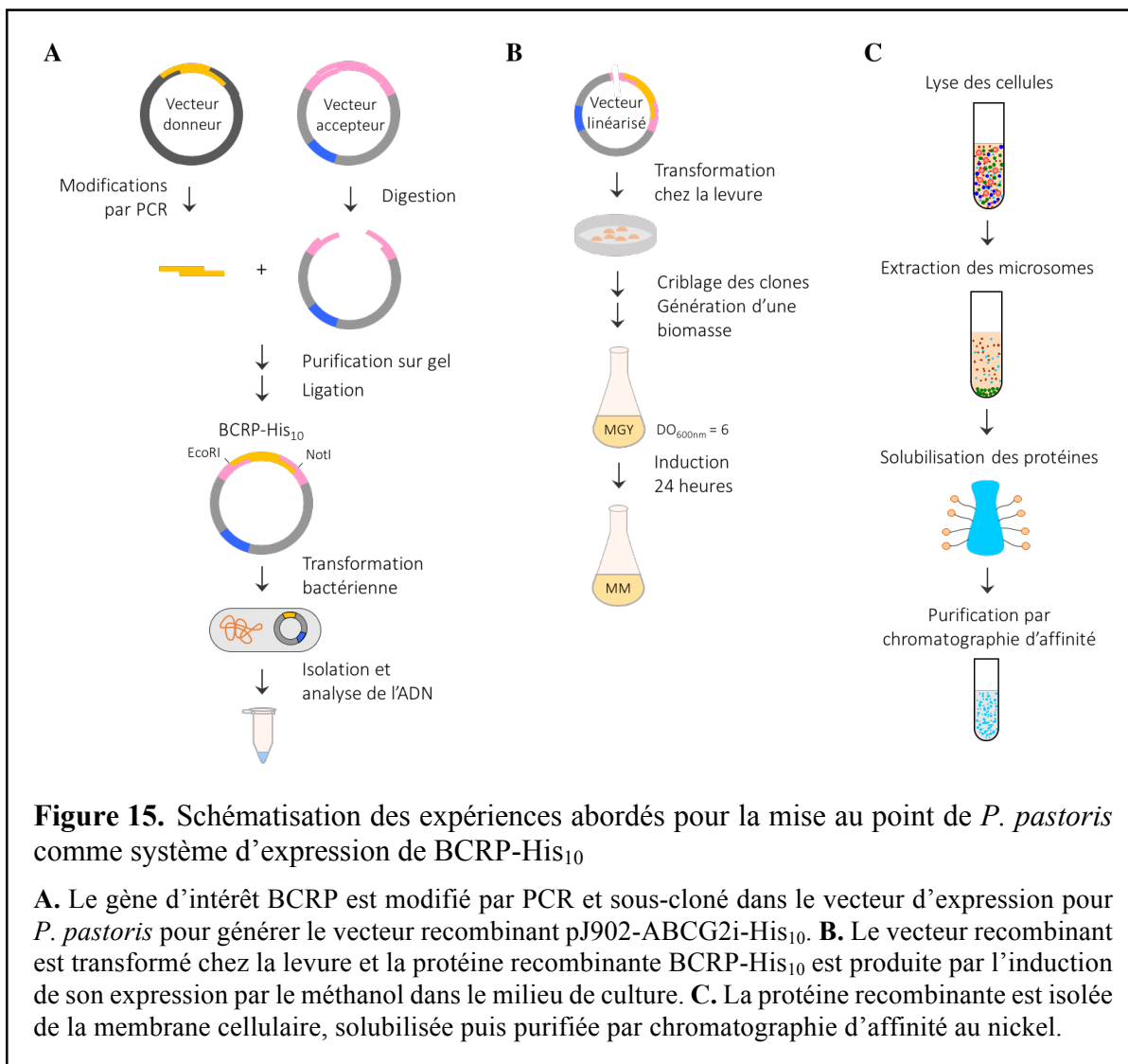
Dans ce mémoire, la protéine BCRP a été utilisée comme modèle et a été exprimée dans la levure *Pichia pastoris*. Éventuellement, BCRP sera utilisée pour préparer des protéoliposomes. Les sujets suivants seront abordés :

1. Clonage du gène d'ABCG2/BCRP;
2. Expression de BCRP chez *Pichia pastoris*;
3. Extraction de BCRP;
4. Purification de BCRP par chromatographie d'affinité au nickel.



## Chapitre 2 – Matériel et méthodes

Pour cette étude, il s'agissait de mettre au point la levure *Pichia pastoris* comme système d'expression pour BCRP. Les méthodes de culture et de purification sont basées sur l'article de Rosenberg *et al.* (61). L'isoforme 1 d'ABCG2/BCRP humaine est obtenue par génie génétique et exprimée dans la levure *Pichia pastoris* (figure 15). La protéine recombinante possèdera une étiquette décahistidine qui servira à l'étape de purification subséquente.



## 2.1 Clonage de BCRP

Le gène de BCRP est modifié et amplifié à l'aide l'appareil de PCR TProfessional Basic 96 gradient (070-601, Biometra) et l'ADN est visualisé sur gel avec le ChemiDoc XRS+ System with Image Lab Software (1708265, Bio-Rad).

Le clonage de BCRP a été réalisé en utilisant les produits suivants : plasmide donneur pCMV-XL5 (SC117127, OriGene), plasmide receveur pJ902-15 (ATUM), Platinum Pfx DNA polymerase (11708-013, Invitrogen), EcoRI-HF (R3101T, NEB), NotI-HF (R3189S, NEB), Anza T4 DNA Ligase Master Mix 4× (IVGN2102, Invitrogen), agarose (800-015-CG, Wisent), RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (21141, Intron Biotechnology), 1Kb DNA ladder RTU (DM010-R500, GeneDirex), QIAquick Gel Extraction Kit (28706, Qiagen), tryptone (BP1421-100, Fisher), chlorure de sodium (793566, Sigma), extrait de levures (212750, Becton Dickinson), agar (214530, Becton Dickinson), zéocine (R250-01, Invitrogen), NEB-5 $\alpha$  competent *E. coli* (C2987H, NEB), EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit (BS614, BioBasic Canada Inc), GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep kit (NA0410, Sigma) et le rotor Sorvall SLA-1500 Super-Lite (Thermo Fisher Scientific).

L'ADN est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose dans le tampon TAE 1× (40 mM Tris pH 7,6, 20 mM acide acétique, 1 mM EDTA). Les cellules d'*E. coli* transformées sont mis en culture dans le milieu liquide low salt LB (1% tryptone, 0,5% NaCl, 0,5% extrait de levures, pH 7,5) et dans le milieu solide sélectif low salt LB-agar (1% tryptone, 0,5% NaCl, 0,5% extrait de levures, pH 7,5, 15 g/L agar, 25  $\mu$ g/mL zéocine).

Le gène de l'isoforme 1 d'ABCG2/BCRP humain (séquence de référence NCBI : NM\_004827.2) est modifié par PCR avec le plasmide pCMV6-XL5 comme matrice. Les séquences des amorces sont décrites au tableau 2. À l'extrémité 5' du gène, le site de restriction EcoRI et une séquence Kozak pour *P. pastoris* sont ajoutés. À l'extrémité 3', le codon stop est déplacé et une étiquette de 10 histidines et le site de restriction NotI en 3' sont ajoutés. La réaction de PCR est effectuée avec 0.3 mM de chaque désoxyribonucléotides (dNTP), 1.5 mM de sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>), 0.3  $\mu$ M de chaque amorce, 200 ng du plasmide pCMV6-XL5 et 2.5 U de l'ADN polymérase *Platinum Pfx*. Les conditions de la PCR sont présentées au tableau 3.

**Tableau II.** Séquences des amorces utilisées lors de la réaction de PCR

<b>sens</b>	EcoRI/séquence régulatrice/séquence Kozak/début d'ABCG2
	AGGCGCGAATTCAAAACTCTGGAAAAAATGTCTTCCAGTAATGTCTGAAG
<b>anti-sens</b>	NotI/séquence régulatrice/stop/His <sub>n</sub> /fin d'ABCG2
	TGCAGAA GCGGCCGCCCTGAGACCACTAGT TTAGTGATGGTGTGGTGTGG TGATGGTGTGAGAATATTTTTTAAGAAATAACAATTCAGG

**Tableau III.** Conditions de la réaction de PCR pour l'amplification du gène recombinant

ÉTAPES	CONDITIONS	
Dénaturation initiale	94°C	3 minutes
Dénaturation	94°C	15 secondes
Hybridation	55°C	30 secondes
Élongation	68°C	2 minutes
Élongation finale	68°C	10 minutes

Le vecteur d'expression pJ902-15 et le produit de PCR sont digérés par les enzymes de restriction de haute fidélité (HF) EcoRI-HF et NotI-HF. La digestion est effectuée avec 1 µg du vecteur pJ902-15 et 2 µg du produit de PCR. 10 U de chaque enzyme sont utilisées avec une incubation à 37°C pendant 15 minutes. Les produits de digestion sont mélangés au bleu de bromophénol 1× et l'ADN est séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% contenant l'agent intercalant RedSafe 1× à 150V pendant 1 heure. L'ADN est révélé aux UV. Les fragments d'intérêt sont purifiés à l'aide du QIAquick Gel Extraction Kit selon le protocole de la compagnie. Puis, des réactions de ligation sont effectuées entre différentes quantités d'insert et 50 ng du vecteur linéarisé, où les ratios molaires insert-vecteur de 1:1, 3:1 et 5:1 sont testés. La quantité d'insert est trouvée à partir de l'équation 1.

$$\text{quantité d'insert (ng)} = \text{ratio molaire désiré} \times \text{quantité de vecteur (ng)} \times \frac{\text{longueur de l'insert (kb)}}{\text{longueur du vecteur (kb)}}$$

**Équation I.** Quantité d'insert requise pour une réaction de ligation.

La solution 1× d'ADN ligase T4 est incubée avec les ADN pendant 15 minutes à la température de la pièce. 5 µL de produit de ligation est transformé dans 50 µL d'*E. coli* électrocompétentes par choc thermique à 42°C pendant 30 secondes. Les cellules sont laissées sur glace pendant 5 minutes et 1 mL de low salt LB est ajouté suivi d'une incubation pendant 1 heure à 37°C avec une agitation de 250 rpm. Les cellules sont centrifugées à 10 000 rpm pendant 2 minutes à 4°C, puis 100 µL du culot resuspendu est étalé sur le milieu low salt LB-agar et les cellules sont incubées 16 heures à 37°C. La sélection des clones chez *E. coli* se fait par la présence de 25 µg/mL de zéocine dans le milieu de culture low salt LB-agar. L'ADN est extrait des cellules à l'aide du EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit pour une culture bactérienne de 5 mL et du GenElute HP Endotoxin-Free Plasmid Maxiprep Kit pour une culture bactérienne de 250 mL selon le protocole des compagnies. La séquence du gène recombinant a été confirmée par séquençage. Le vecteur résultant pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub> contient la région codante pour BCRP-His<sub>10</sub> sous le contrôle du promoteur alcool oxydase 1 (AOX1).

## 2.2 Transformation de *P. pastoris*

La levure *P. pastoris* a été transformée à l'aide de l'appareil d'électroporation Gene Pulser II (165-2108, Bio-Rad).

Les produits suivants ont été utilisés : souche de *P. pastoris* PPS-9010 wild-type (ATUM), bicine-NaOH (BP2646-100, Fisher), éthylène glycol (E-4652, ACP), diméthylsulfoxyde (D128, Fisher), dithiothréitol (43816, Sigma), D-sorbitol (S1876, Sigma), SacI-HF (R3156S, NEB), acétate de sodium (52889, Sigma), éthanol (P016-EAAN, Comalc), extrait de levures (212750, Becton Dickinson), D-glucose (G8270, Sigma), peptone (211677,

Becton Dickinson), agar (214530, Becton Dickinson), zéocine (R250-01, Invitrogen), Gene Pulser Cuvette (165-2086, Bio-Rad).

Les cellules de *P. pastoris* sont traitées dans la solution BEDS (10 mM bicine pH 8,3, 3% éthylène glycol, 5% (v/v) DMSO, 1 M sorbitol) pour les rendre électrocompétentes. Les cellules sont mises en culture dans le milieu liquide YPD (1% extrait de levures, 2% peptone, 2% glucose) et sur le milieu solide YPD-agar (1% extrait de levures, 2% peptone, 2% agar, 2% glucose). Les cellules transformées sont sélectionnées sur le milieu solide YPDS-agar (1% extrait de levures, 2% peptone, 1 M sorbitol, 2% agar, 2% glucose, 500 µg/mL zéocine).

Les cellules électrocompétentes de *P. pastoris* sont préparées selon le protocole de la compagnie (ATUM). Pour chaque 50 mL de culture, environ 1 mL de cellules compétentes peut être produit. À l'aide d'une anse, la suspension de cellules de type sauvage (*wild type*) est prélevée et striée sur le milieu solide YPD-agar puis incubée pendant 2 jours à 30°C. Une colonie est piquée et mise en culture dans 10 mL de milieu liquide YPD pendant 16 heures à 30°C avec agitation à 250 rpm. La culture est diluée à une densité optique (DO) à 600 nm de 0,15-0,2 dans le milieu liquide YPD et incubée à 30°C avec agitation à 250 rpm. Les cellules sont incubées jusqu'à l'obtention d'une DO à 600 nm entre 0,8 et 1,0. Le culot est récupéré par une centrifugation à 1 500 g pendant 5 minutes à 4°C et resuspendu dans 9 mL de la solution BEDS et 1 mL de 1 M DTT. La suspension est incubée pendant 5 minutes à 30°C avec agitation à 100 rpm. Le culot est récupéré par une centrifugation à 1 500 g pendant 5 minutes à 4°C et resuspendu dans 1 mL de la solution BEDS sans DTT. Les cellules sont entreposées en aliquotes et gardées jusqu'à six mois à -80°C.

Vingt-six réactions de digestion ont été réalisées à l'aide de 1 µg de vecteur recombinant et 10 U de l'enzyme de restriction SacI-HF avec une incubation à 37°C pendant 15 minutes. Le produit de digestion est purifié (QIAquick PCR Purification) et concentré. L'échantillon purifié d'ADN est précipité par l'ajout de 1/10<sup>e</sup> du volume d'acétate de sodium (NaOAc) à 3 M et 2,5 fois le volume d'éthanol 100%. Le mélange est centrifugé à 15 000 g pendant 20 minutes à 4°C et 1 mL d'éthanol 70% est ajouté au culot. Une autre centrifugation est faite à 15 000 g pendant 10 minutes à 4°C et le culot est resuspendu dans 20 µL d'eau milliQ. La transformation chez *P. pastoris* est effectuée par électroporation (1,5 kV, 25 µF, 200 Ω) avec 5 µg du vecteur linéarisé (dans maximum 10 µL d'eau) et 50 µL de cellules électrocompétentes. Les cellules sont

inoculées sur un pétri YPDS-agar supplémenté de 500 µg/mL de zéocine et incubées pendant 3 jours à 30°C.

## 2.3 Expression de BCRP chez *P. pastoris*

L'expression protéique chez *P. pastoris* est effectuée avec les produits suivants : YNB sans acides aminés (233520, Becton Dickinson), glycérol (G5516, Sigma), biotine (B4501, Sigma), méthanol (A452, Fisher), phosphate de sodium monobasique (S0751, Sigma), acide éthylène-diamine tétraacétique (BP120-1, Fisher), compresses de gaze (82412, Dumex), Nalgene Polycarbonate Baffled Culture Flasks (4110-2000PK, Thermo Fisher Scientific), Glass-beads; acid washed, 425-600 nm (G8772, Sigma), sucrose (57-50-1, Galenova), Tris (252859, Sigma), EGTA (E8145, Sigma), dithiothréitol (43816, Sigma), acide 6-aminohexanoïque (07260, Sigma), JS-5.3 Swinging-Bucket Rotor (368690, Beckman Coulter). Les inhibiteurs de protéases utilisés sont : pefabloc SC (76307, Sigma), leupeptine (L9783, Sigma), pepstatine A (P5318, Sigma), chymostatine (C7268, Sigma), aprotinine (10236624001, Roche).

Les solutions utilisées pour la culture de *P. pastoris* sont les milieux MGY (1,34% YNB, 1% glycérol,  $4 \times 10^{-5}$ % biotine) et MM (1,34% YNB, 0,5% méthanol,  $4 \times 10^{-5}$  % biotine), le tampon BB (50 mM sodium phosphate pH 7,4, 1 mM EDTA, 5% glycérol) et le tampon d'homogénéisation (0,33 M sucrose, 300 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 10 mM acide 6-aminohexanoïque + 1 mM pefabloc, 10 µg/mL pepstatine A, 10 µg/mL leupeptine, 2 µg/mL aprotinine).

Après l'obtention de colonies sur le milieu sélectif YPDS-agar, un criblage des clones est fait afin de trouver le clone possédant le plus haut niveau d'expression de la protéine recombinante. Pour cela, dix colonies sont inoculées dans 10 mL de milieu répressif contenant 1% de glycérol (MGY) et incubées pendant 24 heures à 30°C avec agitation à 250 rpm. Les cellules sont centrifugées à 3 500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé avec 5 mL de milieu d'induction contenant 0,5% de méthanol (MM) et recentrifugé à 3 500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans 10 mL de milieu inducteur MM et les cellules sont

incubées pendant 24 heures à 30°C avec agitation à 250 rpm. Pour l'analyse de l'expression de BCRP, le culot des aliquotes de 1 mL de cellules dans le milieu MGY et MM est resuspendu dans 100 µL de tampon BB avec 1 mM de pefabloc et un volume équivalent de billes est ajouté. Les échantillons sont vortexés pendant 30 secondes et laissés sur glace pendant 30 secondes pour un total de 8 cycles. Puis, ils sont centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est récupéré. La concentration protéique dans le lysat cellulaire est déterminée par la méthode de l'acide bicinchonique (BCA) et les protéines sont séparées par SDS-PAGE suivie par la détection de BCRP par immunobuvardage (Western blot) (méthode décrite au chapitre 2.6). Le meilleur clone est celui qui possède le plus haut niveau d'expression de BCRP, qui est jugé par immunobuvardage. Le clone est conservé à -80°C dans un stock de glycérol dans le milieu MGY.

Suite à la détermination du meilleur clone, l'isoforme 1 de BCRP a été produite à plus grande échelle. La culture est réalisée avec une incubation à 30°C une agitation de 250 rpm. Les cellules sont inoculées dans 50 mL de milieu YPD dans une flasque de 250 mL et incubées pendant 24 heures. 10 mL de la culture sont transférés dans 1 L de milieu MGY dans une flasque de 2 L et incubés jusqu'à ce que la culture atteigne une densité optique (DO) à 600 nm de 6. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation à 1 500 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans 1 L de milieu MM dans une flasque avec baffles de 2 L couverte de 2 couches de gaze pour maximiser le transfert d'oxygène dans le milieu de culture. Les cellules sont induites pendant 24 heures. Le culot cellulaire est récupéré par centrifugation à 3 500 g pendant 15 minutes à 4°C et lavé trois fois avec le tampon d'homogénéisation à une concentration de 0,5 g de culot cellulaire/mL. Le culot est conservé à -80°C.

## **2.4 Extraction des vésicules membranaires**

Les cellules sont lysées par rupture mécanique à l'aide du Freezer/Mill 6850 (SPEX) avec les produits suivants : Tris (252859, Sigma), glycérol (G5516, Sigma), imidazole (792527, Sigma), 2-mercaptoéthanol (M3148, Sigma), SW 41 Ti Rotor, Swinging Bucket, Titanium (331362, Beckman Coulter).

Le tampon de resuspension est constitué de 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 20% glycérol, 10 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoéthanol + 1 mM pefabloc, 10 µg/mL pepstatine A, 10 µg/mL leupeptine, 2 µg/mL aprotinine.

Le culot cellulaire est dilué dans 50% (v/v) de tampon d'homogénéisation. Des billes de cellules sont formées dans l'azote liquide et lysées par pulvérisation magnétique dans des conditions cryogéniques dans le Freezer/Mill. Le broyage se fait par 4 cycles : 2 minutes de refroidissement et 2 minutes de pulvérisation à une fréquence de 14 cycles/seconde (28 impacts/seconde). Le protocole est répété trois fois. La poudre résultante est récupérée dans un contenant en polypropylène et conservée à -80°C.

L'homogénat est décongelé et lavé trois fois avec le tampon de resuspension par trois centrifugations à 3 500 g pendant 15 minutes à 4°C en récupérant le surnageant à chaque fois. Les trois surnageants sont mélangés et centrifugés à 100 000 g pendant 60 minutes à 4°C. Le culot est homogénéisé dans un homogénéisateur rotatif en téflon et centrifugé à 100 000 g pendant 60 minutes à 4°C. Le culot est rehomogénéisé et recentrifugé à 100 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le culot résultant contient la fraction microsomale dans le tampon de resuspension et est conservé à -80°C.

## 2.5 Solubilisation et purification de BCRP

Les protéines sont purifiées à l'aide du système ÄKTA-FPLC (GE Healthcare) et du logiciel UNICORN 4.10 selon le protocole de Rosenberg *et al.* (61).

Les produits suivants sont utilisés : Tris (252859, Sigma), chlorure de sodium (793566, Sigma), glycérol (BP229, Fisher), imidazole (792527, Sigma), 2-mercaptoéthanol (M3148, Sigma), n-dodécyl-β-D-maltoside (16494, Cayman Chemical, DDM), HisTrap HP 5 mL (17-5248-02, GE Healthcare), Sorvall TX-400 Swinging Bucket Rotor (75003181, Thermo Fisher Scientific).

Les protéines sont solubilisées dans le tampon A (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 30% glycérol, 20 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoéthanol, 10% (w/v) DDM + 2 µg/mL leupeptine, aprotinine et pepstatin A, 1 µg/mL chymostatine, 1 mM pefabloc). La résine de



sépharose haute performance de la colonne HisTrap HP est déjà préchargée avec les ions de nickel. La colonne a été traitée avec le tampon de lavage (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 30% glycérol, 20 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoéthanol, 0,1% (w/v) DDM) et le tampon d'élution (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM NaCl, 30% glycérol, 500 mM imidazole, 1 mM 2-mercaptoéthanol, 0,1% (w/v) DDM) contenant les inhibiteurs de protéases (2 µg/mL leupeptine, aprotinine et pepstatine A, 1 µg/mL chymostatine, 1 mM pefabloc). BCRP purifié est dialysé contre le tampon d'entreposage (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10% glycérol, 1 mM 2-mercaptoéthanol, 0,187 mg/mL DDM).

Les microsomes sont décongelés et centrifugés à 100 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans le tampon A où les protéines sont solubilisées pendant 30 minutes à 4°C avec une légère agitation. Le mélange est centrifugé à 100 000 g pendant 30 minutes afin d'éliminer les protéines insolubles et le surnageant est collecté. Les protéines solubilisées sont purifiées par chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne HisTrap HP de 5 mL et du système ÄKTA-FPLC à 4°C. Les protéines sont appliquées à la colonne à l'aide d'une superloop de 50 mL à une vitesse de 0,25 mL/min. Puis, la colonne est lavée avec le tampon de lavage à une vitesse de 1 mL/min. BCRP est élué avec 250 mM d'imidazole à une vitesse de 1 mL/min et des fractions de 1 mL sont récupérées. Après l'élution, la colonne est lavée avec 500 mM d'imidazole afin de détacher les protéines restantes liées à la résine. Les fractions contenant BCRP sont dialysées contre le tampon d'entreposage et l'échantillon de BCRP purifiée est conservé à -80°C.

## **2.6 Analyse des échantillons**

### **2.6.1 Quantification des protéines**

Les protéines sont quantifiées à l'aide du Pierce BCA Protein Assay Kit (23227, Thermo Scientific) et du réactif de Bradford (B6916, Sigma) à l'aide du spectrophotomètre pour microplaque Safire (Tecan) et du logiciel Magellan 7.2.

Le dosage colorimétrique des protéines est basé sur le protocole du fournisseur. La méthode de l'acide bicinchonique (BCA) est réalisée pour les échantillons de la culture

cellulaire sur une plaque de 96 puits avec une lecture à 562 nm. La méthode de Bradford est effectuée pour les échantillons de la purification sur des cuvettes de polystyrène (67.742, Sarstedt) avec une lecture à 595 nm. L'albumine de sérum bovin (BSA) à 2 mg/mL est utilisée comme standard.

## **2.6.2 SDS-PAGE et Western blot**

Les protocoles de préparation des solutions et du montage d'un gel de polyacrylamide pour le SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes) et du transfert des protéines suivent ceux du fournisseur (Bio-Rad). Les protéines sont visualisées sur gel et sur la membrane avec le ChemiDoc XRS+ System with Image Lab Software (1708265, Bio-Rad).

Les échantillons protéiques sont préparés par l'ajout du Laemmli Sample Buffer 4× (161-0747, Bio-Rad) à une concentration finale de 1× et du 2-mercapthoéthanol (M3148, Bio-Rad). Les échantillons sont chauffés à 37°C pendant 30 minutes. Les produits suivants ont été utilisés pour la préparation des gels : TGX Stain-Free FastCast Acrylamide kit 10% (161-0183, Bio-Rad), ammonium persulfate (161-0700, Bio-Rad), tétraméthyléthylènediamine (161-0800, Bio-Rad), Tris (252859, Sigma), SDS (190522, MP Biomedicals), glycine (G8890, Sigma) et le marqueur de poids moléculaire Precision Plus Protein Unstained Protein Standard (161-0363, Bio-Rad). Les protéines séparées sur le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose à l'aide du Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, Nitrocellulose (170-4271, Bio-Rad) et du Trans-Blot Turbo Transfer System (170-4150, Bio-Rad). Pour l'immunobuvardage, les produits suivants sont utilisés : lait écrémé en poudre instantané (Carnation), TBS 10× (T5912, Sigma), Tween-20 (BP337-100, Fisher), mouse anti-ABCG2/CD338 monoclonal antibody BXP-21 (NB100-2177, Novus Biologicals), Goat anti-mouse IgG(H+L) HRP (KP-074-1806, Mandel), Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232, GE Healthcare). Pour le SDS-PAGE, le tampon de migration 1× est constitué de 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3. Les solutions pour le Western blot sont le TBS-T (TBS 1×, 0,1% Tween-20) et le blotto (5% lait écrémé en poudre dans du TBS-T).

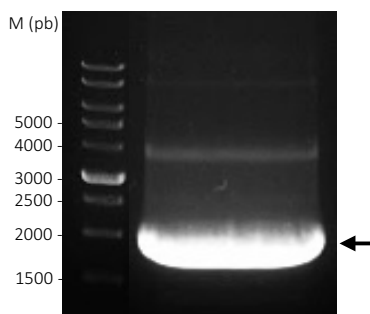
Les protéines sont séparées par SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide de 10% et sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Les sites de liaison sur la membrane sont bloqués avec la solution de blotto pendant 1 heure à la température de la pièce avec agitation. BCRP est détecté par l'anticorps monoclonal de souris anti-BCRP humaine (BXP-21) à 0,25 µg/mL (1:1000) où la membrane est incubée pendant 16 heures à 4°C avec agitation. La membrane est lavée 5 fois pendant 5 minutes avec la solution de TBS-T. L'anticorps primaire est détecté par l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase du raifort (*horseradish peroxidase*, HRP) (à 1:10 000) où la membrane est incubée pendant 1 heure à la température de la pièce avec agitation. Puis, la membrane est lavée 5 fois pendant 5 minutes avec la solution de TBS-T. Le signal pour BCRP est révélé par chimiluminescence selon les instructions du fournisseur.

## Chapitre 3 – Résultats

### 3.1 Clonage de BCRP

Pour permettre l'expression d'ABCG2/BCRP dans la levure *Pichia pastoris*, le gène recombinant doit être cloné dans le vecteur pJ902-15. La stratégie de clonage consiste à utiliser les sites EcoRI et NotI afin de réaliser un clonage directionnel, de placer le gène après le promoteur AOX1 et d'intégrer une étiquette de 10 histidines à l'extrémité C-terminale de la protéine. La fusion du gène avec l'étiquette histidine permettra de purifier la protéine par chromatographie d'affinité. Par ailleurs, la présence de l'étiquette n'interfère pas avec l'activité de la protéine (52, 61, 88). Des éléments régulateurs et fonctionnels doivent être intégrés en amont et en aval du gène de l'isoforme 1 de BCRP humaine (tableau 2). Pour faciliter l'initiation de la traduction, une séquence Kozak pour *P. pastoris* est ajoutée juste avant le codon d'initiation (75, 77). De plus, des nucléotides supplémentaires sont intégrés après les sites de restriction aux extrémités 5' et 3' afin d'augmenter l'efficacité de la traduction (77, 89).

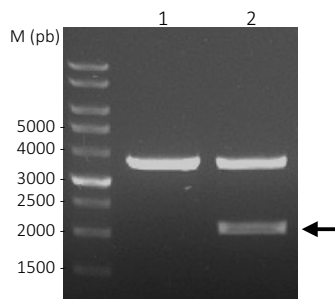
Le plasmide pCMV6-XL5 a servi de matrice pour modifier le gène de l'isoforme 1 d'ABCG2. Celui-ci a été modifié par PCR où les sites de clonage EcoRI (extrémité 5') et NotI (extrémité 3'), la séquence Kozak pour *P. pastoris* (extrémité 5'), des nucléotides supplémentaires après les sites de restriction (extrémités 5' et 3') et l'étiquette décahistidine (extrémité 3') ont été ajoutés. L'insert résultant est de 2046 pb et a été migré et purifié sur gel (figure 16).



**Figure 16.** Amplification et modification du gène de l'isoforme 1 de BCRP par PCR

La PCR est réalisée à l'aide des amorces du tableau 2. L'ADN a été migré sur un gel d'agarose 1% et visualisé aux UV. La position de l'insert est indiquée par la flèche.

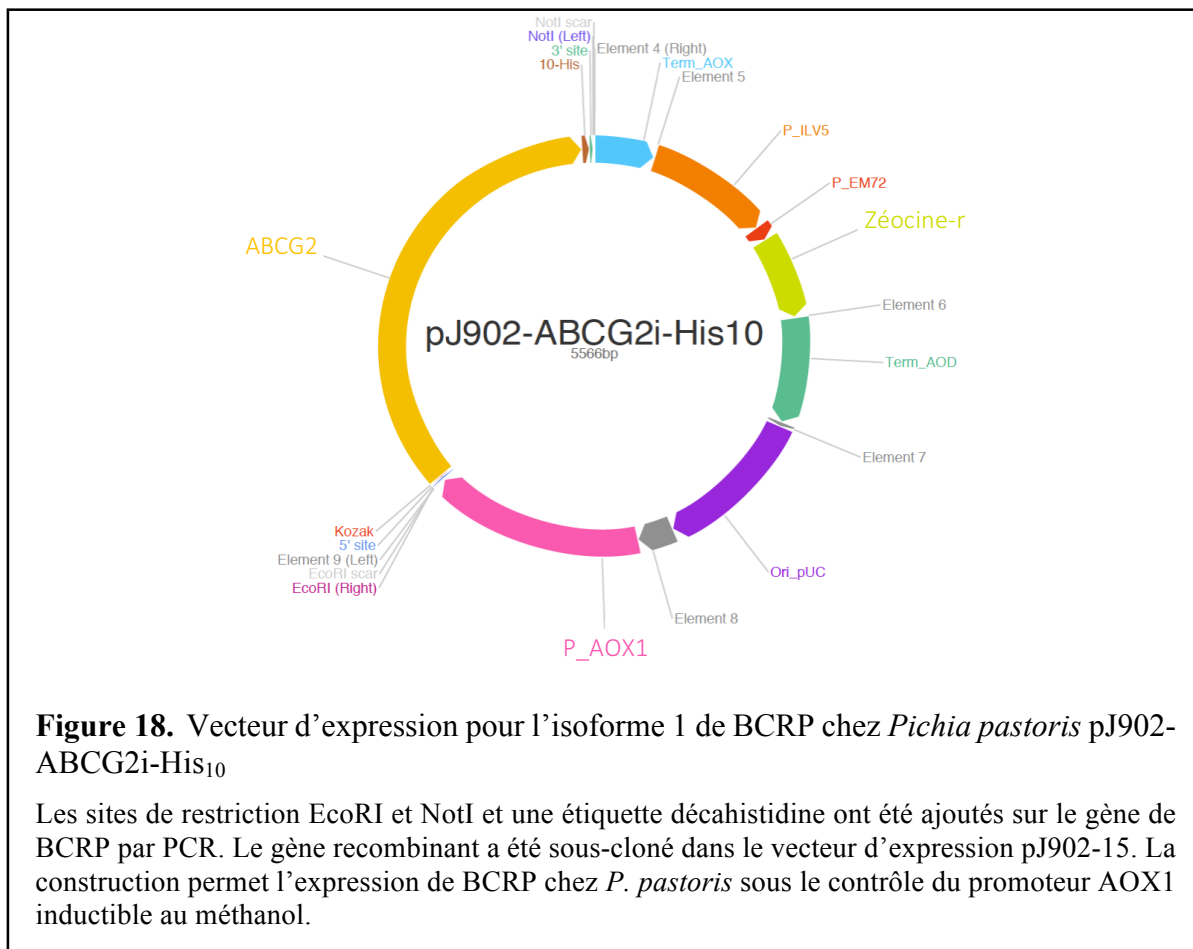
Le vecteur pJ902-15 est linéarisé par les enzymes de restriction EcoRI et NotI pour libérer les sites de clonage. Le produit de digestion est migré et purifié sur gel. Les fragments de l'insert et le vecteur sont reliés par l'ADN ligase pour obtenir le vecteur recombinant circularisé pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub>. Celui-ci est transformé dans la bactérie hôte *E. coli* et les clones ont été sélectionnés grâce à la zéocine. Cinq colonies sont cultivées, puis l'ADN plasmidique est isolé des cellules. La présence de l'insert est confirmée par la digestion du vecteur par les enzymes de restriction EcoRI et NotI (figure 17). Pour vérifier l'intégrité de l'ADN, le vecteur du clone 2 présenté à la figure 17 a été séquencé.



**Figure 17.** Sélection d'un clone positif pour le vecteur recombinant pJ902-ABCG2-His<sub>10</sub> chez *E. coli*

L'ADN plasmidique est isolé des cellules d'*E. coli* et digéré par les enzymes EcoRI et NotI. L'ADN a été migré sur un gel d'agarose de 1% et visualisé aux UV. 1 : ADN du clone dont le vecteur ne contient pas l'insert. 2 : ADN du clone possédant le vecteur et l'insert. La position de l'insert digéré est indiquée par la flèche.

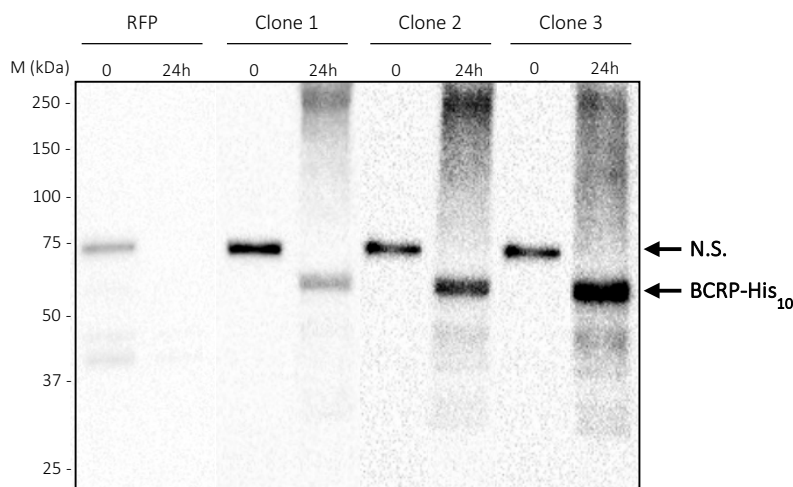
La carte du vecteur recombinant pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub> est montrée à la figure 18. Le gène recombinant BCRP-His<sub>10</sub> contient l'étiquette 10 histidines en C-terminal. BCRP-His<sub>10</sub> se retrouve après le promoteur AOX1 qui contrôlera l'expression de BCRP chez *P. pastoris*. Les cellules *E. coli* et *P. pastoris* sont sélectionnées par l'antibiotique zéocine par le gène de résistance de *Streptoalloteichus hindustanus ble* (*Sh ble*). Le vecteur pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub> est utilisé pour la transformation de *P. pastoris*.



### 3.2 Expression de BCRP chez *P. pastoris*

Le vecteur pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub> a été linéarisé par l'enzyme de restriction SacI. Les cellules électrocompétentes sont transformées par électroporation avec et sans le vecteur. Le gène recombinant est intégré dans le génome de la levure par recombinaison homologue au niveau du locus AOX1. Une sélection est effectuée par la zéocine dans le milieu solide YPDS pour confirmer l'intégration génomique. Pour identifier le clone permettant un haut niveau d'expression de BCRP-His<sub>10</sub>, différents clones sont cultivés et induits dans 10 mL des milieux liquides MGY et MM respectivement. L'expression de BCRP a été analysée par immunobuvardage (figure 19). Le contrôle négatif d'expression représente les cellules transformées avec le vecteur linéarisé pJ902-15 permettant l'expression de RudolphRFP (25 kDa) plutôt que BCRP. L'expression de RudolphRFP dans les cellules fait en sorte que les cellules deviennent rougeâtres. Il a été choisi comme contrôle négatif d'expression plutôt que le vecteur vide, car il a l'avantage de permettre un suivi colorimétrique de la culture de *P. pastoris* autant par fluorescence que par une simple observation à l'œil. Il fût aussi utilisé comme contrôle positif de croissance, ce qui a permis d'optimiser les conditions de culture des cellules pour l'expression de BCRP-His<sub>10</sub>.

Au temps 0, les cellules sont dans le milieu répressif contenant le glycérol (MGY) et les cellules sont induites pendant 24 heures dans le milieu contenant le méthanol (MM). Un signal non spécifique d'environ 75 kDa est détecté au temps 0, autant pour le clone du contrôle négatif que pour les clones de BCRP. Aucun signal pour BCRP n'est détecté pour le contrôle négatif. Par ailleurs, le monomère BCRP-His<sub>10</sub> a un poids apparent de 65 kDa, comparativement à 72 kDa qui est retrouvé dans les cellules mammifères (88). Le clone 3 est celui qui possède le plus haut niveau d'expression de BCRP-His<sub>10</sub> et a été utilisé pour la suite des expériences.

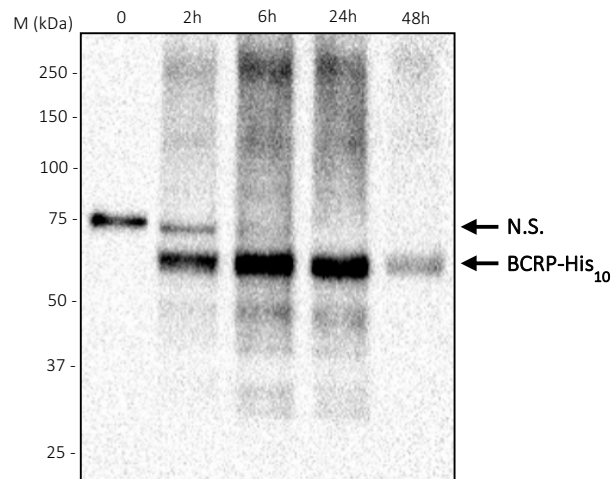


**Figure 19.** Variation de l'expression de BCRP chez *Pichia pastoris*

Les protéines (20 µg) sont migrées par SDS-PAGE 10% et BCRP est détecté par Western blot à l'aide de l'anticorps monoclonal BXP-21. Les cellules sont cultivées dans 10 mL de milieu. Au temps 0, les cellules sont dans le milieu répressif MGY. Les cellules sont induites au méthanol pendant 24 heures. Le contrôle négatif (RFP) représente les cellules qui n'expriment pas BCRP. La protéine recombinante BCRP-His<sub>10</sub> apparaît à 65 kDa. Un signal non spécifique (N.S.) est présent à environ 75 kDa.

Le clone 3 présenté à la figure 19 a été utilisé pour évaluer le temps d'induction optimal des cellules pour exprimer BCRP (figure 20). Les cellules ont été cultivées et induites dans 10 mL des milieux liquides MGY et MM. Au temps 0, les cellules sont dans le milieu répressif MGY. Les protéines sont analysées après 2, 6, 24 et 48 heures de culture dans le milieu MM. 0,5% de méthanol a été ajouté après 24 heures d'induction. Un signal non spécifique d'environ 75 kDa est détecté au temps 0. Après 48 heures d'induction, le niveau d'expression de BCRP est plus bas que ce qui est observé après 24 heures. Ainsi, une induction de 24 heures est optimale et c'est ce qui est réalisé dans 1 L de milieu MM pour la production de BCRP-His<sub>10</sub>.



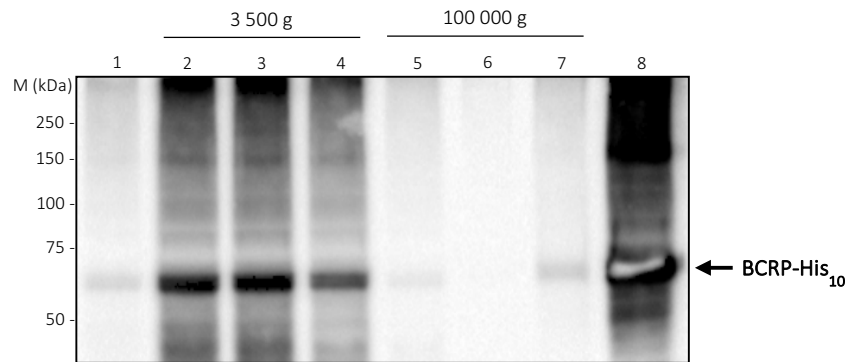


**Figure 20.** Induction de l'expression de BCRP chez *Pichia pastoris*

Les protéines (20  $\mu$ g) sont migrées par SDS-PAGE 10% et BCRP est détecté par Western blot à l'aide de l'anticorps monoclonal BXP-21. Les cellules sont cultivées dans 10 mL de milieu. Au temps 0, les cellules sont dans le milieu répressif MGY. Les cellules sont induites dans le milieu MM avec 0,5% de méthanol pendant 48 heures. La protéine recombinante BCRP-His<sub>10</sub> apparaît à 65 kDa. Un signal non spécifique (N.S.) est présent à environ 75 kDa.

### 3.3 Extraction des vésicules membranaires

Le clone 3 possédant le plus haut niveau d'expression de BCRP a été cultivé dans 1 L des milieux de culture MGY et MM. Un culot cellulaire de 11,6 g a été récupéré après 24 heures d'induction. Les cellules sont lysées par disruption mécanique au Freezer/Mill. BCRP étant une protéine membranaire, c'est la fraction microsomale qui a été récupérée. Les microsomes sont isolés par centrifugation différentielle (figure 21). Suite à la lyse, les cellules sont d'abord centrifugées à 3 500 g à trois reprises pour éliminer les débris cellulaires. Comme observé à la figure 21, les 3 surnageants récupérés contiennent toujours BCRP (puits 2 à 4). Les 3 surnageants ont ensuite été homogénéisés et ultracentrifugés à 100 000 g pendant 60 minutes pour isoler le culot membranaire. Celui-ci a été traité sur un homogénéisateur rotatif et ultracentrifugé pendant 60 minutes deux fois. Puis, la suspension ultracentrifugé pendant 20 minutes pour récupérer les microsomes (puits 8). Le signal pour BCRP au niveau du puit 8 est peu satisfaisant à cause de la haute concentration de la protéine dans les microsomes. Enfin, environ 25 mL de microsomes à une concentration protéique de 6 mg/mL ont été isolées.



**Figure 21.** Extraction des membranes contenant BCRP de *Pichia pastoris*

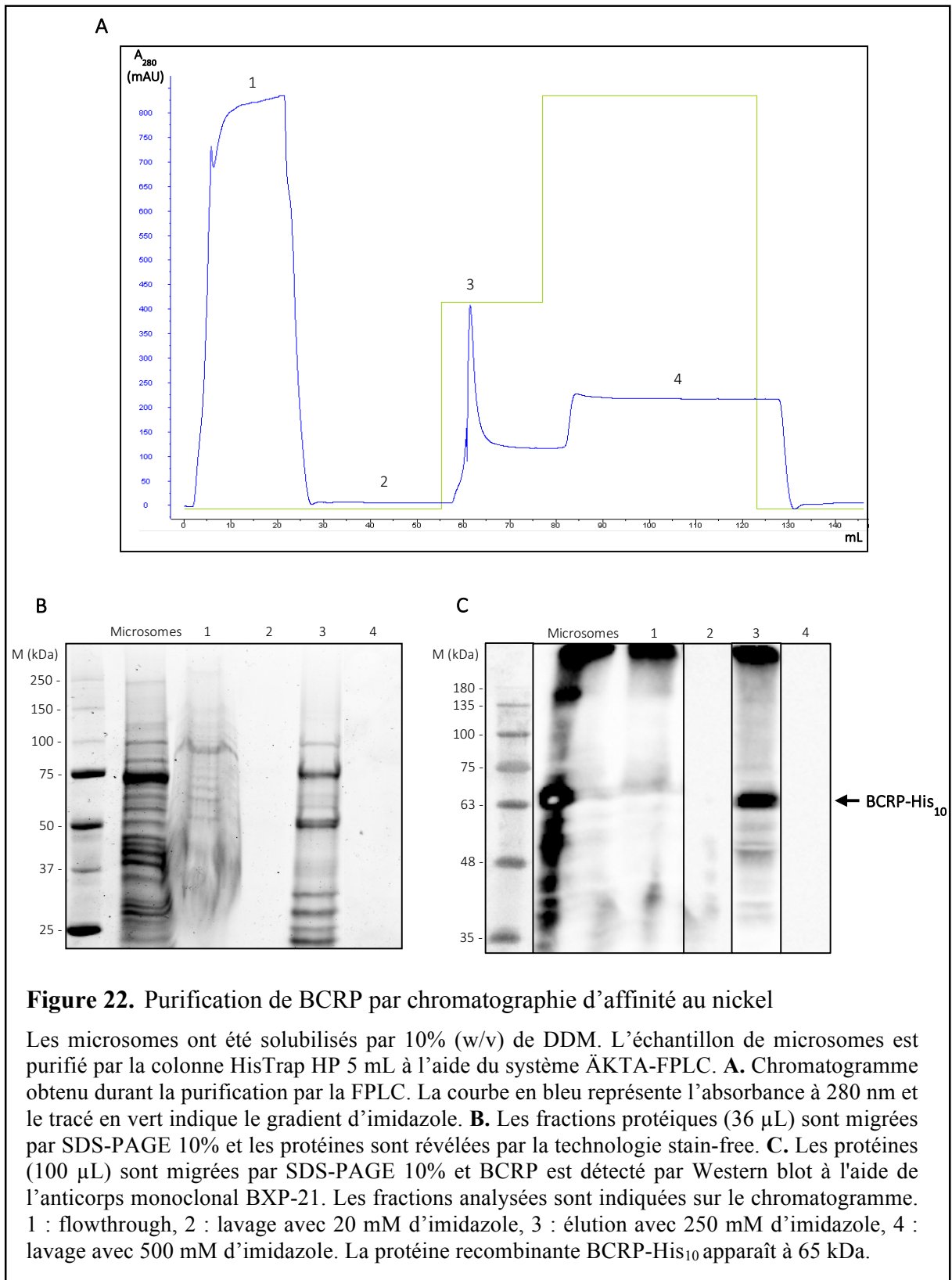
Les protéines (20 µg) sont migrées par SDS-PAGE 10% et BCRP est détecté par Western blot à l'aide de l'anticorps monoclonal BXP-21. Les cellules sont cultivées dans 1 L de milieu. Elles ont été induites pendant 24 heures avec 0,5% de méthanol puis lysées au Freezer/Mill. Les cellules avant la lyse ont été visualisées (puit 1). Les débris cellulaires sont retirés par trois centrifugations à 3 500 g pendant 15 minutes et les surnageants sont récupérés (puits 2-4). Les microsomes sont obtenus par 3 ultracentrifugations à 100 000 g. Les débris se retrouvent dans le surnageant (puits 5-7) et le culot contenant les microsomes (puit 8) est récupéré. La protéine recombinante BCRP-His<sub>10</sub> apparaît à 65 kDa.

### 3.4 Solubilisation et purification de BCRP

Suite à l'isolation des microsomes, 75 mg de protéines sont solubilisés par le détergent non ionique n-dodécyl-β-D-maltoside (DDM). La bicouche lipidique est détruite et les protéines sont libérées sous forme de complexes protéine-détergent-lipide. 10 mL d'échantillon sont purifiés par chromatographie d'affinité au nickel où l'étiquette de 10 histidines en C-terminale de BCRP est exploitée (figure 22).

L'échantillon de protéines solubilisées est appliqué dans la colonne à faible vitesse. Le passage du tampon de lavage permet d'enlever les protéines non liées à la colonne (pic 1). L'élution à 250 mM d'imidazole produit un pic unique sur le chromatogramme (pic 3), mais il ne permet que de purifier partiellement l'échantillon (figure 22a). Comme montré à la figure 22b, le patron de migration des protéines est différent dans le puit des microsomes et le puit 3 de l'élution où moins de protéines sont présentes. BCRP n'est pas visible sur le gel, mais son signal est détecté par Western blot (figure 22c). Durant les lavages (pics 2 et 4), aucune protéine n'a été détectée. D'ailleurs, l'aspect du gel et de la membrane au niveau du puit 1 est peu

satisfaisant contenu de l'énorme quantité de protéines dans l'échantillon du flowthrough. Il semble que les protéines dans le flowthrough se soient dissipées dans le gel de polyacrylamide à cause de la chaleur générée par l'électrophorèse. Ainsi, l'élution à 250 mM d'imidazole de la colonne a permis de libérer BCRP et d'autres protéines ayant la même affinité pour les ions de nickel.



## Chapitre 4 – Discussion

### 4.1 Clonage de BCRP

En premier lieu, les procédures du clonage ont dû être optimisées avant de générer le vecteur pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub>. En effet, un premier vecteur donneur, pSIN4-EF2-ABCG2-IRES-Neo, a été obtenu d'un fournisseur commercial afin d'utiliser le gène de l'isoforme 1 d'ABCG2 comme matrice pour la PCR. Cependant, après plusieurs réactions non concluantes, le gène a été séquencé. Le séquençage a permis de constater que l'ADN reçu n'était pas le bon : l'extrémité 3' ne correspondait pas à celui de l'isoforme 1, mais correspondait plutôt à celui de l'isoforme 2 de la protéine. De plus, deux mutations ont été retrouvées sur le gène, C421A et G1169T. La mutation C421A sur le gène mène à un changement d'acide aminé de la glycine à la lysine (Q141K). Ce SNP est grandement répertorié dans la littérature et est lié à la réduction des niveaux d'ABCG2 *in vitro* et *in vivo*, car la protéine exprimée se retrouve avec un repliement aberrant et est dégradée par le système ERAD (section 1.6.1) (53). Le transport des médicaments et de l'activité ATPase se retrouvent alors réduits (90). Dans le cadre de ce projet, BCRP doit être exprimée en grande quantité et être fonctionnelle. Donc, une mutagenèse dirigée a été réalisée afin de corriger la mutation C421A sur l'isoforme 2 du gène. Toutefois, la mise au point de *P. pastoris* comme système d'expression a été établie pour l'isoforme 1, puisqu'elle est la seule qui est caractérisée dans la littérature.

Le vecteur pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub> a été généré par un clonage moléculaire. Des éléments régulateurs et fonctionnels ont été ajoutés par PCR sur le gène humain de l'isoforme 1 de BCRP (tableau 2). Pour faciliter l'initiation de la traduction, une séquence Kozak pour *P. pastoris* est ajoutée en amont du codon d'initiation (75, 77). Des nucléotides supplémentaires sont aussi intégrés après les sites de restriction afin d'augmenter l'efficacité de la traduction en stabilisant l'ARN messager (ARNm) (77, 89). La fusion du gène avec l'étiquette histidine à l'extrémité C-terminale permet de purifier la protéine par chromatographie d'affinité. Par ailleurs, la présence de l'étiquette n'interfère pas avec l'activité de la protéine (52, 61, 88). La construction présentée à la figure 16 permet l'expression du gène humain de l'isoforme 1 de BCRP fusionné à une

étiquette de 10 histidines chez la levure *Pichia pastoris* sous le contrôle du promoteur AOX1. Cette levure a émergé comme étant un système d'expression de choix pour les protéines membranaires. C'est un microorganisme eucaryote capable d'effectuer les modifications post-traductionnelles incluant l'isomérisation disulfure, la phosphorylation, l'acétylation N-terminale et la glycosylation qui sont souvent essentielles pour l'activité et la stabilité des protéines (76). De plus, *P. pastoris* a l'avantage de croître à de haute densité cellulaire, possède un temps de génération court (2 heures) et nécessite des manipulations simples comme pour les cellules bactériennes (76).

## 4.2 Expression de BCRP chez *P. pastoris*

D'autre part, la séquence du vecteur pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub> a dû être optimisée pour permettre l'expression de BCRP chez *P. pastoris*. En fait, de premiers essais d'expression de BCRP n'ont pas été concluants après des analyses par immunobuvardage. Sachant que la levure est en mesure d'exprimer RudolphRFP après l'induction par le méthanol, l'aspect génétique a été exploré. La séquence des deux amorces d'ABCG2 a ainsi été révisée afin d'intégrer de courtes séquences nucléotidiques qui flanquent le gène. Elles ont été ajoutées après le site de restriction EcoRI en 5', notamment la séquence Kozak pour *P. pastoris*, et avant le site de restriction NotI en 3'. Il semble que ces éléments soient responsables de la stabilisation de l'ARNm, ce qui facilite sa traduction par les ribosomes (77, 89).

Pour le vecteur pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub>, le promoteur AOX1 dirige l'expression hétérologue de BCRP-His<sub>10</sub> chez *P. pastoris*. La cassette d'expression pour BCRP-His<sub>10</sub> est similaire à celle présentée à la figure 13. La levure *P. pastoris* n'est pas un système de surexpression aux mêmes termes qu'*E. coli*, mais plutôt un système de production à haute densité cellulaire (67, 77). Ainsi, une protéine hétérologue exprimée n'est pas nécessairement toujours visible sur un gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie, ou avec la technologie stain-free (67). C'est ce qui est observé pour BCRP-His<sub>10</sub> où seule la détection par immunobuvardage permet de confirmer la présence de BCRP dans les extraits cellulaires, et ce même après sa purification. Par contre, dans la littérature, BCRP est visible sur gel, que ce soit lorsque la protéine est exprimée chez la levure ou dans les cellules Sf9. Il se peut que la

concentration de BCRP-His<sub>10</sub> soit trop élevée et que la protéine soit restée coincée dans les puits. Sinon, une coloration au nitrate d'argent peut être envisagée puisqu'elle est plus sensible que le bleu de Coomassie (91).

Par ailleurs, BCRP-His<sub>10</sub> a un poids apparent de 65 kDa, comparativement à 72 kDa qui est retrouvé dans les cellules mammifères pour un monomère de BCRP (88). Le poids moléculaire de 65 kDa observé pour un monomère de BCRP-His<sub>10</sub> dans les figures 19 à 22 est consistant avec le poids moléculaire retrouvé dans d'autres publications où BCRP a été fusionnée à une étiquette décahistidine et exprimée chez *P. pastoris* (61, 88). Ceci s'explique par la sous-glycosylation de BCRP lorsque exprimée chez *P. pastoris*. Il a été démontré que *P. pastoris* génère des chaînes d'oligosaccharides plus courts et plus authentiques sur les protéines que ce qui est retrouvé chez *Saccharomyces cerevisiae* (76). La protéine demeure toutefois fonctionnelle et suggère que la glycosylation n'est pas essentielle pour l'activité de BCRP (88).

Suite à la transformation, il est nécessaire de cribler l'expression de la protéine dans les clones obtenus (68, 73, 92). En effet, les cellules peuvent avoir des niveaux variables d'expression, comme observé à la figure 19. Durant l'insertion de la cassette d'expression dans le génome, il y a notamment la possibilité d'une insertion multiple qui a 1 à 10% de chance de se dérouler spontanément (67, 68, 75). Plusieurs copies de la cassette d'expression peuvent être intégrées, majoritairement de façon tête-à-queue, ce qui augmente potentiellement le niveau d'expression (67, 77, 92, 93). Un premier criblage sur le milieu sélectif à la zéocine permet de confirmer l'intégration génomique de la cassette d'expression. Puis, un second criblage est effectué pour trouver le clone exprimant le plus haut niveau de la protéine recombinante. Le clone 3 présenté à la figure 19 est le clone possédant le plus haut niveau d'expression de BCRP-His<sub>10</sub> et a donc été utilisé dans les expériences subséquentes.

Le temps d'induction a été évalué pour l'expression de BCRP-His<sub>10</sub>. Cette variable est importante pour l'optimisation de la production des protéines membranaires chez *P. pastoris* (71). Des temps d'induction allant de 18 heures pour le récepteur A2a de l'adénosine à 60 heures pour le récepteur muscarinique M2 ont été répertoriés (71). Comme montré à la figure 20, l'expression de BCRP-His<sub>10</sub> semble optimale dès 6 heures d'induction avec le méthanol. Par ailleurs, dans l'article de Rosenberg *et al.* (61), l'induction de l'expression de BCRP a duré 72 heures. Après 48 heures, le niveau d'expression est beaucoup plus bas que ce qui est visible à

24 heures. Le profil est similaire pour les protéines observées sur gel (résultat non montré). Ceci suggère que l'expression de BCRP-His<sub>10</sub> affecte négativement la croissance cellulaire de la levure (72). Dans le cadre de ce projet, les cellules sont récupérées après une induction de 24 heures plutôt que 6 heures afin de récupérer une plus grande biomasse cellulaire.

La surexpression d'une protéine exogène affecte certains paramètres de croissance cellulaire (température, disponibilité de l'oxygène) en plus de causer un stress cellulaire (94). La production peut aussi être limitée par des facteurs de la transcription et de la traduction qui vont réduire la croissance cellulaire (95). Il semble que l'abondance de transcrite de la protéine recombinante est en compétition pour un nombre limité de ribosomes qui autrement traduiraient des protéines endogènes (95). Plusieurs stratégies ont été mises en place afin d'optimiser la production hétérologue des protéines humaines chez *P. pastoris*. La température durant la phase d'induction affecte la production des protéines où une température plus basse que 30°C stabilise la membrane cellulaire et réduit la sécrétion de protéases (78, 95). Puisque la structure de la protéine est critique pour sa localisation et sa fonction, la coexpression de chaperons, l'utilisation d'une souche déficiente en protéases et l'utilisation d'une souche produisant du cholestérol sont des approches maintenant établies pour faciliter la synthèse de protéines recombinantes (77).

Des signaux supplémentaires sont visibles lors de la détection de BCRP par immunobuvardage dans les figures 19 et 20. Pour les signaux à 250 et 130 kDa retrouvés après l'induction, ils peuvent représenter la conformation homodimérique et tétramérique de BCRP respectivement. Malgré l'analyse des protéines par SDS-PAGE dans des conditions réductrices, l'état oligomérisé de BCRP-His<sub>10</sub> peut être conservé (52). Les signaux qui sont plus bas que 65 kDa peuvent être les produits de dégradation de BCRP. Quant au signal à 75 kDa retrouvé lorsque les cellules sont dans le milieu répressif (figures 19 et 20), il est retrouvé autant pour les cellules du contrôle négatif que pour les cellules exprimant BCRP-His<sub>10</sub>. Il pourrait représenter une protéine endogène capable de réagir avec l'anticorps BXP-21.



### 4.3 Extraction des vésicules membranaires

Dans le but de caractériser BCRP-His<sub>10</sub>, l'isolation de la membrane est nécessaire. Il est difficile d'évaluer son activité dans les cellules en culture et son activité peut être masquée par une variété de protéines transmembranaires présentes à la surface de la cellule.

Suite à la production de BCRP-His<sub>10</sub> dans *P. pastoris*, les cellules sont récupérées puis lysées par disruption mécanique. La paroi cellulaire des levures est composée de deux couches de  $\beta$ -glucanes et est reconnue pour sa rigidité (96, 97). Le Freezer/Mill permet d'effectuer une pulvérisation cryogénique des cellules pour homogénéiser efficacement la suspension cellulaire dans des conditions bloquant les processus biologiques (98).

Comme montré à la figure 21, l'homogénat est fractionné par centrifugation différentielle afin d'extraire la fraction microsomale contenant BCRP-His<sub>10</sub>. Les trois centrifugations à 3 500 g permettent de sédimenter les débris cellulaires comme les cellules non-lysées et le noyau (99). Les trois surnageants récupérés contiennent bien BCRP-His<sub>10</sub> et ils ont été ultracentrifugés une première fois à 100 000 g. Les mitochondries, les lysosomes, les peroxysomes, les fragments de membrane plasmique et de réticulum endoplasmique se retrouvent dans le culot (99). Puis, en traitant deux fois le culot avec l'homogénéisateur rotatif suivi de l'ultracentrifugation, les vésicules et les microsomes sont récupérés et BCRP-His<sub>10</sub> est bien présent dans ce culot.

Les membranes isolées de *P. pastoris* à ce stade ne permettent pas d'évaluer efficacement l'activité ATPase de BCRP-His<sub>10</sub>. Plusieurs protéines transmembranaires ATP-dépendantes sont présentes sur la membrane plasmique (Pma1, Pmr1) qui pourraient interférer avec les tests. Les levures possèdent notamment un réseau pléiotropique de résistance aux médicaments (*pleiotropic drug resistance*, Pdr) équivalent au phénomène MDR chez les humains (72, 100, 101). Ainsi, les cellules développent un phénotype où elles deviennent résistantes à une large gamme de médicaments structurellement différents. Des protéines d'efflux reliées aux transporteurs ABC sont exprimées, par exemple Pdr5, Pdr15 et Snq2 chez *S. cerevisiae*, et ont donc le potentiel d'avoir des substrats semblables à BCRP. Ainsi, il est nécessaire de solubiliser et purifier BCRP-His<sub>10</sub> pour évaluer spécifiquement son activité ATPase.

## 4.4 Solubilisation et purification de BCRP

La solubilisation des membranes est une étape critique dans l'extraction d'une protéine d'intérêt dans sa forme active. Les protéines membranaires ne sont pas généralement solubles en solution aqueuse et doivent être complexées avec un détergent (102). Le processus est délicat dans la mesure où la membrane lipidique doit être déstabilisée et les protéines se retrouvent encapsulées dans les micelles mimant l'environnement lipidique de la membrane. Les détergents non ioniques sont considérés comme des détergents doux et relativement non dénaturants, comparativement aux détergents ioniques (37, 102). Ils sont en mesure de briser les interactions lipide-lipide et lipide-protéine tout en conservant les interactions protéine-protéine (37, 102). Ainsi, la conformation native de la protéine n'est pas affectée et la protéine reste biologiquement active. Un paramètre important à considérer durant les processus de solubilisation est la CMC du détergent. À cette concentration, le détergent commence à s'associer avec les surfaces hydrophobes de la protéine et forme des complexes protéine-détergent soluble dans les solutions aqueuses (102). Une concentration trop élevée de détergent peut affecter l'activité de la protéine, alors qu'une concentration trop faible peut résulter à une faible solubilisation et à un échantillon hétérogène (102). L'utilisation d'une haute concentration de détergent est nécessaire pour retirer la majorité des contacts lipide-protéine, mais une délipidation complète n'est pas optimale, car cela peut aussi éliminer certaines associations qui sont essentielles pour la structure, la stabilité et la fonction de la protéine (102).

Dans le cadre de cette étude, c'est le détergent non-ionique n-dodécyl- $\beta$ -D-maltoside qui a été utilisé. Il est grandement employé pour la solubilisation des protéines membranaires grâce à sa capacité de conserver les propriétés fonctionnelles des protéines (37). Les microsomes ont été solubilisés avec 10% (w/v) de DDM puis le mélange est ultracentrifugé pour séparer la fraction insoluble de la fraction soluble. Dans la littérature, c'est une concentration de 1% (w/v) qui est normalement utilisée. Toutefois, compte tenu de la grande densité cellulaire, la solubilisation n'a pas été efficace, car BCRP-His<sub>10</sub> se retrouvait majoritairement dans la fraction insoluble (résultat non montré).

Dans le but d'isoler BCRP-His<sub>10</sub> des autres protéines, une approche chromatographique a été réalisée. La chromatographie liquide par un système ÄKTA-FPLC (*fast protein liquid*

*chromatography*) permet la purification, l'analyse et le fractionnement simultanés de l'échantillon (figure 22). Le système contient des pompes, un détecteur à UV et un collecteur de fractions automatisé qui facilite le processus (67).

La chromatographie d'affinité utilise l'interaction entre les macromolécules et un ligand particulier (102). L'étiquette de 10 histidines fusionnée à l'extrémité C-terminale de BCRP est exploitée par la chromatographie d'affinité au nickel. La purification est basée sur la haute affinité des ions de nickel chélatés pour les groupements imidazole des résidus histidine. Des liens de coordination sont formés entre un ion de nickel et deux atomes de nitrogène de deux groupements imidazole (103).

Pour la colonne HisTrap HP, la résine de sépharose est préalablement préchargée avec les ions de nickel par le fabricant. Les tampons utilisés pour la purification contiennent 0,1% (w/v) du détergent DDM pour éviter l'agrégation des protéines et 30% (v/v) de glycérol pour maintenir la conformation active de BCRP-His<sub>10</sub>. Les protéines qui n'ont pas d'affinité pour le nickel traversent la colonne en même temps que le tampon de lavage.

Par ailleurs, un premier essai de purification a été effectué par un gradient d'imidazole allant de 20 à 500 mM pour trouver la concentration optimale capable de détacher spécifiquement BCRP-His<sub>10</sub> de la résine. Toutefois, les résultats n'ont pas été concluants, car les microsomes avaient été initialement solubilisés avec 1% (w/v) de DDM. À cette concentration de détergent, une grande partie BCRP-His<sub>10</sub> s'est retrouvée dans la fraction insoluble et aucun pic d'élution sur le chromatogramme n'a pu être noté.

Comme observé sur le chromatogramme de la figure 22a, il y a un fort signal d'absorbance à 280 nm au premier pic sur le chromatogramme (région 1). En appliquant seulement le tampon de lavage contenant 20 mM d'imidazole dans la colonne, la courbe des UV redescend à 0 (région 2) et aucun signal protéique n'est visible sur gel (figure 22b, puit 2). Il n'y a pas de signal pour BCRP par immunobuvardage (figure 22c) ce qui confirme que BCRP-His<sub>10</sub> est restée attachée à la résine.

Pour l'élution, un tampon contenant 250 mM d'imidazole, contrairement à 200 mM dans l'article de Rosenberg *et al.* (61), est utilisé pour déplacer ce qui est lié à la résine dans la phase mobile. Le second pic du chromatogramme (région 3) permet d'affirmer que des protéines se

sont détachées de la résine. Cependant, après l'analyse des échantillons par SDS-PAGE (figure 22b, puit 3), BCRP-His<sub>10</sub> n'est pas visible et des signaux pour d'autres protéines sont présents dans l'éluat. La présence de BCRP-His<sub>10</sub> est tout de même confirmée par immunobuvardage comme observée à la figure 21c. En traitant la colonne avec 500 mM d'imidazole, aucune protéine n'est visible et le signal aux UV correspond à l'absorbance de l'imidazole (région 4). Ainsi, une purification partielle de BCRP-His<sub>10</sub> a pu être réalisée. La coélution de BCRP-His<sub>10</sub> avec d'autres protéines peut provenir du fait qu'elles ont de l'affinité pour la résine. Il est possible aussi que les signaux protéiques observés sur gel soient des produits de dégradation protéolytique de BCRP. Par ailleurs, le profil de migration des protéines entre le matériel d'origine (figure 22b, puit 1) et l'éluat (figure 22b, puit 3) est différent, où la majorité des protéines se sont retrouvées dans le flowthrough.

Dans cette étude, BCRP-His<sub>10</sub> a été partiellement purifié. Bien que le pic 3 du chromatogramme de la figure 22a soit bien isolé, il semble que BCRP-His<sub>10</sub> ait coélué avec d'autres protéines de la levure ou qu'il ait été dégradé. Dans l'étude de Rosenberg *et al.*, les auteurs affirment avoir purifié BCRP à 90% par une seule chromatographie (61). Cependant, leur rendement de 200 µg est faible. Les résultats n'ont pas pu être reproduits, car bien que les méthodes aient été suivies, le matériel tel que la souche de *P. pastoris*, le vecteur d'expression et le traitement de la colonne Ni<sup>2+</sup>-NTA sont différents. Dans le cas de l'étude de Telbisz *et al.* où BCRP est exprimée dans les cellules Sf9, une seule purification sur la résine Ni<sup>2+</sup>-NTA est suffisante pour l'isoler (52). Par contre, dans l'étude de Jacobs *et al.*, d'autres techniques chromatographiques sont nécessaires lorsque BCRP est exprimée chez *S. cerevisiae* (72). Dans le cadre de ce travail, un rendement dans l'ordre du milligramme de protéine hautement purifié est recherché. Donc, l'utilisation d'au moins deux techniques chromatographiques seraient nécessaires afin de raffiner l'échantillon de BCRP-His<sub>10</sub>.

## 4.5 Résumé

Enfin, le vecteur pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub> a été généré pour l'expression du gène humain de l'isoforme 1 de BCRP dans la levure méthylo-trophe *P. pastoris*. Le gène recombinant a été cloné et BCRP-His<sub>10</sub> a été produit dans la levure après l'induction du promoteur AOX1 par le méthanol pendant 24 heures. Les cellules ont été lysées à l'aide du Freezer/Mill et les membranes ont été isolées par centrifugation différentielle. Les protéines ont été solubilisées par le détergent non ionique DDM. À partir d'une culture de 1 L, environ 125 mg de BCRP-His<sub>10</sub> partiellement purifié a pu être obtenu par chromatographie d'affinité au nickel à l'aide du système ÄKTA-FPLC.

## Chapitre 5 – Conclusion et perspectives

Les expériences réalisées dans cette étude ne permettent pas de répondre à l'hypothèse. Il n'est pas possible de conclure que les protéoliposomes permettront de faciliter la distinction de l'activité et des mécanismes de transport des protéines membranaires. Par contre, les résultats obtenus permettront de faciliter la progression du projet pour l'élaboration d'un nouveau modèle de perméabilité *in vitro* par la reconstitution de transporteurs membranaires recombinants dans des liposomes.

Les objectifs ont été atteints dans la mesure où ce travail a permis de mettre au point dans notre laboratoire un système d'expression d'un transporteur connu. Le vecteur pJ902-ABCG2i-His<sub>10</sub> a été généré et un système d'expression pour la production de l'isoforme 1 de BCRP humaine a été établi chez la levure *Pichia pastoris*. Les conditions de transformation, de culture et d'induction et de la lyse de *P. pastoris* basées sur les procédures décrites dans l'article de Rosenberg *et al.* (61) ont pu être développées dans le laboratoire.

L'expression BCRP-His<sub>10</sub> a permis de générer une grande biomasse grâce à 1 L de culture. La phase d'induction est relativement rapide, car 24 heures d'incubation sont nécessaires, contrairement aux 72 heures nécessaires dans l'étude de Rosenberg *et al.* (61) L'utilisation du Freezer/Mill est une méthode de choix pour la lyse des levures. Le plus grand avantage est que les variations de températures sont évitées comparativement à

l'homogénéisateur à haute pression. La fraction membranaire a été isolée par centrifugation et les protéines ont été solubilisées à l'aide du détergent DDM. L'étape de solubilisation doit être optimisée afin de répondre à la grande quantité de protéines présente. BCRP-His<sub>10</sub> a pu être partiellement purifiée par chromatographie d'affinité au nickel par le système ÄKTA-FPLC. Le processus de purification devra être optimisé pour avoir des échantillons de BCRP avec un meilleur rendement de pureté tout en isolant une grande quantité de protéine.

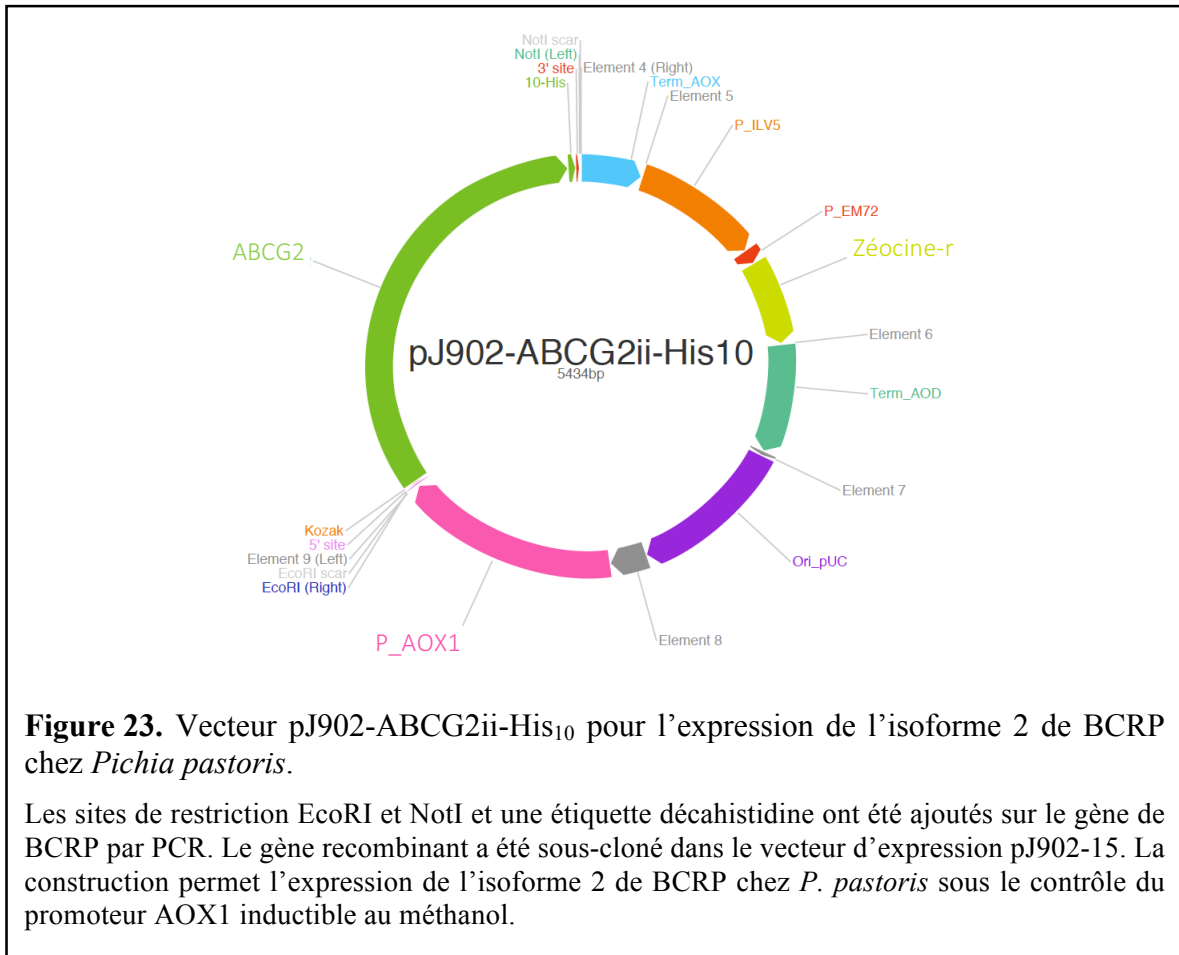
Pour confirmer l'identité des protéines présentes sur le gel de la figure 22b, il serait intéressant d'analyser l'éluat par spectrométrie de masse. Si des produits de dégradation de BCRP sont retrouvés, il faudrait augmenter la concentration des inhibiteurs de protéases. Afin de trouver la concentration d'imidazole idéale pour l'éluion spécifique de BCRP-His<sub>10</sub>, il aurait été nécessaire d'effectuer un gradient d'imidazole dans des concentrations entre 20 et 250 mM. De plus, d'autres stratégies incluent l'utilisation de concentration de NaCl plus élevée pour détruire les interactions ioniques protéine-protéine et l'éluion dans des conditions dénaturantes par l'utilisation d'urée pour que l'étiquette histidine ne soient pas cachée par la structure tridimensionnelle de la protéine (104). Pour améliorer la pureté, une chromatographie par filtration sur gel ou une chromatographie échangeuse d'anion devrait être ajoutée à la procédure de chromatographie d'affinité.

Il est possible d'augmenter la capacité de production de BCRP-His<sub>10</sub> chez *P. pastoris* en optant pour la fermentation. La levure a le potentiel d'atteindre de hautes densités cellulaires dans un fermenteur, ce qui peut mener à un meilleur rendement protéique. Des cultures allant de 10 à 100 L sont possibles. Par contre, plusieurs paramètres doivent être surveillés durant la production de la biomasse et l'induction de l'expression d'une protéine hétérologue, par exemple : la température, le pH, l'aération et le niveau d'oxygène dissout (105).

La caractérisation de BCRP-His<sub>10</sub> n'a pas pu être faite dans le cadre de ce travail. La mesure de l'activité ATPase de BCRP-His<sub>10</sub> purifié sera basée sur le test colorimétrique de la *malachite green* où la libération de phosphate inorganique est quantifiée par absorbance à 610 nm. L'essai sera fait en présence de différentes concentrations de médicaments pour stimuler l'activité de la protéine ou avec 1 mM de vanadate pour inhiber l'activité. Les substrats utilisés dans la littérature pour caractériser BCRP comprennent la prazosine, la sulfasalazine, la quercétine, la progestérone ou l'estrone-3-sulfate.

Après la purification, BCRP-His<sub>10</sub> sera reconstitué dans un environnement lipidique afin d'obtenir des résultats d'activité biologiquement plus significatifs. Des protéoliposomes seront produits pour évaluer l'activité ATPase de BCRP-His<sub>10</sub>, mais aussi pour évaluer sa capacité de transport de substrat sans présence d'interférences moléculaires. La présence d'une membrane lipidique influence directement l'activité du transporteur. La composition des lipides est aussi importante pour la stimulation de l'activité et du transport des substrats. Il a été démontré que la présence de cholestérol et autres stérols membranaires est importante pour la fonction de BCRP (52). Ainsi, il sera important de considérer ces cofacteurs lors de la reconstitution dans les liposomes. Des liposomes consistants de 0,5 mg/mL d'extrait de lipides d'*E. coli* et 0,11 mg/mL (30 mol%) de cholestérol ont été produits (52). BCRP a déjà été étudié dans des liposomes, mais le but du projet sera de l'utiliser comme outil de criblage. L'utilisation de protéoliposomes comme nouveau modèle permettra de prédire la biodisponibilité des médicaments. Les interactions entre un médicament et un transporteur, de même que l'apport de cofacteurs dans la translocation d'un substrat vont pouvoir être étudiés de façon spécifique. La création d'une librairie de protéoliposomes facilitera la compréhension des mécanismes structuraux et fonctionnels du transport des médicaments dans les cellules.

Dans un autre ordre d'idée, BCRP existe en deux isoformes, où l'isoforme 2 possède une extrémité 3' plus courte et distincte, comparée à l'isoforme 1. La variation de longueur du gène fait en sorte que l'isoforme 2 ne possède pas le sixième domaine transmembranaire. Il serait intéressant de caractériser l'isoforme 2, car il n'y a pas d'information dans la littérature concernant cet isoforme spécifiquement. L'incorporation des deux isoformes de BCRP dans des liposomes pourrait faciliter la distinction dans leur activité et dans le transport de leurs substrats. L'isoforme 2 pourrait être produit en utilisant le même protocole que l'isoforme 1. Le vecteur pJ902-ABCG2ii-His<sub>10</sub> a déjà été généré pour l'expression dans *Pichia pastoris* (figure 23).



Somme toute, les résultats obtenus dans cette partie du projet ont permis de mettre au point les paramètres pour la production de l'isoforme 1 de BCRP-His<sub>10</sub> dans la levure *P. pastoris*. Ces données permettront l'avancement des travaux pour l'utilisation des protéoliposomes comme nouveau modèle de la perméabilité. Les perspectives proposées devraient permettre d'augmenter le rendement de production et de purification d'un transporteur membranaire exprimé chez *Pichia pastoris*.



## Bibliographie

1. Hirschler B. New drug approvals fall to six-year low in 2016: Reuters; Jan 2, 2017 [Available from: <http://reut.rs/2hJ4sU7>].
2. Mullard A. 2016 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(2):73-6.
3. Balimane PV, Han Y-H, Chong S. Permeability and transporter models in drug discovery and development. 2012. In: *ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development* [Internet]. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; [161-8]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/9781118180778.ch10>.
4. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011;162(6):1239-49.
5. Zhang D, Luo G, Ding X, Lu C. Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2012;2(6):549-61.
6. Introduction. 2016. In: *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* [Internet]. Woodhead Publishing; [1-2]. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100094-6.00001-8>.
7. Pereira C, Costa J, Sarmiento B, Araújo F. Cell-based in vitro models for intestinal permeability studies. 2016. In: *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* [Internet]. Woodhead Publishing; [57-81]. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100094-6.00005-5>.
8. Calcagno AM, Siahaan TJ. Physiological, Biochemical, and Chemical Barriers to Oral Drug Delivery In: Wang B, Hu L, Siahaan TJ, editors. *Drug Delivery: Principles and Applications*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc; 2005. p. 16-25.
9. Cabrera-Pérez MÁ, Sanz MB, Sanjuan VM, González-Álvarez M, Álvarez IG. Importance and applications of cell- and tissue-based in vitro models for drug permeability screening in early stages of drug development. 2016. In: *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* [Internet]. Woodhead Publishing; [3-29]. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100094-6.00002-X>.
10. La phase d'absorption des médicaments. In: Clère N, Faure S, Guerriaud M, editors. *Bases fondamentales en pharmacologie: Sciences du médicament*. Issy-les-Moulineaux (FR): Elsevier Masson; 2014. p. 10-20.
11. Viau C, Tardif R. Toxicologie. In: Gérin M, Gosselin P, Cordier S, Viau C, Quénel P, Dewailly É, editors. *Environnement et santé publique - Fondements et pratiques*. St-Hyacinthe, QC: Edisem; 2003. p. 119-43.
12. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):141-53.

13. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke JD, Serino M, et al. Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol.* 2014;14(1):189.
14. Viswanathan VK, Hodges K, Hecht G. Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nat Rev Micro.* 2009;7(2):110-9.
15. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(10):667-85.
16. Daneman R, Rescigno M. The Gut Immune Barrier and the Blood-Brain Barrier: Are They So Different? *Immunity.* 2009;31(5):722-35.
17. Hamman JH, Demana PH, Olivier EI. Targeting receptors, transporters and site of absorption to improve oral drug delivery. *Drug Target Insights.* 2007;2:71-81.
18. Kwatra D, Mitra AK, Khurana V. In vitro models in drug discovery and delivery. In: Mitra AK, Kwatra D, Vadlapudi AD, editors. *Drug Delivery.* Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning; 2014. p. 31-45.
19. Thakker DR. Strategic Use of Preclinical Pharmacokinetic Studies and In Vitro Models in Optimizing ADME Properties of Lead Compounds. 2006. In: *Optimizing the "Drug-Like" Properties of Leads in Drug Discovery [Internet].* New York, NY: SpringerBiotechnology: Pharmaceutical Aspects; [1-23]. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-44961-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-44961-6_1).
20. Yang NJ, Hinner MJ. Getting Across the Cell Membrane: An Overview for Small Molecules, Peptides, and Proteins. In: Gautier A, Hinner MJ, editors. *Site-Specific Protein Labeling: Methods and Protocols.* New York, NY: Springer New York; 2015. p. 29-53.
21. Pocock G, Richards CD. Fonctions de transport de la membrane plasmique. *Physiologie humaine: les fondements de la médecine.* Paris: Masson; 2004. p. 36-47.
22. Principales voies d'entrée des toxiques et mécanismes de contamination ou d'absorption. In: Coumoul X, Massicot F, Pairon JC, Andujar P, Baeza-Squiban A, Barouki R, et al., editors. *Toxicologie: Fondamentaux et fiches pratiques.* Paris (FR): Dunod; 2017. p. 17-21.
23. Membrane cellulaire et potentiel de membrane. In: Sherwood L, editor. *Physiologie humaine.* 3rd ed. Louvain-la-Neuve De Boeck; 2015. p. 60.
24. Scalise M, Pochini L, Giangregorio N, Tonazzi A, Indiveri C. Proteoliposomes as tool for assaying membrane transporter functions and interactions with xenobiotics. *Pharmaceutics.* 2013;5(3):472-97.
25. Mandal A, Agrahari V, Khurana V, Pal D, Mitra AK. Transporter effects on cell permeability in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2017;14(3):385-401.
26. Volpe DA. Transporter assays as useful in vitro tools in drug discovery and development. *Expert opinion on drug discovery.* 2016;11(1):91-103.
27. Nigam SK. What do drug transporters really do? *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(1):29-44.
28. Zhang L, Strong JM, Qiu W, Lesko LJ, Huang S-M. Scientific perspectives on drug transporters and their role in drug interactions. *Mol Pharm.* 2006;3(1):62-9.

29. Szakács G, Varadi A, Özvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug discovery today*. 2008;13(9):379-93.
30. El-Awady R, Saleh E, Hashim A, Soliman N, Dallah A, Elrasheed A, et al. The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. *Front Pharmacol*. 2016;7:535.
31. Sarmento B, Andrade F, da Silva SB, Rodrigues F, das Neves J, Ferreira D. Cell-based in vitro models for predicting drug permeability. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012;8(5):607-21.
32. Sugano K, Kansy M, Artursson P, Avdeef A, Bendels S, Di L, et al. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(8):597-614.
33. Deferme S, Annaert P, Augustijns P. In Vitro Screening Models to Assess Intestinal Drug Absorption and Metabolism. 2008. In: *Drug Absorption Studies Biotechnology: Pharmaceutical Aspects* [Internet]. Boston, MA: SpringerBiotechnology: Pharmaceutical Aspects; [182-215]. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-74901-3\\_8](http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-74901-3_8).
34. Sugano K. 5.19 - Artificial Membrane Technologies to Assess Transfer and Permeation of Drugs in Drug Discovery A2 - Taylor, John B. In: Triggler DJ, editor. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Oxford: Elsevier; 2007. p. 453-87.
35. Simeonov P, Werner S, Haupt C, Tanabe M, Bacia K. Membrane protein reconstitution into liposomes guided by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophys Chem*. 2013;184:37-43.
36. van der Laan M, Zerbes RM, van der Does C. Reconstitution of mitochondrial presequence translocase into proteoliposomes. *Methods Mol Biol*. 2013;1033:325-44.
37. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1666(1-2):105-17.
38. Hirz M, Richter G, Leitner E, Wriessnegger T, Pichler H. A novel cholesterol-producing *Pichia pastoris* strain is an ideal host for functional expression of human Na,K-ATPase alpha3beta1 isoform. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97(21):9465-78.
39. Johnson ZL, Lee SY. Liposome reconstitution and transport assay for recombinant transporters. *Methods Enzymol*. 2015;556:373-83.
40. Kleiveland CR. Co-cultivation of Caco-2 and HT-29MTX. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 135-40.
41. Schimpel C, Teubl B, Absenger M, Meindl C, Frohlich E, Leitinger G, et al. Development of an advanced intestinal in vitro triple culture permeability model to study transport of nanoparticles. *Mol Pharm*. 2014;11(3):808-18.
42. Albac S, Lopez-Alayon C, Schmitz A, d'Enfert C, Sautour M, Labruère-Chazal C, et al. Les cellules M : une porte d'entrée pour le franchissement de la barrière intestinale par *Candida albicans*. *J Mycol Med*. 2015;25(2):e102-e3.

43. Delves PJ, Burton DR, Martin SJ, Roitt IM, Masson PL. Les fondements de l'immunologie. Bruxelles: De Boeck Supérieur; 2008. p. 163-5.
44. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;204(3):216-37.
45. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):218-27.
46. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(2):147-56.
47. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(1):48-58.
48. ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ. Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol.* 2014;143(4):419-35.
49. Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2007;17(4):412-8.
50. Chen Z, Shi T, Zhang L, Zhu P, Deng M, Huang C, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* 2016;370(1):153-64.
51. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS J.* 2015;17(1):65-82.
52. Telbisz A, Ozvegy-Laczka C, Hegedus T, Varadi A, Sarkadi B. Effects of the lipid environment, cholesterol and bile acids on the function of the purified and reconstituted human ABCG2 protein. *Biochem J.* 2013;450(2):387-95.
53. Taylor NMI, Manolaridis I, Jackson SM, Kowal J, Stahlberg H, Locher KP. Structure of the human multidrug transporter ABCG2. *Nature.* 2017;advance online publication.
54. Westover D, Li F. New trends for overcoming ABCG2/BCRP-mediated resistance to cancer therapies. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015;34(1):159.
55. Mo W, Zhang JT. Human ABCG2: structure, function, and its role in multidrug resistance. *Int J Biochem Mol Biol.* 2012;3(1):1-27.
56. Horsey AJ, Cox MH, Sarwat S, Kerr ID. The multidrug transporter ABCG2: still more questions than answers. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(3):824-30.
57. Polgar O, Deeken JF, Ediriwickrema LS, Tamaki A, Steinberg SM, Robey RW, et al. The 315-316 deletion determines the BXP-21 antibody epitope but has no effect on the function of wild type ABCG2 or the Q141K variant. *Mol Cell Biochem.* 2009;322(1-2):63-71.
58. Noguchi K, Katayama K, Sugimoto Y. Human ABC transporter ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for molecular cancer therapeutics. *Pharmgenomics Pers Med.* 2014;7:53-64.
59. Lemos C, Jansen G, Peters GJ. Drug transporters: recent advances concerning BCRP and tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer.* 2008;98(5):857-62.

60. Stacy AE, Jansson PJ, Richardson DR. Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance. *Mol Pharmacol.* 2013;84(5):655-69.
61. Rosenberg MF, Bikadi Z, Chan J, Liu X, Ni Z, Cai X, et al. The human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) shows conformational changes with mitoxantrone. *Structure.* 2010;18(4):482-93.
62. Hasanabady MH, Kalalinia F. ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer. *J Biosci.* 2016;41(2):313-24.
63. Polgar O, Robey RW, Bates SE. ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(1):1-15.
64. Telbisz Á, Müller M, Özvegy-Laczka C, Homolya L, Szenté L, Váradi A, et al. Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 2007;1768(11):2698-713.
65. Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K, Varadi A. ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett.* 2004;567(1):116-20.
66. Telbisz Á, Hegedüs C, Váradi A, Sarkadi B, Özvegy-Laczka C. Regulation of the Function of the Human ABCG2 Multidrug Transporter by Cholesterol and Bile Acids: Effects of Mutations in Potential Substrate and Steroid Binding Sites. *Drug Metab Disposition.* 2014;42(4):575-85.
67. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Expressing Cloned Genes for Protein Production, Purification and Analysis. In: Green MR, Sambrook J, editors. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 4th ed 2012. p. 1481-636.
68. Brooks CL, Morrison M, Joanne Lemieux M. Rapid expression screening of eukaryotic membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Protein Sci.* 2013;22(4):425-33.
69. Freigassner M, Pichler H, Glieder A. Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microb Cell Fact.* 2009;8(1):69.
70. Claes K, Guerfal M, Callewaert N. Membrane protein expression and analysis in yeast. *Methods Enzymol.* 2015;556:123-40.
71. Byrne B. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Curr Opin Struct Biol.* 2015;32:9-17.
72. Jacobs A, Emmert D, Wieschrath S, Hrycyna CA, Wiese M. Recombinant synthesis of human ABCG2 expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental methodological study. *Protein J.* 2011;30(3):201-11.
73. Schwarzshans J-P, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T, Kalinowski J, Friehs K. Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing. *Sci Rep.* 2016;6:38952.
74. Yang H, Tong J, Lee CW, Ha S, Eom SH, Im YJ. Structural mechanism of ergosterol regulation by fungal sterol transcription factor Upc2. *Nature Communications.* 2015;6:6129.

75. Invitrogen. EasySelect Pichia Expression Kit - For Expression of Recombinant Proteins Using pPICZ and pPICZ $\alpha$  in Pichia pastoris (cat. K1740-01) 2010 [09/01/2017]. Available from: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/easyselect_man.pdf).
76. Alkhalfioui F, Logez C, Bornert O, Wagner R. Expression Systems: Pichia pastoris. 2011. In: Production of Membrane Proteins [Internet]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; [75-108]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/9783527634521.ch3>.
77. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98(12):5301-17.
78. Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production. J Mol Recognit. 2005;18(2):119-38.
79. Nucleic Acid Structure and Methods. In: Cox MM, Doudna JA, O'Donnell M, editors. Molecular biology : principles and practice. New York, NY: W. H. Freeman and Co.; 2012. p. 217.
80. Acides nucléiques, expression des gènes et technologies de l'ADN recombinant. In: Voet D, Voet JG, editors. Biochimie. 3 ed. Louvain-la-Neuve: De Boeck Supérieur; 2016. p. 104-25.
81. Papaneophytou CP, Kontopidis G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in Escherichia coli: a general review. Protein Expr Purif. 2014;94:22-32.
82. Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. Drug Discov Today. 2014;19(5):590-601.
83. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. Nat Biotech. 2014;32(10):992-1000.
84. Structural Genomics Consortium, Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Berkeley Structural Genomics Center, China Structural Genomics Consortium, Integrated Center for Structure and Function Innovation, Israel Structural Proteomics Center, et al. Protein production and purification. Nat Methods. 2008;5(2):135-46.
85. Tripathi NK. Production and Purification of Recombinant Proteins from Escherichia coli. ChemBioEng Reviews. 2016;3(3):116-33.
86. Guiochon G, Beaver LA. Separation science is the key to successful biopharmaceuticals. J Chromatogr A. 2011;1218(49):8836-58.
87. Techniques de purification des protéines et des acides nucléiques. In: Voet D, Voet JG, editors. Biochimie. Louvain-la-Neuve: De Boeck Supérieur; 2016. p. 135-44.
88. Mao Q, Conseil G, Gupta A, Cole SP, Unadkat JD. Functional expression of the human breast cancer resistance protein in Pichia pastoris. Biochem Biophys Res Commun. 2004;320(3):730-7.
89. Staley CA, Huang A, Nattestad M, Oshiro KT, Ray LE, Mulye T, et al. Analysis of the 5' untranslated region (5'UTR) of the alcohol oxidase 1 (AOX1) gene in recombinant protein expression in Pichia pastoris. Gene. 2012;496(2):118-27.
90. Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, et al. ABCG2: a perspective. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61(1):3-13.

91. Kavran JM, Leahy DJ. Chapter Fourteen - Silver Staining of SDS-polyacrylamide Gel. In: Lorsch J, editor. *Methods Enzymol.* 541: Academic Press; 2014. p. 169-76.
92. Schwarzhans J-P, Wibberg D, Winkler A, Luttermann T, Kalinowski J, Friehs K. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. *Microbial Cell Factories.* 2016;15(1):84.
93. Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods Enzymol.* 2009;463:169-89.
94. Ferrer P, Albiol J. (1)(3)C-based metabolic flux analysis of recombinant *Pichia pastoris*. *Methods Mol Biol.* 2014;1191:291-313.
95. Zahrl RJ, Pena DA, Mattanovich D, Gasser B. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Res.* 2017;17(7).
96. Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonova J, et al. Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin. *J Biol Chem.* 1997;272(28):17762-75.
97. Francois JM. Cell Surface Interference with Plasma Membrane and Transport Processes in Yeasts. 2016. In: *Yeast Membrane Transport* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; [11-31]. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_2).
98. Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc.* 2012;7(8):1534-50.
99. Protein Structure and Function. In: Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al., editors. *Essential cell biology.* Fourth edition.. ed. New York: Garland Science; 2014. p. 157-66.
100. Kuchler K, Schüller C. ABC Transporters in Yeast – Drug Resistance and Stress Response in a Nutshell. In: Nitiss JL, Heitman J, editors. *Yeast as a Tool in Cancer Research.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2007. p. 289-314.
101. Le Crom S, Devaux F, Marc P, Zhang X, Moye-Rowley WS, Jacq C. New Insights into the Pleiotropic Drug Resistance Network from Genome-Wide Characterization of the YRR1 Transcription Factor Regulation System. *Mol Cell Biol.* 2002;22(8):2642-9.
102. Lórenz-Fonfría V, Perálvarez-Marín A, Padrós E, Lazarova T. Solubilization, Purification, and Characterization of Integral Membrane Proteins. 2011. In: *Production of Membrane Proteins: Strategies for Expression and Isolation* [Internet]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; [317-43]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/9783527634521.ch12>.
103. Rowinska-Zyrek M, Witkowska D, Potocki S, Remelli M, Kozłowski H. His-rich sequences – is plagiarism from nature a good idea? *New J Chem.* 2013;37(1):58-70.
104. Bornhorst JA, Falke JJ. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods Enzymol.* 326: Academic Press; 2000. p. 245-54.

105. Liu WC, Gong T, Wang QH, Liang X, Chen JJ, Zhu P. Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement. *Sci Rep.* 2016;6:18439.