

UNIVERSITE DE MONTREAL/UNIVERSITE DE CERGY-PONTOISE

*Modulation de l'expression du gène CFTR par le produit du gène FIC1 responsable de la
cholestase familiale intra-hépatique progressive de type 1 :
Identification des mécanismes moléculaires impliqués*

Par Jacques-Aurélien Sergent

Département de Sciences Biomédicales / Département de Biologie
Faculté de Médecine / UFR Sciences et Techniques

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures (Montréal)

En vue de l'obtention du grade de Docteur

En Ph.D Sciences Biomédicales

Thèse en cotutelle présentée à l'Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie (Cergy-Pontoise)

En vue de l'obtention du grade de Docteur

En Sciences de la Vie et de la Santé

Mai 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Université de Cergy-Pontoise
Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie

Cette thèse intitulée :

Modulation de l'expression du gène CFTR par le produit du gène FIC1 responsable de la cholestase familiale intra-hépatique progressive de type 1 :

Identification des mécanismes moléculaires impliqués

Présentée par :

Jacques-Aurélien Sergent

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pr Christian Hulen – Président du Jury

Dr Emmanuelle Brochiero – Rapporteur

Pr Jean-Pierre Hugot – Rapporteur

Pr Sébastien Lemieux – Examineur Externe (UdeM)

Pr Chantal Housset – Examineur

Pr Aleksander Edelman - Examineur

Pr Yves Berthiaume – Co-Directeur de thèse

Pr Nour-Eddine Lomri – Directeur de thèse

Résumé

La cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 1 (PFIC1) humaine est une maladie génétique rare, provoquée par des mutations du gène *ATP8B1*, due à un défaut de sécrétion des acides biliaires. Un syndrome moins sévère, et épisodique, appelé Cholestase Intra-hépatique Récurrente Bénigne (BRIC) a pu être associé à des mutations au sein du même gène. Les patients PFIC1 souffrent de nombreuses manifestations extra-hépatiques. Certaines de ces manifestations sont communes aux patients mucoviscidosiques. Le niveau d'expression de *CFTR*, gène responsable de la mucoviscidose, est diminué chez les patients PFIC1.

Cette étude a porté sur l'analyse des interactions/régulations entre *CFTR* et *ATP8B1*. Une première approche a été de montrer l'expression de ces gènes dans différentes lignées cellulaires puis d'identifier la présence de leurs protéines par western blot et immunofluorescence. Une seconde approche a été d'effectuer une analyse *in silico* de la structure d'*ATP8B1* par rapport à sa fonction. Nous avons aussi localisés les modifications connues sur un modèle 2D. Cette analyse a permis de mettre en évidence en plus des sites connus (ATPase et domaines transmembranaires), deux sites de maturations par clivage ainsi qu'un domaine riche en phosphorylation, des domaines PDZ et un domaine d'interaction avec des récepteurs nucléaires et des facteurs de transcription. A partir d'un polypeptide de 180 kDa, le clivage au niveau des sites identifiés produit un peptide de 145 kDa puis un de 90 kDa, révélés par western blot avec un anticorps dirigé contre la partie C-Terminale de la protéine. Ce peptide de 90 kDa, après myristoylation, pourrait interagir avec des récepteurs nucléaires et des facteurs de transcriptions. Ces interactions nous ont permis de monter un modèle qui pourrait expliquer la diminution d'expression génique de différents gènes observés chez les malades PFIC1. Cette analyse a été poursuivie par une étude de l'interactome d'*ATP8B1* qui a montré une interaction possible avec *CFTR* directement ou par l'intermédiaire d'une protéine de liaison, *PDZK1*. Une dernière étude a porté sur la fonctionnalité de *CFTR* dans deux lignées portant des mutations différentes d'*ATP8B1*. L'ensemble des résultats montre qu'*ATP8B1* participerait à la régulation de l'expression du gène *CFTR* mais aussi à sa maturation fonctionnelle.

Mots clés : Cholestase, Maladie de Byler, Fibrose kystique, Mucoviscidose, Foie, Régulation génique, Approche *in silico*, Annotation protéique, interactions protéiques

Abstract

Human Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis type 1 (PFIC1) is a rare genetic disease provoked by mutations inside the *ATP8B1* gene resulting in a general loss of bile acids secretion. An episodic and less severe syndrome called Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis (BRIC) have also been associated with mutations in this gene. PFIC1 patients are suffering from many extra-hepatic manifestations. Some of these manifestations are common to Cystic Fibrosis (CF) patients, carrying mutations in *CFTR* gene. Moreover, expression of *CFTR* is decreased for some PFIC1 patients.

This study was carried out to define the role of *ATP8B1* in the modulation of *CFTR* gene expression and protein function. A first approach was to identify both gene expression and protein synthesis among various cell lines. Then, we developed a second approach based on *in silico* analysis of structure and function of *ATP8B1* to construct a 2D model of the protein. This approach was correlated with the localization of known mutations of *ATP8B1*. This analysis showed two possible protein maturation sites, a rich phosphorylation domain and a nuclear receptor interacting domain. The cleavage of the 180 kDa peptide generates a 145kDa (ATPase) and a second cleavage produces a 90 kDa, all identified with a specific antibody directed toward the C-Terminal region of the protein. The 90 kDa peptide should be readdressed to the nucleus after myristoylation to interact with nuclear receptors and transcription factors. This analysis was completed by an interactomic approach which has shown a possible interaction between *CFTR* and *ATP8B1* proteins either directly or mediated by a linker, PDZK1. The last part of this work was dedicated to assess the role of *ATP8B1* on the activity of *CFTR* using two cell lines expressing two different mutated *ATP8B1* genes. From all these results, we concluded that *ATP8B1* is probably involved in the regulation of *CFTR* gene expression and *CFTR* maturation and function. We therefore propose a schematic representation of *ATP8B1* synthesis and maturation associated with its putative biological functions in the cell.

Keywords : Cholestasis, Byler disease, Cystic Fibrosis, Liver, Gene regulation, In silico Approach, Protein annotation, Protein interactions

Résumé de vulgarisation

La cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 1 (PFIC1) est une maladie génétique rare de l'enfant se traduisant en premier lieu par un dysfonctionnement du foie empêchant entre autre la sécrétion des acides biliaires, nécessaires à la digestion.

Ce travail s'intéresse à la compréhension de cette maladie et plus précisément au(x) rôle(s) de la protéine défectueuse impliquée, appelée ATP8B1. Cette fonction n'est pas bien comprise actuellement, en particulier au niveau de la sécrétion des acides biliaires. Nous avons donc dans un premier temps analysé sa séquence en acides aminés afin de comprendre les rôles possibles qu'elle pourrait jouer dans la cellule. Les premiers résultats nous ont permis d'envisager plusieurs sites à l'intérieur de la cellule où ATP8B1 pourrait interagir avec d'autres protéines. Chacune des protéines exprimées dans une cellule a un rôle et donc une fonction précise ; le dysfonctionnement de l'une de ces protéines peut entraîner celui d'une autre et ainsi provoquer des maladies.

Notre étude a montré en particulier une interaction d'ATP8B1 avec la protéine CFTR. Lorsqu'elle ne fonctionne pas correctement, cette dernière protéine est responsable de la mucoviscidose, ou fibrose kystique. Cette maladie génétique est la plus fréquente dans les populations nord-européennes et nord-américaines. Certains symptômes des patients souffrant de cette maladie sont communs aux patients souffrant de PFIC1 (au niveau du foie et du pancréas par exemple). De plus, la protéine CFTR n'est plus correctement exprimée chez certains patients PFIC1. Dans notre étude, nous avons pu montrer une interaction directe entre ces deux protéines.

Nous avons aussi montré que la protéine ATP8B1 pouvait être coupée en plusieurs parties. Ces différentes coupures génèrent des segments de tailles et de fonctions différentes. Ainsi, l'une de ces parties semblerait être adressée au noyau de la cellule ; le noyau étant le lieu où les gènes sont exprimés. Or, nous avons pu montrer qu'un fragment au moins d'ATP8B1 était présent dans le noyau. Ainsi, cette partie d'ATP8B1 pourrait modifier l'expression des protéines qui ne sont plus correctement exprimées chez les patients souffrant de PFIC1.

Dans le but de vérifier cette hypothèse nous avons voulu mesurer la fonctionnalité de CFTR pour différentes mutations d'ATP8B1, c'est-à-dire pour différentes modifications connues de cette protéine provoquant une pathologie plus ou moins grave. Il est ainsi apparu qu'une mutation représentative de la pathologie la plus sévère se traduisait par une absence quasi totale de la fonction de CFTR, alors qu'une modification provoquant une maladie transitoire et moins sévère n'altérerait pas cette même fonction.

Notre étude montre donc que la protéine ATP8B1 semble jouer plusieurs rôles au sein de la cellule en fonction de sa localisation. Elle pourrait donc participer à l'expression de certains gènes mais aussi contribuer au bon fonctionnement de protéines comme nous avons pu le montrer dans le cas de CFTR.

Table des matières

Résumé	3
Abstract	4
Résumé de vulgarisation	5
Table des matières	7
Abréviations utilisées	10
Remerciements	12
I-Introduction	13
1-Le foie	13
1.1 Notions d'anatomie hépatique	13
1.2 Notions de physiologie hépatique.....	15
1.2.1 La Biosynthèse	16
1.2.2 La Biotransformation.....	16
1.2.3 La sécrétion	18
1.3 Physiopathologie de quelques transporteurs hépatobiliaires	19
2. Les ATPases.....	21
3. Les Phospholipides flippases	22
4. ATP8B1 et la Cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 1	23
4.1 ATP8B1 : le gène	25
4.2 Les classes de mutation de ATP8B1	25
5. CFTR et la Mucoviscidose	26
5.1 La protéine CFTR.....	27
5.2 Les classes de mutation de CFTR.....	28
6. Physiopathologie de la mucoviscidose.....	29
6.1 La théorie immunitaire	29
6.2 La théorie des échanges ioniques	32
6.3 Mucoviscidose et atteinte hépatique.....	33
7. Les interactions connues de CFTR	34
7.1 CFTR et les protéines chaperonnes	35
7.2 CFTR et les canaux chlore	35
7.3 CFTR et les canaux ioniques	36

7.4 CFTR et les protéines à domaines PDZ	36
7.5 Les autres interactions connues de CFTR.....	38
8. Etat des connaissances et base de travail	40
II- Matériel et Méthodes	42
1. Lignées cellulaires utilisées.....	42
2. Conditions de culture des cellules.....	43
3. Extraction d'ARN	44
4. Polymerase Chain Reaction et Reverse Transcription.....	44
5. Extraction de protéines totales	46
6. Western Blot.....	46
7. Immunoprécipitation	48
8. Immunofluorescence.....	48
9. Efflux d'Iode.....	49
10. Transfection des cellules Byler par le plasmide pEGFP-ATP8B1	50
11. Analyse in Silico	50
III- Résultats	54
1. Expression des gènes CFTR et ATP8B1	54
1.1 Synthèse d'ARN messenger dans les cellules productrices.....	54
1.2 Synthèse protéique dans les cellules productrices	57
1.3 Immunofluorescence et localisation subcellulaire d'ATP8B1 et CFTR	62
2. Analyse in silico	65
2.1 Alignement des séquences protéiques de la famille ATP8B chez <i>Homo sapiens</i>	66
2.2 Alignement de séquences protéiques ATP8B1 inter espèces	71
2.3 Hydrophatie générale et domaines transmembranaires d'ATP8B1	74
2.4 Construction de la représentation 2D d'ATP8B1.....	75
2.5 Domaines transmembranaires et site ATPase	79
2.6 Domaines de phosphorylation	80
2.7 Myristoylation	81
2.8 Liaisons aux récepteurs nucléaires.....	83
2.9 Mutations et domaines transmembranaires	85
2.10 Maturation proposée au niveau du site de clivage G308 d'ATP8B1	85
2.11 Construction d'un modèle 3D partiel d'ATP8B1	86
2.12 Analyse prédictive de l'interactome d'ATP8B1	90

3 Mise en évidence de l'activité physiologique de CFTR.....	99
3.1 Mesure de l'efflux d'iode pour la lignée HT-29	99
3.2 Mesure de l'efflux d'iode pour la lignée Mz-ChA-2.....	100
3.3 Mesure de l'efflux d'iode pour la lignée HTCR	101
3.4 Mesure de l'efflux d'iode pour la lignée Bric.....	102
3.5 Mesure de l'efflux d'iode pour la lignée Byler	102
IV- Discussion.....	106
V-Conclusion.....	115
Perspectives.....	119
Table des Illustrations	120
Table des Tableaux	122
Bibliographie.....	123
Curriculum Vitae.....	136

Abréviations utilisées

4 α PDD	:	4 α - phorbol 12,13-didecanoate
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	:	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ARN	:	Acide Ribonucléique
ASBT	:	Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter
ASL	:	Airway Surface Liquid
ATP	:	Adénosine TriPhosphate
ATPases de type ABC	:	ATPases de type ATP Binding Cassette
BRIC	:	Benign Recurrent Intrahepatic Cholestasis
BSA	:	Albumine de serum bovin
CaCC	:	Canal Chlore Calcium-Dependant
CANX	:	Calnexine
CF	:	Cystic Fibrosis/ Fibrose Kystique / Mucoviscidose
CFTR	:	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
COGs	:	Clusters of Orthologous Groups
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	:	desoxyNucleotide TriPhosphate
EBP50	:	Ezrin-radixin-moesin Binding Phosphoprotein of 50 kDa
ELM	:	Eukaryotic Linear Motif
ENaC	:	Epithelial Sodium Channel
FXR	:	Farnesoid X Receptor ou NR1H4
GAPDH	:	GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase
inh-172	:	Inhibiteur-172, spécifique à CFTR
kDa	:	kiloDalton
EGFP	:	Enhanced Green Fluorescent Protein

LPS	:	lipopolysaccharide
MDR2/MDR3	:	MultiDrug Resistant 2 ou 3
MEM	:	Minimum Essential Media
MPR	:	Mammalian Phosphorylation Ressource
NBDs	:	Nucleotide Binding Domains
NF κ B	:	Nuclear Factor kappaB
NHERF	:	Na ⁺ -H ⁺ Exchanger Regulatory Factor (PDZK1)
NRBox	:	Nuclear Receptor Box
NTCP	:	Na ⁺ /Taurocholate Cotransporting Polypeptide
OATP	:	Organic Anion Transporting Polypeptide
ORCC	:	Outwardly Rectifying Chloride Channel
PBS	:	Phosphate buffered saline
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PDZ	:	Domaine d'interaction protéique (identifié Psd-95, Dlg et Z01)
PFIC	:	Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis
PKA/PKC	:	Protéine Kinase A / Protéine Kinase C
PMA	:	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
RE	:	Réticulum Endoplasmique
SHP	:	Small Heterodimer Protein
STAT5	:	Signal Transducers and Activators of Transcription type 5
siRNA	:	Small Interfering RNA
SNARE	:	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein Attachment REceptor
TMD1/ TMD2	:	Domaine TransMembranaire 1 ou 2
VRAC	:	Volume-Regulated Chloride Channels
γ -GT	:	gamma Glutamyl-Transférase

Remerciements

Je souhaite en premier lieu remercier le Pr Nour-Eddine Lomri pour m'avoir accueilli et de m'avoir confié ce sujet motivant et passionnant durant les 3 dernières années et demi. Je souhaite également le remercier pour sa présence et ses conseils nombreux durant cette période ainsi que la confiance qu'il a su porter en moi depuis plusieurs années. Je pense tout particulièrement à l'occasion qu'il m'a offert en deuxième année universitaire de faire un stage expérimental au sein de l'Université de Californie à San Francisco dont il revenait et qui m'a donné la passion de l'étude de la biologie Moléculaire.

Je souhaite également remercier le Dr Yves Berthiaume pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire à Montréal. Son expertise sur le canal CFTR et la pathologie de la fibrose kystique ont été pour moi d'un grand secours dans le cadre de ce travail. Je tiens à le remercier pour toutes ses remarques qui m'ont toujours stimulé et permis d'avancer dans ce sujet multidisciplinaire.

Mes remerciements vont également en direction des membres du Jury qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier également Katia Droniou, du Consulat de France au Québec pour son aide et pour le financement que j'ai pu obtenir lors de mon séjour au Québec et pour toute l'aide logistique qu'elle a su me donner dans le cadre de ce projet d'étude

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de l'ensemble des personnes des deux laboratoires avec qui j'ai pu interagir durant les dernières années. Je pense à Emilie Boncoeur, à Claire Dunois-Lardé, à Valérie Tardif, à Chantal Massé, à Céline Bergeron. Une pensée particulière va en direction d'André Dagenais, le passionné d'ENaC, pour les longues discussions que nous avons pu avoir dans le laboratoire sur nos sujets de recherche.

Enfin, je voudrais remercier le Pr Hulen qui a joué le rôle de mentor pour moi durant mes séjours en France, sachant comment me montrer les forces et faiblesses de mes études et comment réaliser une analyse toujours plus fine des résultats obtenus. Je sais maintenant qu'il faut toujours prendre tous les résultats et réfléchir à l'ensemble des présentations possibles.

Je remercie ma mère pour son amour et tout le soutien qu'elle m'a offert durant l'ensemble de ma scolarité.

Je souhaite enfin remercier ma femme pour sa présence, son soutien et sa patience durant la période de ce travail.

Enfin, je souhaite dédier cette thèse à mes grands parents, disparus trop tôt pour voir ce travail achevé ainsi qu'à ma fille, Gabrielle, qui elle n'a pu en voir que les derniers jours.

I-Introduction

1-Le foie

1.1 Notions d'anatomie hépatique

Le foie est un organe de 1400 à 1600 g dont l'environnement est présenté ci-dessous. Cet organe est rougeâtre et riche en sang, il est complètement enveloppé par le péritoine viscéral et se situe sous la coupole diaphragmatique droite. Le foie est divisé en deux lobes, droit et gauche, par le ligament falciforme. Le lobe gauche peut éventuellement être divisé en 3 parties en fonction de ses caractéristiques superficielles ; ainsi, le lobe gauche serait composé du lobe caudé, en position postérieure, et du lobe carré situé sous la partie restante du lobe gauche (Figure 1). Le foie a la capacité de se régénérer à la suite d'une hépatectomie au maximum de 70% de l'organe. La légende de Prométhée, dans la mythologie grecque, fait référence à cette capacité de régénération. En effet, selon cette légende, Prométhée, en raison d'un conflit avec Zeus, fut enchaîné au Mont Caucase pour y avoir chaque jour le foie dévoré par un aigle. Il semblerait donc que cette propriété soit connue depuis l'Antiquité au moins.

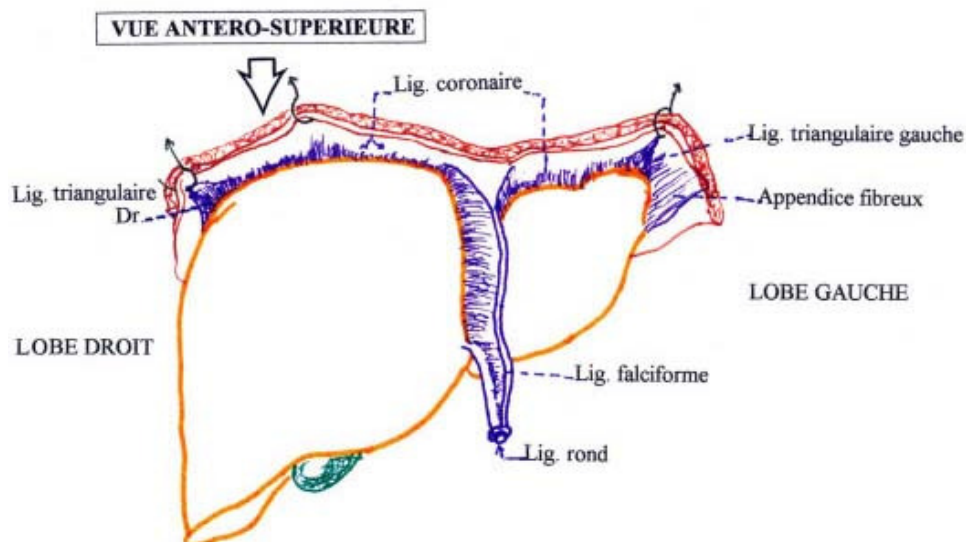


Figure 1: Anatomie générale du foie

L'organisation anatomique du foie peut se faire de deux façons : selon l'organisation dite en lobule ou suivant l'organisation dite en acinus, une organisation plus proche des glandes exocrines. L'organisation en lobule est représentée dans la figure 2.

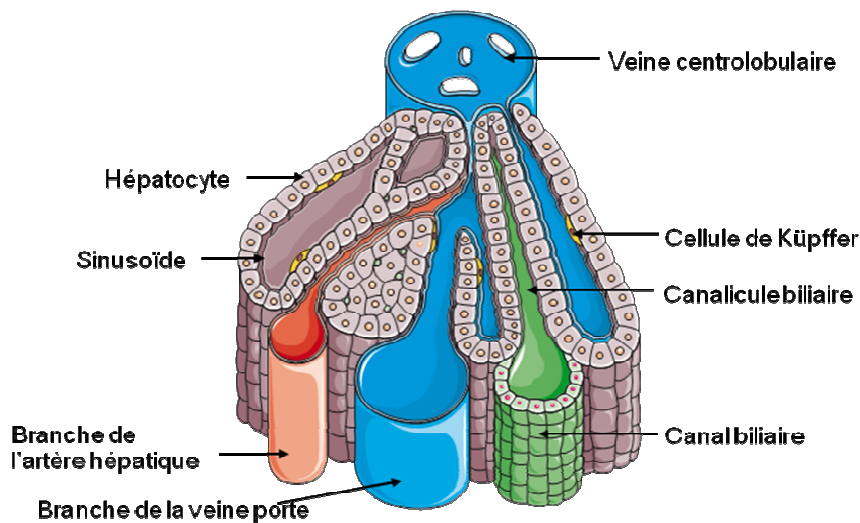


Figure 2 : Schéma d'un lobule hépatique

Au sein du lobule, le flux sanguin s'effectue à partir de la périphérie donc de la veine porte (sang chargé en nutriments provenant des viscères digestifs) et l'artère hépatique (sang riche en oxygène), vers la veine centrolobulaire selon une circulation centripète. Les veines centrolobulaires se rassemblent pour former les veines hépatiques (auparavant dénommées sus-hépatiques) qui drainent le sang désoxygéné par la veine cave inférieure vers le cœur. A l'inverse, l'efflux de la bile se fait selon une circulation centrifuge, du centre du lobule vers le canal biliaire en périphérie par l'intermédiaire des canalicules biliaires. Les canalicules biliaires n'ont pas de paroi propre puisqu'ils sont formés par les membranes de deux hépatocytes. Ces canalicules se regroupent ensuite en ductules, premier élément de l'arbre biliaire dans le foie.

Les hépatocytes sont les cellules majoritaires du foie (60% des cellules et 85% du volume). Le volume moyen de l'une de ces cellules est de $11\,000\ \mu\text{m}^3$. Un foie sain contient une population d'hépatocytes d'environ 100 milliards de cellules. Les hépatocytes sont des cellules polyédriques d'un diamètre de 200 à 300 microns. Ils renferment de nombreux

réticulums endoplasmiques rugueux et lisses, lieux de synthèse protéique, complexes golgiens, peroxyosomes et mitochondries. Ces différents organites sont requis pour les fonctions essentielles du foie. Les membranes des hépatocytes sont en contact avec l'espace de Disse, avec un autre hépatocyte (membrane baso-latérale) ou avec un canalicule biliaire (membrane canaliculaire). L'espace de Disse est l'espace séparant les hépatocytes des sinusoides bordées par des cellules endothéliales. Cet espace est le lieu de stockage de la vitamine A (cellules de Ito) et de synthèse de la matrice extracellulaire hépatique. Il contient également des macrophages, les cellules de Küpffer, dont le rôle est d'épurer par phagocytose le sang de toxines, de cellules sanguines usées ou de toutes particules étrangères présentes ayant passées la barrière intestinale avant de gagner la circulation générale. Les cellules de Küpffer représentent de 5 à 10% du poids hépatique et 40% des cellules du foie.

L'organisation du foie peut également se faire en unité appelée acinus. Dans cette structuration, l'acinus représente un triangle ayant pour sommet une veine porte et pour base une ligne virtuelle rassemblant deux veines centrolobulaires. Cette configuration de l'espace hépatique correspond à la description habituelle des glandes exocrines centrées sur le canal sécréteur.

1.2 Notions de physiologie hépatique

Les hépatocytes assurent environ 500 processus métaboliques complexes identifiés.

Les trois principales fonctions hépatiques sont :

- La biosynthèse (cholestérol, acides biliaires, bilirubine, néoglycogénèse, ...)
- La biotransformation (action de P450, conjugaison, ...)
- La sécrétion (acides biliaires, bilirubine conjuguée, ...)

1.2.1 La Biosynthèse

Le foie est responsable de la formation du cholestérol à partir de l'Acetyl-CoA, provenant des acides gras transformés par β -oxydation.

Le foie est impliqué dans la synthèse de molécules telles que la glutamine, permettant le transport de l'ammoniac, sans toxicité, mais aussi dans la conversion de cette dernière molécule en urée. Dans le cas où cette fonction ne peut plus être assurée (cirrhose (maladie chronique résultant de toute lésion des hépatocytes provoquant un défaut d'architecture du foie) ou hépatite (inflammation chronique ou aigue du foie), l'ammoniac s'accumulera dans le sang.

Le foie permet également la synthèse des acides aminés non essentiels (transamination, cependant cette fonction est minime) ainsi que de la plupart des protéines plasmatiques.

Il s'agit d'un organe primordial dans la coagulation, en effet, il permet d'une part la synthèse de certains facteurs de coagulation plasmatiques comme la prothrombine ou le fibrinogène, et d'autre part, favorise, grâce aux acides biliaires, l'absorption de vitamine K, nécessaire à la formation des facteurs de coagulation vitamine K dépendants.

Le foie est également responsable dans le cadre du métabolisme des lipides de la formation des lipoprotéines permettant le transport des acides gras, des lipides et du cholestérol.

Le foie est de plus l'organe siège de la formation du glycogène, forme de stockage énergétique de l'organisme.

1.2.2 La Biotransformation

La fabrication d'énergie se fait par l'intermédiaire du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Il a aussi pour rôle le métabolisme des triglycérides. Le foie possède de plus un rôle important de stockage de quelques vitamines (A, D, B₁₂ et K) ainsi que du Fer,

sous forme de ferritine. Le foie peut ainsi emmagasiner des réserves de vitamines B₁₂ pour 5 ans et de vitamines A pour 1 à 2 ans.

Le foie joue un rôle dans le métabolisme des glucides (glycogénolyse) ainsi que dans celui des lipides. Les chylomicrons d'origine alimentaire y seront convertis en cholestérol. La source et l'excrétion du cholestérol au niveau de l'organisme sont assurées par le foie. Enfin, à partir du cholestérol, la néoformation des acides biliaires primaires peut également être réalisée.

Il a également pour fonction de biotransformer certaines hormones, médicaments et toxines en substances inactives puis polaires. La barrière hépatique est très difficile à passer lors de la distribution du médicament car son principe actif peut subir une métabolisation hépatique avant son passage dans la circulation systémique. Il s'agit de l'effet du premier passage hépatique.

La fonction de détoxification du foie permet une transformation des molécules endogènes ou de certains xénobiotiques, souvent liposolubles, en molécules inactives. Elle intervient suivant deux grandes phases. Dans un premier temps, la substance subit une oxydation, une réduction ou une hydrolyse, par exemple par l'intermédiaire du cytochrome P-450 qui la rend polaire ou par l'action d'autres flavoprotéines monooxygénases. Puis la substance pourra être conjuguée à une variété d'agents tels que glutathion ou acide glucuronique afin d'augmenter son hydrosolubilité.

Le foie est également le siège de la biotransformation du cholestérol en acides biliaires primaires. La voie dite neutre de synthèse des acides biliaires est la suivante. Le cholestérol, par l'intermédiaire de CYP7A est transformé en 7 α -OH-Cholestérol. Puis dans le réticulum endoplasmique, une stéroïde oxydoréductase permet la production de 3-oxo 7 α hydroxyl 4 cholestène. Toujours dans le réticulum, ce produit sera alors métabolisé par CYP8B afin de former l'acide cholique ou par CYP27 pour l'acide chénodesoxycholique.

Les acides biliaires tertiaires proviennent d'une sulfoconjugaison ou d'une réoxydation au niveau du foie d'un acide biliaire secondaire (par exemple l'acide 7-oxo-lithocholique en acide ursodéoxycholique). Cet acide biliaire tertiaire favorise la solubilisation des phospholipides en micelle. Ainsi, l'acide ursodéoxycholique est utilisé en

thérapeutique pour dissoudre les calculs cholestéroliques (*Jacquemin et al. 1997; Lazaridis et al. 2001; Paumgartner and Beuers 2002*).

1.2.3 La sécrétion

Le foie permet également la sécrétion de la bile. Cette sécrétion est continue et la bile produite est transmise par les canaux biliaires jusqu'à la vésicule biliaire où elle est stockée. L'ingestion d'un repas riche en matières grasses va permettre de stimuler la libération de la bile à partir de la vésicule biliaire afin que les acides biliaires puissent solubiliser les graisses présentes dans le bol alimentaire. Les acides biliaires ont, en effet, comme propriété de posséder un fort pouvoir détergent. Cette sécrétion biliaire est régulée par des facteurs nerveux et hormonaux.

La bile, isotonique au plasma, se compose d'acides biliaires, de cholestérol, de phospholipides (essentiellement la lécithine), de pigments biliaires ainsi que de bilirubine conjuguée (produit de la dégradation de l'hémoglobine des érythrocytes), de protéines ainsi que des molécules transformées dans le foie.

Le métabolisme de la bilirubine est assuré par le foie. La bilirubine formée par la dégradation de l'hème circule dans le sang jusqu'à sa captation par les hépatocytes. Ce processus n'est pas encore clairement identifié. Une fois à l'intérieur de l'hépatocyte, la bilirubine sera diglucuroconjuguée avec l'acide glucuronique dans le réticulum endoplasmique. Une fois la bilirubine conjuguée, elle devient hydrosoluble et est alors transportée par MRP2 (anciennement cMOAT) dans la lumière canaliculaire.

La bilirubine conjuguée est ensuite transformée par les enzymes bactériennes au niveau de l'intestin en urobilinogènes qui seront éliminés dans les fécès (responsable de la coloration marron) et une faible fraction est réabsorbée par les intestins et éliminée dans les urines (responsable de la coloration jaune).

Les acides biliaires représentent 65% de la composition de la bile et se divisent en trois grandes catégories (acides biliaires primaires, secondaires et tertiaires). Le pool constant d'acides biliaires représente 6 mmol.

Les acides biliaires primaires sont synthétisés par le foie à partir du cholestérol par les enzymes de la famille du cytochrome P450 (CYP7A, CYP27 et CYP8B) sous deux formes : acide cholique et acide chénodésoxycholique.

Les acides biliaires secondaires proviennent d'une transformation des acides biliaires primaires assurée par les bactéries intestinales, par une déhydroxylation, afin de former respectivement les acides déoxycholique et lithocholique. Les acides biliaires primaires, secondaires et tertiaires sont transportés dans la lumière canaliculaire par BSEP (Bile Salt Export Pump).

1.3 Physiopathologie de quelques transporteurs hépatobiliaires

Au niveau de l'hépatocyte, la formation de la bile et le transport des acides biliaires sont assurés par différentes protéines (*Lomri et al. 1996*). Nous avons vu que les acides biliaires pouvaient être synthétisés au niveau du foie à partir de cholestérol. Les acides biliaires primaires et secondaires sont réabsorbés à 90% au niveau de l'iléon, étape du cycle entérohépatique, et peuvent donc être recaptés au niveau des hépatocytes par NTCP, le Na⁺ Taurocholate Co-Transporting Polypeptide, qui cotransporte du sodium lors de la réabsorption des acides biliaires dans les hépatocytes ou par OATP, Organic Anion Transporting Polypeptide indépendant de ce transport de sodium. Les acides biliaires sont alors transportés de l'intérieur des hépatocytes vers la lumière canaliculaire par le transporteur BSEP (Bile Salt Export Pump) (*Cai et al. 2001; Thompson and Strautnieks 2001; Suchy and Ananthanarayanan 2006*). Les acides biliaires, dont l'action détergente est importante, sont entourés de phospholipides formant ainsi des micelles au niveau du canalicule. Ces phospholipides sont transportés par mdr3 chez la souris et MDR2 chez l'Homme (*Hofmann 2007*), (*Oude Elferink and Groen 1999*). Lorsque MDR2 ou BSEP sont mutés et que l'une de ces protéines n'est plus active, un syndrome de cholestase intra-hépatique familiale progressive se développe (*Shneider 1999; Cavestro et al. 2002*).

La protéine MRP2 (*Beuers et al. 2001*), identifiée en 1993 et localisée également au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes, permet le transport du glutathion ainsi que de la bilirubine conjuguée. Le syndrome de Dubin-Johnson (*Jansen and Muller*

2000; Ferenci et al. 2002) est provoqué par un défaut de ce transporteur et se traduit par un ictère d'intensité modérée mais fluctuant et pouvant être asymptomatique. Un ictère, ou jaunisse, est provoquée par une quantité de bilirubine circulante anormalement élevée dans l'organisme.

De plus, lorsque le transporteur des acides biliaires BSEP, dont le gène a été identifié en 1987 par Ling-Vancouver, ne peut plus assurer sa fonction, les acides biliaires présents dans les hépatocytes sont retransmis dans la circulation, ce qui provoque des lésions lobulaires. Cette pathologie, la cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 2 (PFIC2), se traduit par un prurit (démangeaison) intense (Strautnieks et al. 1997; Strautnieks et al. 1998; Cai et al. 2001; Taylor 2003; van Mil et al. 2004).

Lorsque le transporteur des phospholipides, MDR2, n'est pas correctement exprimé au niveau de la membrane canaliculaire, les acides biliaires présents vont déstabiliser les membranes des hépatocytes et provoquer des lésions majeures du foie. Le taux de gamma glutamyl-transférase (γ -GT), normalement localisée entre les deux feuillettes de la membrane canaliculaire sera plus élevé que la normale dans le sérum en raison de sa libération suite à la dégradation des membranes. Elle est souvent utilisée comme étant un marqueur de souffrance hépatique (Cabrera-Abreu and Green 2002). On parlera dans ce cas d'une cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 3 (PFIC3) (Deleuze et al. 1996; Kullak-Ublick and Meier 2000; Hofmann 2007).

Il existe également des formes de cholestases hépatiques acquises, donc non héréditaires (Poupon et al. 2000). Ces cholestases sont dites extra-hépatiques dans le cas d'une obstruction des voies biliaires principales (par exemple un calcul vésiculaire) ou intra-hépatique dans le cas d'une stase biliaire. Dans tous les cas, la cholestase se traduit par une accumulation dans le sang de substances normalement excrétées dans la bile (Whittington et al. 1994; Trauner et al. 1998; Carlton et al. 2004; Zollner and Trauner 2006).

2. Les ATPases

De nombreuses pompes à protons peuvent être énergisées par la lumière, le pyrophosphate ou l'ATP. Les pompes H^+ dépendante de l'ATP correspondent à la famille des ATPases (*Pedersen 2005*).

Les ATPases de type ABC (ATP Binding Cassette, protéines ABC ou transporteurs ABC) représentent la famille la plus répandue des ATPases (*Dean and Annilo 2005*). Elles sont exprimées de façon constitutive, des bactéries aux eucaryotes. Chez l'Homme, près de 50 ATPases de type ABC ont pu être identifiées, chacune d'elle semblant jouer un rôle important dans le tissu où elle est exprimée. Ces protéines contiennent souvent un ou plusieurs domaines NBDs (Nucleotide Binding Domains) permettant une liaison à l'ATP ou à un cation divalent. La protéine CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, se distingue au sein de la famille des protéines ABC par l'existence d'un domaine R, régulateur que les autres protéines ne possèdent pas (*Sheppard and Welsh 1999*). Parmi cette famille existe également les protéines MDR, Multi Drug Resistance, qui n'ont pas une expression ubiquitaire mais qui sont exprimées en réponse à l'entrée dans la cellule d'un stimulus extérieur.

Les ATPases de type F sont des ATP synthétases (*Pedersen 2007*), exprimées au niveau des mitochondries ou des chloroplastes. Elles utilisent un gradient de protons afin de fournir l'énergie nécessaire à la néosynthèse d'ATP à partir d'ADP et d'un phosphate minérale.

Les ATPases de type V (*Pedersen 2007*) permettent de créer un gradient de protons par l'intermédiaire de l'hydrolyse de l'ATP. Elles ne sont exprimées que chez les eucaryotes. Elles sont impliquées dans le maintien du pH acide au sein de vacuoles chez les plantes et les levures, ou encore au sein de l'endosome, du lysosome ou des vésicules de l'appareil de Golgi.

Les ATPases de type P (*Apell 2004; Pedersen 2007*) constituent un groupe de pompes H^+ dépendantes de l'ATP pouvant être constituées d'une à 13 sous-unités (F_0F_1 des

mitochondries) (*Axelsen and Palmgren 1998*). Les ATPases de type P sont exprimées chez les eucaryotes uniquement.

La famille IV des ATPases de type P, dont ATP8B1 est membre, a pu être caractérisée comme transporteur de phospholipide à partir de la séquence d'une ATPase de *Bos Taurus* en 1994 (*Auland et al. 1994*). Or, le transport de phospholipide, qui a été mis en évidence au sein de la famille des ATPases de type P4, n'a toujours pas été bien caractérisé.

3. Les Phospholipides flippases

Le terme de flippase, utilisé pour la première fois par Mark Bretscher en 1974, a permis de caractériser les transporteurs de lipides permettant d'équilibrer les lipides nouvellement synthétisés dans les membranes comme celles du réticulum endoplasmique. Ce terme permet maintenant de décrire tout type de transporteurs de lipides. Le terme de flippase permet donc de décrire le transport de lipides vers la face cytoplasmique de la membrane, par opposition aux floppases qui agissent en sens inverse.

Les flippases peuvent se caractériser en fonction de leur orientation, de leur substrat et de la nécessité de la présence de l'ATP. Deux grandes familles de protéines sont des phospholipides flippases. Il s'agit des transporteurs ABC et des P₄-ATPases.

Les protéines de la famille ABC catalysent le transport de façon ATP-dépendante de différentes molécules (*Graham 2004; Oswald et al. 2006*). Ces protéines existent sous de nombreuses formes chez les eucaryotes et les procaryotes. Cette famille se divise en différentes sous classes. La famille des ABCA protéines est impliquée dans le transport des stérols et des lipides. La famille des ABCB protéines, qui inclut les protéines de la famille MDR, a été initialement identifiée comme des transporteurs de xénobiotiques. La famille des ABCG protéines enfin a été caractérisée comme des transporteurs de phosphatidylsérine ou de phosphatidylcholine. Enfin des protéines de la famille ABC ont pu être identifiées chez la levure, dont certaines remplissent un rôle de transporteur de lipides.

Les protéines de la famille P₄ ATPase ont pour la première fois été identifiées par Seigneuret et Devaux (*Seigneuret and Devaux 1984*). Depuis, les travaux sur cette famille de protéines ont permis de montrer un transport spécifique de la phosphatidylsérine ainsi qu'une sensibilité à la présence des ions Ca²⁺ entre autre (*Apell 2004*). Cette famille de protéine comporte environ 100 membres dont l'ATPase II bovine ayant permis l'identification de l'activité de transport de phosphatidylsérine. Les sous-classes I et III de P₄ ATPase comportent cette ATPase II bovine, les protéines de la famille ATP8A et ATP8B ainsi Drs2p, Dnf1p et Dnf2p (*Catty et al. 1997*). Récemment, la localisation de Drs2p a été identifiée au niveau du trans-Golgi et de façon très limitée au niveau de la membrane plasmique.

4. ATP8B1 et la Cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 1

ATP8B1 (FIC1) est une protéine de 1251 acides aminés dont l'activité semble être celle d'une flippase de la phosphatidylsérine (*Ujhazy et al. 2001*). Des mutations au niveau de cette protéine sont responsables de deux pathologies monogéniques autosomales récessives (*Bull et al. 1998; Rebhandl et al. 2000*), l'une progressive PFIC1 (Progressive Familial Intra-hepatic Cholestasis type 1) (*Ballow et al. 1973; Knisely 2004*) et l'autre récurrente mais transitoire BRIC (Benign Recurrent Intra-hepatic cholestasis) (*van Mil et al. 2001*). L'expression d'ATP8B1 a été localisée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales du colon, du pancréas, du poumon et des cholangiocytes (*Eppens et al. 2001; Stieger 2001*). De plus, chez les patients PFIC1, une absence de sécrétion des acides biliaires est caractéristique bien que les voies intra et extra-hépatiques soient normales (*Alonso et al. 1994; Knisely 2000*). D'autres manifestations cliniques telles qu'un ictère (taux anormal de bilirubine dans le sang), un prurit (démangeaison) important, une anomalie de la sudation ainsi qu'une insuffisance pancréatique sont des signes cliniques de la pathologie. Les patients PFIC1 ont également une stéatorrhée (quantité anormale de lipides dans les selles) liée à un défaut d'absorption des protéines liposolubles et des vitamines A, D, E et K. Le tableau clinique se complète souvent par une hépatosplénomégalie (augmentation du volume du foie et de la rate) et parfois par une augmentation des transaminases, ce qui traduit une fibrose hépatique et donc la formation de tissu cicatriciel. Enfin, comme chez les patients souffrant de PFIC2, le taux de γ -GT dans le sérum est normal.

Chez les patients PFIC1, la cholestérolémie est également normale ce qui prouve une synthèse normale du cholestérol ainsi qu'une formation correcte des acides biliaires primaires. Cependant, ces acides biliaires ne sont plus correctement transportés dans la lumière canaliculaire par BSEP, une ABC protéine. BSEP est le transporteur responsable du transport des acides biliaires des hépatocytes vers les canalicules or le niveau d'expression de ce transporteur est altéré chez les patients PFIC1. Un niveau d'expression minimal de ce transporteur, dans le cas de mutation au sein du gène *BSEP* se traduit par une cholestase intra-hépatique de type 2. L'un des points communs entre ces deux pathologies est le taux de γ -GT normal et un transport absent des acides biliaires vers le canalicule. Il n'existe aucun traitement pour cette pathologie génétique dont l'incidence mondiale est très faible (1/100 000) et que l'on retrouve essentiellement dans les populations à forte probabilité de consanguinité (Irlandais, esquimaux, rappelons ici que cette maladie a pour la première fois été identifiée en 1969 au sein de la communauté amish, lorsque 4 familles toutes descendantes de *Jacob Byler* et *Nancy Kauffman* ont décidé de traiter leurs enfants pour une forte jaunisse).

Le seul traitement (*Melter et al. 2000*) de la maladie envisageable est donc une transplantation hépatique qui permettra de rétablir la sécrétion biliaire (*Cohran and Heubi 2003*). Cependant, cette transplantation peut être faite au dépend de la qualité de vie du patient (*Lykavieris et al. 2003*). Ainsi il a été démontré que la transplantation hépatique ne permet pas de rétablir une fonctionnalité complète extra-hépatique, aggravant même les diarrhées chroniques des patients (*Bassas et al. 2003*). Ces observations ont donc permis de mettre en lumière une fonction générale d'ATP8B1 au niveau biologique. Une des fonctions proposées est la réabsorption des acides biliaires ou sa régulation par le canal ASBT (*Lykavieris et al. 2003*), (*Bull et al. 1998*), (*Hofmann 2007*), transporteur des acides biliaires et de sodium (*Knisely 2000*). Or si la transplantation hépatique permet de réintroduire un tissu avec une protéine ATP8B1 fonctionnelle au niveau hépatique, ce n'est pas le cas au niveau des intestins.

La transplantation hépatique permettrait donc de rétablir une sécrétion des acides biliaires normale mais la réabsorption au niveau des intestins ne pourrait se faire correctement, nécessitant donc une transplantation hépato-intestinale. Ces théories sont supportées par le fait que les acides biliaires induisent une sécrétion de chlore, et donc un

apport d'eau par pression osmotique (*Dharmathaphorn et al. 1989*). Plus particulièrement, l'acide deoxycholique, un acide biliaire secondaire, est responsable de l'émulsion des graisses et une étude effectuée par Mauricio et col. (*Mauricio et al. 2000*) a montré que sa présence affectait les échanges d'électrolytes au niveau du colon distal. Or, il a pour rôle une forte réabsorption de sodium par le canal ENaC (*Kunzelmann and Mall 2002*) et donc d'eau, par pression osmotique. L'implication d'un acide biliaire secondaire dans les diarrhées chroniques peut être envisagée puisque chez les patients PFIC1 la cholestérolémie de ces patients est normale, ce qui traduit la bonne synthèse des acides biliaires primaires, acide cholique et acide chénodésoxycholique.

4.1 ATP8B1 : le gène

ATP8B1 appartient à la famille des ATP8B. Cette famille chez l'Homme se compose de 5 isoformes identifiées : ATP8B1, ATP8B2a (*Harris and Arias 2003*) (locus 1q21.3), ATP8B2b (*Harris and Arias 2003*) (locus 1q21.3), ATP8B3 (*Harris and Arias 2003*) (locus 19q13.3) et ATP8B4 (locus 15q21.2). Le gène *ATP8B1* (ATPase, class I, type 8B, membre 1, classification HUGO) est porté par le chromosome 18 au locus 18q21-q22 (*Carlton et al. 1995; Arnell et al. 1997; Bull et al. 1997*). Ce gène de 85 kpb code, en 27 exons, un ARNm de 5818 bases qui produit la protéine ATP8B1 (FIC1) de 1251 acides aminés (Figure 3). *ATP8B1* a été pour la première fois identifié en 1969 (*Clayton et al. 1969*). L'incidence mondiale estimée est de 1/100 000 personnes avec une prévalence chez les populations à forte consanguinité comme les communautés amish, esquimaux et irlandaises. Le gène *ATP8B1* est exprimé dans le foie (cellules cholangiocytaires), le pancréas, les reins, le poumon et les intestins (*van Mil et al. 2004*). La fonction supposée de la protéine est la translocation de la phosphatidylsérine du feuillet externe au feuillet interne.

4.2 Les classes de mutation de ATP8B1

Les mutations d'ATP8B1 (FIC1) sont classées en deux grandes catégories. La première catégorie comporte les mutations entraînant la forme la plus grave de cholestase. Cette pathologie est la

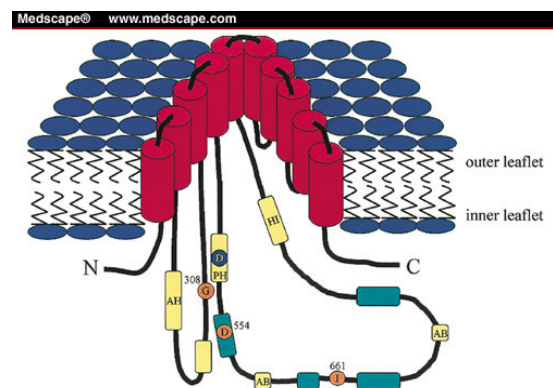


Figure 3 : Représentation schématique de la protéine ATP8B1

cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 1. De nombreuses mutations, plus de 40, provoquant cette pathologie ont été répertoriées (*Klomp et al. 2004*).

Mutations provoquant une large délétion	Mutations provoquant un changement de cadre de lecture
Ex1-Ex13del, del645-699	N205fs, K672fs, K709fs, P792fs, F853fs, R867fs, N958fs R1014fs, Q1023fs, L1047fs, A1208fs
Mutations Ponctuelles	
L127P, L288S, G308V, S403Y, R412P, T456M, Y500H, F529del, H535L, D554N, R602X, I661T, E665X, G733R, F853S, G892R, R930X, R952X G1040R	

Tableau 1 : Mutations provoquant une cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 1 (PFIC1).

La seconde catégorie de mutations présente au niveau de la protéine ATP8B1 regroupe l'ensemble des mutations ayant pour conséquence deux pathologies proches : une forme atténuée de cholestase intra-hépatique définie sous le terme de cholestase intra-hépatique récurrente bénigne qui est épisodique ainsi que la cholestase intra-hépatique de grossesse (*Painter et al. 2005*).

Mutations provoquant une large délétion	Mutations provoquant un changement de cadre de lecture
	G1241fs (délétion d'une guanine)
Mutations Ponctuelles	
D70N, G308D, I344F, S453Y, D454G, R600W, R600Q, R628W, I661T, I694T, 795delGNR, G892R, R952X, R1164X	

Tableau 2 : Mutations provoquant une cholestase intra-hépatique récurrente bénigne (BRIC).

5. CFTR et la Mucoviscidose

La mucoviscidose, ou fibrose kystique, est une maladie monogénique autosomale récessive due à de très nombreuses mutations différentes du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) de 250 kb (27 exons). Celui-ci est localisé sur le chromosome 7 en position 7q31.2, et code pour un ARNm de 6.5Kb et pour la protéine CFTR de 1480 acides aminés. CFTR a été identifié par clonage indirect en 1989 (*Riordan et al.*

1989). La mucoviscidose (Davis 1991; Davis 2006) touche entre 1/2500 et 1/3200 naissances dans les populations d'origine caucasienne, ce qui en fait la maladie génétique la plus répandue dans ces populations (Turcios 2005). Cette protéine est exprimée dans les tissus épithéliaux et l'une de ses fonctions identifiées est la régulation de la sécrétion de chlore par un processus dépendant de l'AMP cyclique (AMPc). L'un des signes cliniques de la mucoviscidose qui a été identifié très tôt, dès le Moyen-âge, est une anomalie de la sudation qui résulte en une sueur salée, caractéristique de cette maladie (Quinton 1999). Cette spécificité, connue depuis 1606 par un professeur de Médecine, Alonso y de los Ruyes de Fonteca, fut comprise plus tard et expliquée par un trouble de la réabsorption des ions Na^+ par le canal ENaC dont l'activité est plus importante en absence de CFTR fonctionnel. La mucoviscidose est une maladie multi-organe qui touche plus spécifiquement le pancréas, le poumon, le foie (Feranchak 2004), le tractus intestinal, le tractus reproductif (tout particulièrement masculin) ainsi que les glandes salivaires (Quinton 1999). Bien que plus de 1500 mutations soient connues pour CFTR, peu de liens entre une mutation spécifique et un phénotype particulier ont pu être mis en évidence jusqu'à aujourd'hui. Toutefois, la mutation ΔF508 (mutation qui est présente chez 70% des patients CF (CF : Cystic Fibrosis)) provoque, lorsqu'elle est présente sous forme homozygote, une atteinte du pancréas (Turcios 2005) dans 99% des cas, d'où la dénomination « *fibrose kystique du pancréas* » de la maladie. Cette atteinte a rapidement permis aux chercheurs de s'intéresser à l'altération ou à l'augmentation de la production des sécrétions de l'organisme. La physiopathologie pulmonaire semble beaucoup plus complexe car aucun lien entre génotype et phénotype n'a pu être clairement mis en évidence.

5.1 La protéine CFTR

Le gène CFTR (McCarthy and Harris 2005), code pour une protéine membranaire, une ATPase de la famille des ATP Binding Cassette transporteurs, dont la structure (Figure 4) comporte une répétition de

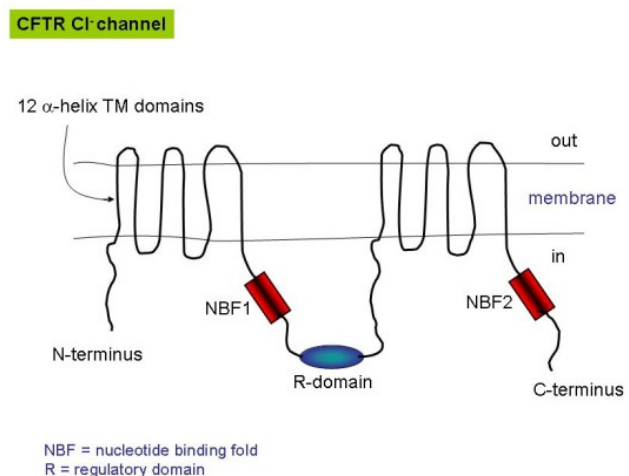


Figure 4 : Représentation schématique de la protéine CFTR

six domaines transmembranaires en N-terminal et en C-terminal suivis par des domaines de liaisons NBF ou NBD (Nucleotide Binding Fold ou Domain). Entre ces deux répétitions se trouve un domaine de régulation R comportant de nombreux sites de phosphorylation. CFTR est un canal chlore dont l'activité dépend de l'AMPc. La phosphorylation par la PKA (Protéine Kinase A) du domaine R de *CFTR* (Kalin et al. 1999) permet l'activation du canal. Tant que la phosphorylation du domaine R n'est que partielle, le domaine NBD1 est le seul où l'hydrolyse de l'ATP peut se faire, ce qui se traduit par de courtes ouvertures du canal CFTR. Lorsque le domaine R est complètement phosphorylé, la liaison à l'ATP et son hydrolyse se font au niveau de NBD1 mais aussi de NBD2 (Bompadre and Hwang 2007). Cette hydrolyse au niveau des deux domaines provoque une stabilisation du canal en position ouverte. Le cycle de fermetures et d'ouvertures rapides du canal interviendra de nouveau lorsque l'hydrolyse de l'ATP au niveau de NBD2 aura été effectuée. La fermeture du canal aura lieu lorsque le domaine R aura été déphosphorylé par des phosphatases. Dès lors, afin de rouvrir le canal, une nouvelle phosphorylation du domaine R par la PKA sera nécessaire pour assurer le retour au cycle d'ouvertures-fermetures rapides. Un second phénomène semble également provoquer l'ouverture du canal CFTR par la liaison simple de l'ATP, sans hydrolyse, au domaine NBD2 ne nécessitant pas la présence de magnésium (Aleksandrov et al. 2000; Hanrahan and Wioland 2004). Ce second processus serait ainsi moins coûteux en énergie pour la cellule.

5.2 Les classes de mutation de CFTR

Les mutations de CFTR ont été classées en 6 grandes catégories en fonction des conséquences que cela entraîne au niveau de la protéine (Vankeerberghen et al. 2002) représentée par la Figure 5 (Romey 2006). La première classe de mutation est celle qui regroupe les mutations non sens ou changeant le cadre de lecture. Ces

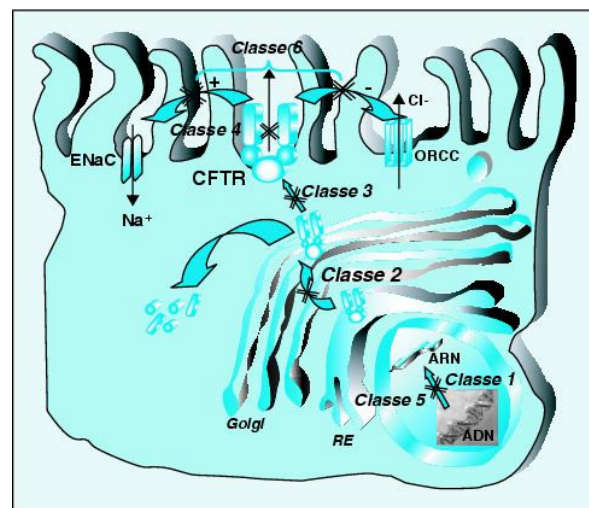


Figure 5 : Classification des mutations de CFTR

mutations provoquent respectivement une protéine tronquée ou une protéine mal

structurée qui sont dégradées rapidement par le protéasome. La deuxième classe de mutation est celle regroupant le plus grand nombre de mutations et qui correspond à une maturation incorrecte de la protéine. La mutation $\Delta F508$ (Mall et al. 2004; Kreda et al. 2005), la plus fréquente des mutations de CFTR, fait partie de cette classe. Une dégradation rapide interviendra alors au niveau du réticulum endoplasmique. Les mutations de classe III sont les mutations affectant la phosphorylation du domaine R de CFTR. Lorsque la phosphorylation de ce domaine est perturbée, l'ouverture, et donc le courant chlore associé, est fortement diminué. Les mutations de classe IV sont les mutations affectant les acides aminés au sein du pore de CFTR. Les mutations de classe V sont celles présentes au sein du gène *CFTR* mais dont le phénotype implique d'autres maladies comme une hypertrypsiniémie ou encore une pancréatite aiguë. Ce type de mutation provoque souvent une diminution de la quantité de protéines CFTR matures. Ce phénotype ne s'exprime donc que dans les tissus qui ont un besoin important en CFTR. Enfin, la dernière classe de mutation (classe VI) regroupe les mutations qui ont un effet sur les protéines régulées par CFTR.

6. Physiopathologie de la mucoviscidose

Deux grands courants de pensées existent au sein de la communauté scientifique afin d'expliquer la physiopathologie de la mucoviscidose ou fibrose kystique.

6.1 La théorie immunitaire

Le premier courant de pensée considère préférentiellement l'implication de l'épaisseur du mucus de la barrière pulmonaire. Cette théorie est confirmée par des observations cliniques au sein de différents organes comme le pancréas, les voies aériennes, le tractus gastro-intestinal ou encore l'appareil reproducteur (masculin essentiellement). Ainsi, au niveau du pancréas, une déstructuration progressive de l'organisation en acinus de l'organe, suite à une réduction des conduits pancréatiques, s'installe lentement et provoque une insuffisance pancréatique. Deux phénomènes liés semblent pouvoir expliquer la physiopathologie de la mucoviscidose au niveau du poumon.

Le premier consiste en une modification de la sécrétion de mucus, le second est une infection bactérienne et une inflammation du tissu. Dans la première vision, la déficience en CFTR provoque une anomalie de la sécrétion en ions chlore et surtout une réabsorption suractive des ions Na^+ par le canal sodium épithélial amiloride sensible (ENaC) (Smith et al.

1994), dont l'activité semble régulée par CFTR (*Kunzelmann et al. 2001*). En absence de CFTR fonctionnel, ENaC se retrouverait, selon certains spécialistes de ces deux canaux, de façon plus importante à la membrane. Ainsi, cette réabsorption excessive provoque une diminution de la quantité d'eau disponible pour le mucus pulmonaire (ASF). Ce dernier devient donc moins mobile et empêche le mouvement du liquide péri-ciliaire. Afin que le mucus présent au niveau de la barrière pulmonaire puisse pleinement jouer son rôle, deux couches, formant l'ASL (Airway Surface Liquid), doivent être présentes. Leurs caractéristiques sont les suivantes : une fine couche de mucus de 5 à 10 μm d'épaisseur doit conserver une faible viscosité afin de permettre l'absorption des particules étrangères qui seront transportées par la couche inférieure, le liquide péri-ciliaire (d'une épaisseur de 5 μm) (*Welsh 1987*), pour être expulsées ensuite par la toux. L'arrêt de ce mécanisme combiné à une sécrétion constante de mucines va avoir comme résultat la création de plaque de mucus (*Boucher 2004*). En effet, la clairance du mucus dépend de façon immédiate de l'hydratation de la surface de la muqueuse. Ce mucus visqueux (car faible en eau) entrainera la formation de régions à faible teneur en oxygène. Les faibles présences en eau et en oxygène exerceront une pression de sélection (*Randell and Boucher 2006*) qui facilitera tout particulièrement l'installation prolongée de deux souches bactériennes (*Pseudomonas Aeruginosa* (*Davis 1991*) et *Staphylococcus Aureus* (*Turcios 2005*)). Dès lors, les défenses de l'organisme, moins efficaces, provoqueront une inflammation du tissu pulmonaire sans pouvoir efficacement éliminer les bactéries présentes.

Une seconde hypothèse est que l'atteinte pulmonaire dans la mucoviscidose soit initiée par un défaut du système immunitaire inné. Ainsi, le défaut de sécrétion de CFTR et la réabsorption accrue en Na^+ aurait comme incidence une augmentation du NaCl (*Bals et al. 2001*) dans le mucus ce qui inactive les molécules antibactériennes comme les défensines, les histatines et les cathelicidines (*Bals 2000*) lorsque la concentration dépasse les 50 mmol/L. En effet, l'activité de ces protéines au sein de l'ASF de patients CF est diminuée par rapport à l'activité au sein de l'ASF de patients non CF. Donc, la diminution de la quantité de NaCl de l'ASF chez les patients CF permettrait de restaurer l'activité de ces molécules. Celles-ci agissent à différents niveaux, les histatines par exemple ont un rôle antifongique alors que les défensives α contribuent à la destruction des microorganismes phagocytés. Du fait de la diminution de l'activité des défenses au niveau du tissu pulmonaire, les colonies

bactériennes pourraient plus facilement s'installer dans ce milieu. Une fois le poumon infecté, une inflammation du tissu interviendrait. Cependant, la théorie inverse fut également développée par des scientifiques. Ainsi, l'inflammation du tissu pulmonaire surviendrait dès le plus jeune âge chez les patients CF (*Khan et al. 1995*). Cette théorie fut soutenue suite à des observations sur la diminution de la concentration en interleukine 10 secrétée par les cellules broncho alvéolaires. Cette déficience a pour incidence une inflammation du poumon favorisant l'implantation à la souche *Pseudomonas Aeruginosa*. Afin de vérifier l'implication de CFTR dans l'initiation de la réponse inflammatoire du poumon des patients mucoviscidosiques, un modèle animal dont la caractéristique est une surexpression du canal ENaC a été utilisé par l'équipe de Boucher (*Mall et al. 2004*). Cette surexpression, qui mimique l'absence de CFTR à la membrane provoque chez ces souris une diminution du volume de l'ASL, une augmentation de la concentration du mucus. De plus, ces souris ont développé spontanément une maladie pulmonaire partageant de nombreuses caractéristiques dont une obstruction due au mucus, une inflammation neutrophile ainsi qu'une clairance bactérienne réduite. Une seconde étude a porté sur la réduction du courant chlore par l'intermédiaire du canal CFTR en utilisant l'inhibiteur CFTR-inh172 spécifique de ce canal (*Perez et al. 2007*). Cette étude a montré que la réduction de l'activité de CFTR provoquait, pour des cellules cultivées à l'interface air-liquide donc dans des conditions permettant de reproduire l'environnement pulmonaire, une diminution de l'IL8 ainsi qu'une augmentation de la translocation nucléaire de NFκB en réponse à une stimulation TNFα/IL1β. Ainsi l'absence de transport de chlore par CFTR mimiquerait le phénotype inflammatoire CF.

Une hypothèse fut également émise en rapport avec l'action que CFTR pourrait avoir sur les protéines G par différentes équipes (*Khan et al. 1995*), (*Imundo et al. 1995*). Le pH au sein des organelles des cellules CF serait ainsi différent de celui des cellules non CF, ce qui aurait une influence sur les processus de sialylation des protéines glycoconjuguées. Ainsi un nombre croissant de molécules asialoGM1 (*Ratjen and Doring 2003*) seraient excrétés par la cellule épithéliale. Or, cette molécule permet une adhérence facilitée de *Pseudomonas Aeruginosa*. De plus, CFTR a été impliqué dans l'internalisation et la destruction de *Pseudomonas Aeruginosa* (*Pier et al. 1996*). Cependant, dans le cas de mutations empêchant une fonction correcte de CFTR, cette internalisation est pratiquement inexistante.

6.2 La théorie des échanges ioniques

Le second courant de pensée explique la physiopathologie de la mucoviscidose par un déséquilibre dans les échanges ioniques. La plupart des organes dont la physiologie est perturbée dans le tableau clinique de la mucoviscidose ont un lien avec la sécrétion de mucus, à l'exception des glandes sudoripares, dont le dysfonctionnement a longtemps été considéré comme un effet secondaire de la maladie. Cependant, des études ont pu montrer qu'il existait une perturbation généralisée de la sécrétion des ions Cl^- , Na^+ , K^+ et Ca^{2+} dans différents tissus de patients CF. Ainsi le taux de ces ions est augmenté dans la sueur des patients.

Dans les années 60s, Beat Hadorn a pu mettre en évidence que la sécrétion des électrolytes ainsi que la composition des fluides de patients CF étaient anormales. Il a démontré la diminution du volume des sécrétions. Puis en 1981, Knowles fit une étude sur le transport des électrolytes et leur influence sur les défenses immunitaires (*Knowles et al. 1981*). Cette étude permit de mettre en lumière pour la première fois un lien entre plusieurs organes touchés lors de la mucoviscidose. Ainsi, l'hypothèse de Knowles était que le défaut lié au mucus n'était pas dû à sa composition ou à sa sécrétion mais plutôt à l'environnement dans lequel le mucus était secrété. Par conséquent, cette étude a mis en évidence le fait que le potentiel électrique basal de la muqueuse respiratoire était deux fois plus élevé que celui de patients non CF.

Enfin, Knowles émit l'hypothèse que ce potentiel était dû à une réabsorption accélérée de Na^+ , au niveau de la muqueuse pulmonaire. Ces données ont été confirmées par une étude utilisant l'amiloride dans des tissus CF et non CF, montrant que ce bloqueur du canal ENaC, permettait d'obtenir une différence de potentiel identique dans ces deux types de tissus (*Knowles et al. 1986*). Suite à ces premières études, la mucoviscidose commença à être reconnue comme provenant d'un défaut de l'équilibre des électrolytes (*Quinton 1999*). Aussi, des études ont été menées sur le liquide de surface des voies aériennes (ASF), dont la collecte était difficile, afin de vérifier cette hypothèse (*Liedtke 1992; Boucher 2004*). Par conséquent, une étude menée par Smith (*Smith et al. 1996*) a montré

que des cellules épithéliales pulmonaires en culture primaire à l'interface air-liquide ne pouvait développer de défenses antibactériennes dans le cas où les tissus proviennent de patients CF. Cette même étude montra que le fait de réduire la concentration en Na^+ et en Cl^- permettait de restaurer l'activité antibactérienne. Le rôle de régulateur de CFTR auprès d'autres canaux ioniques fut donc étudié. Son rôle dans la sécrétion de Cl^- était connu mais la présence de CFTR est également importante pour la réabsorption de Na^+ . En effet, lorsque CFTR est activé par la PKA, il inhibe ENaC (*Kunzelmann and Mall 2001*), et donc réduit la réabsorption des ions Na^+ . Par conséquent, lorsque CFTR est muté, il existe une perturbation de ce lien de régulation avec ENaC, ce qui permettrait l'augmentation de la réabsorption de Na^+ et donc de l'eau disponible au niveau du mucus, le rendant plus visqueux que la normale (*Kunzelmann and Mall 2001*). Cette viscosité augmentée entraîne l'arrêt, ou le ralentissement, des battements ciliaires. Cela favorise donc l'installation des colonies bactériennes puisqu'un maillon de la chaîne défensive devient moins efficace.

6.3 Mucoviscidose et atteinte hépatique

L'amélioration de la qualité de vie des patients atteints de mucoviscidose, ou fibrose kystique, montre l'existence d'une atteinte hépatique liée à cette pathologie chez près de 30% des patients sans corrélation établie entre une mutation et le développement d'une atteinte hépatique (*Colombo et al. 1999*). Une partie de ces atteintes hépatiques peuvent être due à la médication associée à la mucoviscidose cependant nous ne présenterons ici que les atteintes essentiellement dues au défaut de la fonction de CFTR. L'expression de CFTR au niveau hépatique a été mise en évidence uniquement au sein des cholangiocytes, les cellules du foie couvrant les conduits ductulaires permettant l'écoulement des acides biliaires vers la vésicule biliaire. Le rôle de CFTR au niveau des cholangiocytes est de permettre une alcalisation de la bile requise lors de la fonction digestive. Cette alcalisation de la bile est provoquée par le transport de l'ion Cl^- par CFTR permettant de modifier le gradient de chlore et ainsi, via l'anti transporteur AE2 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, un apport important en ion HCO_3^- au niveau de la lumière des canalicules. Ainsi, le défaut de la fonction de CFTR au niveau du foie provoque, comme au niveau du pancréas une sécrétion visqueuse, qui rapidement va obstruer les conduits permettant le transport de la bile. Les manifestations provoquées au niveau du foie sont principalement une stéatose hépatique ou une cirrhose

focale biliaire avec une prévalence augmentant avec l'âge du patient (*Colombo et al. 2006*). Le seul traitement existant afin de soulager l'atteinte hépatique se développant chez les patients PFIC1 est un traitement à base d'acide ursodéoxycholique (UDCA) qui facilite la sécrétion biliaire, agissant en particulier sur sa viscosité.

7. Les interactions connues de CFTR

Cette protéine membranaire comporte 12 domaines transmembranaires repartis de façon symétrique en deux répétitions de 6 domaines (TMD1 et TMD2). Ces domaines situés au sein de la membrane sont impliqués dans la formation du pore CFTR. CFTR possède également deux sites de liaisons aux nucléotides (NBD ou NBF : Nucleotide Binding Domain ou Fold) dont la structure secondaire est majoritairement un feuillet β . Ces sites, via l'hydrolyse de l'ATP au niveau des sites Walker A et B pour NBD1 et NBD2, permettent de maintenir le canal ouvert temporairement, dans le cas où seule l'hydrolyse de l'ATP s'est faite au niveau de NBD1, ou de façon plus stable lorsque les deux domaines hydrolysent l'ATP. Le domaine NBD1 contient le site de mutation le plus fréquent chez les patients CF, la mutation $\Delta F508$, qui correspond à la délétion d'une phénylalanine entraînant un défaut de maturation de la protéine, qui ne se rendra alors pas à la membrane. Enfin, le domaine régulateur R de CFTR permet via sa phosphorylation, l'activation du canal CFTR. Ce domaine, correspondant aux acides aminés 590 à 831, est spécifique de CFTR puisqu'aucune autre protéine de la famille des ABC transporteurs ne possède ce type de site de régulation. Il peut être divisé en deux sous domaines : RD1 et RD2. RD1 est très conservé entre les espèces alors que RD2 est très variable. RD1 (acides aminés 590 à 672) est impliqué dans la maturation de la protéine ainsi que dans une liaison avec le domaine NBD1. RD2 (acides aminés 672 à 831) est impliqué dans la phosphorylation du domaine R puisqu'il contient les sérines qui seront phosphorylées par la PKA ou la PKC, véritable préalable à l'ouverture du canal CFTR (la PKC semble également effectuer une régulation sur l'expression génique de CFTR (*Bargon et al. 1992*)).

7.1 CFTR et les protéines chaperonnes

CFTR a tout d'abord des interactions connues avec des protéines chaperonnes (*Loo et al. 1998*) (Hsp70 et calnexine) qui permettent à CFTR de se replier correctement entre son passage au sein du réticulum endoplasmique, où CFTR subit deux N-Glycosylations, et celui dans l'appareil de Golgi lors de sa maturation. Ce repliement est important afin de conférer à CFTR une résistance aux protéases.

7.2 CFTR et les canaux chlore

CFTR aurait également un rôle sur le canal ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel) (*Ando-Akatsuka et al. 2002*). En effet, avant l'identification de CFTR, il avait été présumé qu'ORCC était le canal déficient dans la mucoviscidose. Ce transporteur de chlore est régulé par la PKA et une étude a montré que la régulation exercée par CFTR sur ORCC dépendait de la présence du domaine NBD1 de CFTR (*Schwiebert et al. 1998*) et se faisait lorsque le domaine R était phosphorylé (*Gabriel et al. 1993*). Ainsi l'une des hypothèses avancées, toutefois controversées, est que CFTR exporterait une faible quantité d'ATP à l'extérieur de la cellule, ce qui est nécessaire au fonctionnement de ORCC via l'activation de récepteurs purinergiques (*Ma et al. 2004*).

CFTR semble également réguler une autre famille de transporteurs de chlore, les CaCCs (*Agnel et al. 1999; Fuller et al. 2001*), qui sont les transporteurs de chlore dépendant du calcium. En effet, les travaux de Wei et collaborateurs (*Wei et al. 2001*) ont permis d'expliquer la mécanistique de régulation entre ces deux canaux. La présence de CFTR à la membrane suffit à une première diminution de l'activité spécifique des CaCCs. De plus, la région C-terminal du domaine de régulation R de CFTR, qui contient les sites de phosphorylation PKA, est impliquée dans une diminution plus importante de l'activité des CaCCs, par conséquent dépendante de l'activité de CFTR.

Enfin, l'étude du canal CFTR a pu mettre en évidence une interaction entre le domaine NBD2 et le motif Walker B avec les VRAC (*Nilius and Droogmans 2003*) (Volume-regulated Chloride Channels). Le rôle des VRAC est de contrôler le volume intracellulaire ainsi que le potentiel de membrane. L'interaction entre CFTR et les VRAC a permis de

démontrer une diminution du courant lié au VRAC lorsque CFTR est présent, cette diminution n'est toutefois pas dépendante de l'activité de CFTR mais du domaine NBD2 (*Ando-Akatsuka et al. 2002*).

7.3 CFTR et les canaux ioniques

L'étude du domaine NBD2 a également permis de démontrer qu'il agissait sur le canal ROMK2 au niveau rénal (*Ando-Akatsuka et al. 2002*). Tous deux sont des transporteurs ATP dépendant du potassium. En effet, la présence du domaine NBD1 de CFTR induit une modification de la sensibilité de ce transporteur à la glibenclamide, un bloqueur des canaux potassiques ATP-dépendant (*McNicholas et al. 1996*).

CFTR a de plus un rôle de régulation sur d'autres canaux ioniques de la membrane tel que le canal sodium sensible à l'amiloride (ENaC) des cellules épithéliales. Cette interaction fut mise en évidence à la suite d'observations réalisées au niveau de mucus pulmonaire appauvri en Cl^- , dont la réabsorption en Na^+ était plus importante que la normale, et dont la viscosité, du fait de cette réabsorption augmentée, se trouvait également accrue. Ainsi, en absence de CFTR ou dans le cas de la mutation ΔF508 , l'AMPc permet l'augmentation du transport de sodium par le canal ENaC en potentialisant ces temps d'ouverture. Le lien entre ces deux canaux semble se faire entre NBD1 et le domaine R de CFTR avec la région C-terminale de la sous unité α d'ENaC. En effet, une étude a montré la possibilité de co-immunoprécipiter ENaC à partir d'un peptide ne comportant que la région décrite plus haut de CFTR (*Kunzelmann et al. 1997*).

Le canal CFTR semble également être impliqué dans une régulation des anti-transporteurs Na^+/H^+ et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ puisque la présence d'AMPc dans des tissus CF ne permet pas l'inhibition de la réabsorption de NaCl observable dans des tissus contrôles (*Clarke and Harline 1996*).

7.4 CFTR et les protéines à domaines PDZ

CFTR interagit également avec plusieurs protéines via des domaines PDZ (*Guggino 2004*). Ces domaines tirent leurs dénominations PDZ des trois premières protéines où ce

motif a été retrouvé (Psd-95, Dlg et Z01). Les interactions de type PDZ sont les plus courantes au sein des métazoaires (*Bezprozvanny and Maximov 2001*). Elles permettent une interaction entre le site C terminal d'une protéine ayant une séquence consensus et une protéine comportant une structure 3D de type domaine PDZ (*Jelen et al. 2003; Kay and Kehoe 2004*). Les domaines PDZ ont été classés en 3 grandes catégories principales, en fonction de la séquence en C terminal, ou plus récemment d'une séquence au sein d'une protéine dont la conformation est proche de celle d'un domaine C-terminal de protéine (*Hung and Sheng 2002*). La séquence des 5 derniers acides aminés en C terminal d'une protéine est dénommée P0 pour le dernier acide aminé, P1 pour l'avant dernier acide aminé, ...

Ainsi la séquence définissant la première classe de domaine PDZ correspond à un enchaînement S/T - X - Φ où X, en P1, représente n'importe quel acide aminé et Φ un acide aminé hydrophobe en P0. Le domaine C-terminal (D-T-R-L) de CFTR appartient à cette catégorie de domaine PDZ. La seconde classe de domaine PDZ est définie par la séquence Φ - X - Φ . La troisième classe se définit enfin par la séquence consensus X - X - C.

Ainsi CFTR possède un site PDZ au niveau C-terminal qui est impliqué dans de nombreuses interactions dont celles avec EBP50 (Ezrin-radixin-moesin Binding Phosphoprotein of 50 kDa) (*Vankeerberghen et al. 2002*) et CAL (CFTR associated ligand) (*Brone and Eggermont 2005*).

CAL serait impliqué dans la régulation du courant chlore AMPc dépendant. Ainsi sa surexpression aurait pour incidence une diminution de CFTR à la membrane, réduisant le courant chlore AMPc dépendant.

EBP50, ou NHERF (Na⁺-H⁺ Exchanger Regulatory Factor), est un facteur important se liant à la membrane apicale des cellules épithéliales polarisées, où se trouve CFTR, et dont le rôle de cofacteur est essentiel à la PKA. En effet, EBP50 a pour rôle, après stimulation d'un récepteur purinergique (A_{2B}) (*Bucheimer and Linden 2004*), de rapprocher le domaine R de CFTR et la PKA permettant ainsi l'ouverture du canal CFTR. Ce rapprochement se fait par la liaison de la partie C-terminal d'EBP50 à l'eitrine, qui elle-même se lie au domaine régulateur de la PKA (*Vankeerberghen et al. 2002*).

Le domaine PDZ D-T-R-L de CFTR interagit également avec CAP70 (Cftr Associated Protein of 70 kDa), une protéine contenant 4 domaines PDZ, impliquée dans la stabilisation de la dimérisation de CFTR, deux molécules de CFTR formant un seul canal chlore dans ce cas (*Wang et al. 2000*).

7.5 Les autres interactions connues de CFTR

CFTR connaît une régulation de son expression génique par NFκB (Nuclear Factor kappaB). En effet, en 2000 une première étude a montré la régulation de l'expression de CFTR par une cytokine, l'interleukine-1β (*Cafferata et al. 2000*). L'année suivante, il a été démontré que l'interleukine-1β facilitait la liaison de NFκB avec un élément de réponse présent en position -1103 à -1093 dans les séquences régulatrices du gène CFTR. Cette liaison permet d'augmenter l'expression génique de CFTR (*Brouillard et al. 2001*).

Un rôle éventuel de CFTR dans l'internalisation de *Pseudomonas Aeruginosa* et dans la réponse immunitaire, a été proposé. En effet, le lipopolysaccharide (LPS) de *Pseudomonas* interagit avec un site de la première boucle extracellulaire de CFTR (acides aminés 108-117). Cette interaction permettrait l'internalisation des bactéries par les tissus épithéliaux du poumon et donc serait l'un des moyens de défense de l'organisme à ce niveau (*Pier et al. 1996*).

La protéine CFTR interagit également avec des protéines de la famille des protéines SNARE (Soluble Nsf Attachment REceptor). Ces protéines auraient une action sur CFTR à deux niveaux. Le premier est la régulation du trafficking de CFTR puisqu'en présence de ces protéines, le trafficking AMPc-dépendant de CFTR est aboli. Le second niveau de régulation des protéines SNARE se fait au niveau du courant chlore AMPc-dépendant. En effet, lorsque la protéine syntaxine 1A (*Peters et al. 2001*) est présente à proximité de la région N-terminale de CFTR, une interaction avec l'une des hélices alpha de la syntaxine 1A se forme. Cette même séquence est capable de se lier au domaine R de CFTR. Cependant lorsque la PKA phosphoryle le domaine R de CFTR, la liaison entre la syntaxine 1A et CFTR devient impossible et l'ouverture du pore CFTR redevient possible.

La région N-Terminal de CFTR se lie à deux autres protéines de la famille des SNARE, SNAP23 (*Cormet-Boyaka et al. 2002*) et SNAP 25 (*Vankeerberghen et al. 2002*). Le mécanisme de régulation de CFTR par SNAP23 et la syntaxine 1A est mieux connu. Il implique une liaison entre la syntaxine 1A, SNAP23 et la partie N-terminale de CFTR, région de la protéine connue pour son rôle dans l'ouverture du canal.

De plus, la protéine VAMP2, de type v-SNARE, permettrait, lorsqu'elle est surexprimée, d'augmenter le courant induit par une stimulation de forskoline sur CFTR.

Enfin, CFTR est également connu pour interagir avec la phosphatidylsérine. Ainsi une étude de 2002 (*Eidelman et al. 2002*) a permis de montrer l'importance de l'interaction entre CFTR et la phosphatidylsérine pour le trafficking de CFTR au niveau de son domaine NBD1. En effet, cette étude a montré que CFTR, au sein du réticulum endoplasmique, perdait son affinité pour la phosphatidylsérine lorsque la mutation $\Delta F508$ de CFTR était présente et ne pouvait plus discriminer la phosphatidylsérine de la phosphatidylcholine. Or, les interactions avec ces deux phospholipides provoquent des modifications dans la structure secondaire de la protéine qui perturbent, dans le cas de l'interaction avec la phosphatidylcholine, le trafficking correct de CFTR.

Afin de résumer les différentes interactions de CFTR, nous nous proposons de rappeler sous forme de schéma les sites d'interaction avec les partenaires identifiés.

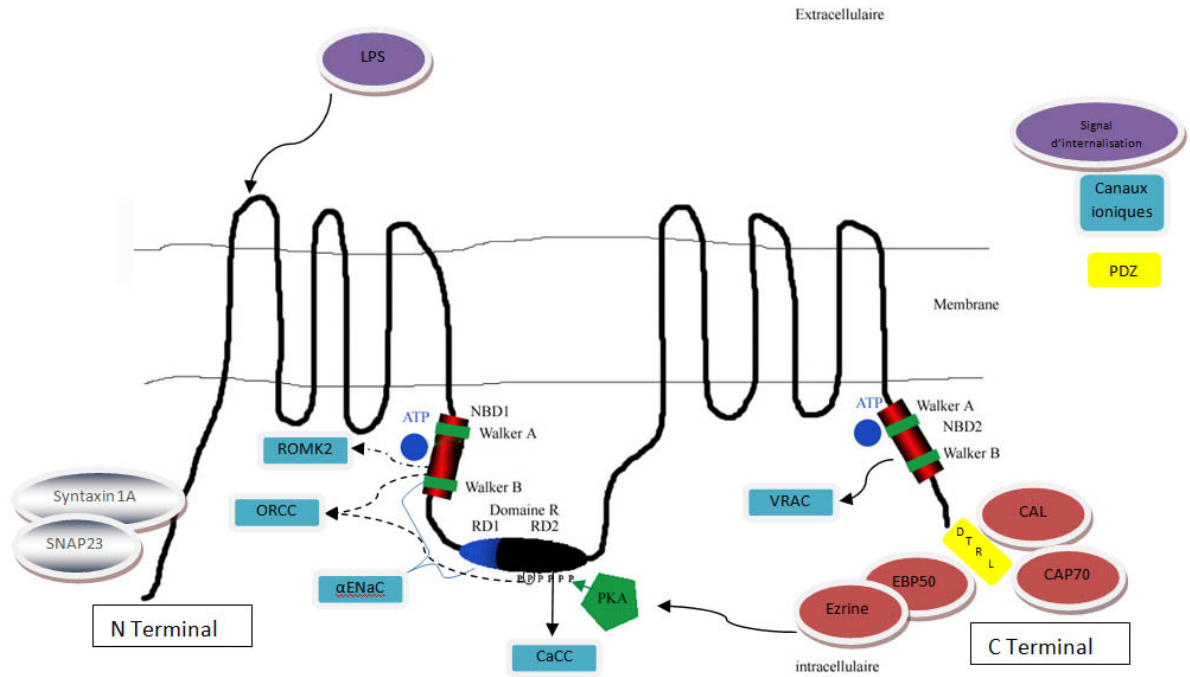


Figure 6 : Interactions connues de la protéine CFTR

8. Etat des connaissances et base de travail

Les derniers travaux publiés sur notre thématique proviennent d'une publication du laboratoire de 2006 dans *Hepatology* (Demeilliers et al. 2006). L'analyse du tableau clinique de certains patients PFIC1 et mucoviscidosiques a montré des points communs. Ainsi les patients mucoviscidosiques développent des atteintes hépatiques graves (Colombo et al. 1999; Wilschanski et al. 1999; Colombo et al. 2006) identifiées maintenant du fait de l'amélioration du pronostic vital de ces patients. De plus, les deux pathologies provoquent chez les patients une pancréatite, due à un défaut de la sécrétion du suc pancréatique ainsi qu'une sudation anormale. Cette sudation anormale, liée à un défaut du transport de NaCl, est caractéristique des patients souffrant de la mucoviscidose et reflète un défaut de la fonctionnalité du canal CFTR. Ce constat a amené notre laboratoire à travailler sur le lien possible existant entre CFTR et ATP8B1. Les travaux publiés en 2006 ont ainsi montré plusieurs résultats majeurs dans ce domaine. Tout d'abord, les patients PFIC1 souffrent d'une baisse de l'expression génique de FXR (Alvarez et al. 2004; Chen et al. 2004), SHP ainsi que de CYP7A1 (Demeilliers et al. 2006). De plus, le niveau d'expression mesuré par PCR en temps réel d'ASBT, de NTCP, de CFTR et de BSEP est diminué chez les patients PFIC1 de façon

spécifique par rapport à d'autres pathologies hépatiques comme PFIC2 ou l'atrésie des voies biliaires. ASBT est le transporteur responsable de la réabsorption des acides biliaires au niveau des entérocytes et des cholangiocytes. NTCP est l'un des deux transporteurs responsable de la réabsorption des acides biliaires lors du cycle entérohépatique et BSEP est le transporteur des acides biliaires depuis l'hépatocyte vers la lumière canaliculaire.

Enfin, nous avons voulu reproduire les résultats obtenus avec des patients PFIC1 en utilisant des lignées cellulaires caractérisées. Grâce à la technologie des siRNA (siRNA anti-ATP8B1) dans une lignée cholangiocytaire (Mz-ChA-2) exprimant CFTR et ATP8B1, nous avons pu montrer une diminution de l'expression génique de *CFTR* (Demeilliers et al. 2006) due à la déstabilisation de l'ARNm ATP8B1. Les résultats obtenus nous indiquent qu'ATP8B1 semble jouer un rôle de régulateur de transcription de CFTR puisque la diminution de la quantité d'ARNm ATP8B1 provoque une diminution d'ARNm CFTR. Ces résultats ont pu être corroborés par des expériences de PCR en temps réel à partir de tissus de patients PFIC1 qui montrent également une diminution de l'expression génique de CFTR. Nous souhaitons donc dans le cadre de cette étude vérifier l'hypothèse d'une interaction physique entre ces protéines ainsi que les effets de l'expression de la protéine ATP8B1 sur l'expression du gène *CFTR* afin de voir si ATP8B1 pourrait jouer un rôle, et lequel, sur l'expression, la maturation ou la fonction du canal CFTR. L'étude de l'effet de mutations connues du gène *ATP8B1* sur l'expression de la protéine CFTR sera également menée dans le cadre de notre étude afin d'évaluer les liens possibles entre ces deux gènes/protéines. Nous allons donc vérifier l'expression de ces deux gènes dans différentes lignées cellulaires. Cette étude sera poursuivie dans ces mêmes lignées au niveau de la présence des protéines correspondantes ainsi que leurs localisations par l'intermédiaire d'immunofluorescences. Ces premiers résultats seront complétés par une analyse in silico approfondie de la protéine ATP8B1 afin de déterminer ses fonctions possibles par l'identification de motifs consensus sur un modèle 2D de la protéine. Ce modèle permettra également de corrélérer ses fonctions avec les mutations identifiées chez les patients PFIC1 et BRIC. Un modèle 3D sera réalisé afin de rechercher un domaine fonctionnel pour la protéine. Cette étude est complétée par une approche prédictive de l'interactome d'ATP8B1. Enfin une approche fonctionnelle de mesure de l'activité de CFTR sera entreprise en fonction de deux mutations identifiées présentes dans des lignées cellulaires issues de patients PFIC1 ou BRIC.

II- Matériel et Méthodes

1. Lignées cellulaires utilisées

Lors de ce travail de nombreuses lignées cellulaires ont été utilisées. Certaines lignées utilisées dans nos expériences expriment ATP8B1 et CFTR :

- La lignée HT-29 (ATCC : HTB-38) a pour origine un adénocarcinome colorectal.
- Les lignées MZ-ChA-1 et MZ-ChA-2 représentent des cellules cholangiocytaires
- La lignée Calu-3 (ATCC : HTB-55) est issue d'un adénocarcinome de cellules épithéliales du poumon

Une lignée n'exprime ni CFTR ni ATP8B1

- La lignée HPCR est une lignée provenant d'hépatocarcinome de notre collection rendus résistants à une forte dose d'acides biliaires.

Les lignées IB3-1 et S9 ont été utilisés dans le cadre de la vérification de l'expression protéique de CFTR et d'ATP8B1.

- La lignée IB3-1 (ATCC : CRL-2777) est une lignée bronchique de cellules provenant d'un patient mucoviscidose portant les mutations DeltaF508 et W1282X isolée en 1992. Cette lignée a été immortalisée avec un hybride adénovirus 12-SV40. Cette lignée est donc représentative d'une mauvaise maturation de la protéine CFTR.
- La lignée S9 (ATCC : CRL-2778) dérive de la lignée IB3-1. La lignée S9 est corrigée pour l'expression de CFTR via la transduction par un virus adéno-associé comportant la séquence fonctionnelle de CFTR.

Des lignées de notre collection comportent des mutations sur ATP8B1, notre protéine d'intérêt.

- La lignée Byler, est une lignée de fibroblast-like qui provient d'un patient PFIC1 du Liver Center de San Francisco portant le gène *ATP8B1* muté suivant la mutation G308V. Cette mutation est la plus fréquente au sein de la communauté Amish. Cette lignée a été immortalisée avec le grand antigène T4 du SV40.

- La lignée BRIC est également une lignée de fibroblast-like et provient d'un patient BRIC du Liver Center de San Francisco possédant la mutation G1241fs. Cette mutation est la plus fréquente chez les patients BRIC. Cette lignée provient d'un clone spontané de cellules mises en culture au laboratoire.

2. Conditions de culture des cellules

Les milieux utilisés sont les milieux de culture suivants :

- Pour les lignées Byler, Bric, IB3-1, S9, HT29 et HTCR, le milieu utilisé est un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) complété de 10% de Sérum de veau fœtal, 1% de Pénicilline/Streptomycine, 1% de Glutamine 200mM et Hepes 10mM afin de tamponner le milieu à un pH de 7-7,2.
- Pour la lignée Calu-3, le milieu utilisé est un milieu Minimal Essential Medium (MEM), complété par 15% de Sérum de veau fœtal, 1% de solution pour MEM en acides aminés non Essentiels, 0,5% de Pénicilline/Streptomycine, 1% de Glutamine 200mM et 3,3% de Na₂HCO₃.
- Pour les lignées Mz-Ch-A1 et Mz-Ch-A2, le milieu utilisé est également un milieu Minimal Essential Medium (MEM), complété par 10% de Sérum de veau fœtal, 1% de Pénicilline/Streptomycine, 1% de Glutamine 200mM et Hepes 10mM afin de tamponner le milieu à un pH de 7-7,2.

Les différentes lignées sont cultivées de façon standard à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Les lignées sont décongelées dans des flasks de culture de 25 cm² (T25) de la marque Corning puis passées pour une culture standard une fois la confluence atteinte dans des flasks de culture de 75 cm².

3. Extraction d'ARN

Les ARNs totaux ont été récupérés soit par le kit Qiagen RNeasy Kit soit par la méthode classique avec le réactif TriZol (Invitrogen) ou Extract-All (Eurobio).

Pour la méthode par le kit Qiagen, le protocole fourni par l'entreprise a été suivi en adaptant les volumes à la quantité de cellules pour chacune des préparations. Pour la méthode classique, après rinçage au PBS des cellules en culture à 95-100% de confluence, les cellules sont centrifugées après action de la trypsine à 4500 g durant 3 minutes. Les cellules sont ensuite resuspendues dans le réactif (Extract All ou TriZol) et laissées à température ambiante durant 5 minutes afin de permettre la complète dissociation des complexes nucléoprotéiques. Après ajout de Chloroforme (CHCl_3), le mélange est agité vigoureusement durant 15 secondes puis laissé à température ambiante durant 2 minutes. Après centrifugation à 12 000 g durant 15 minutes à 4°C on récupère la phase aqueuse puis on précipite l'ARN avec de l'isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$). La précipitation est réalisée durant 10 minutes à température ambiante puis centrifugée suivant les mêmes conditions que précédemment. Enfin, le culot obtenu est conservé et lavé à l'éthanol 75% préalablement refroidi. Après une dernière centrifugation suivant les mêmes conditions, le culot obtenu est séché puis dissout dans du tampon TE RNase free (Tampon Tris-EDTA, pH 7,5). L'extraction est ensuite placée à -20°C pour conservation et dosée après dilution au 1/50 par un rapport de la DO obtenu à 260nm et à 280nm. La pureté de la préparation est vérifiée par le rapport $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ qui doit être compris entre 1,8 et 2,0.

La concentration en $\mu\text{g}/\text{mL}$ sera calculée par l'expression suivante :

$$[\text{ARN}] = \text{DO}_{260} * \text{Facteur de dilution} * 40$$

4. Polymerase Chain Reaction et Reverse Transcription

Le principe de la transcription reverse est de transcrire l'ensemble des ARNs messagers exprimés dans une cellule en ADN complémentaire. Pour cela, des oligodT, s'hybridant à la queue polyA des ARNs messagers serviront d'amorces à la transcriptase

reverse. Cet ADNc servira de matrice lors de la réaction de PCR. Les transcriptions reverses (RT) ont été effectuées à partir d'un extrait de 3µg d'ARN total. La préparation des échantillons a été faite en deux étapes. La première consiste en l'ajout dans un volume final de 10 µL de 3 µg d'ARN et de 1 µL d'OligodT à 100 µg/µL. Après une centrifugation rapide, l'échantillon est placé 5 min à 65°C, 3 min sur de la glace puis centrifugé de nouveau un bref instant. Durant ce temps, le RT cocktail est préparé. Il se compose pour une réaction de : 4 µL de RT Buffer (Invitrogen), 5 µL de 2 mM dNTPs, 1 µL de Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV, Invitrogen) et 0,5 µL de RNase Out (Invitrogen). L'ajout du RT cocktail à l'échantillon contenant l'ARNm puis une dernière centrifugation rapide intervient alors. La Reverse transcription peut être réalisée à 37°C durant 1h dans un bain-marie ou un bloc chauffant. Afin d'inhiber la MMLV, le tube est ensuite placé 10 min à 95°C puis 3 min sur glace. Enfin, l'échantillon d'ADNc est centrifugé rapidement et placé à -20°C pour conservation.

Le principe de la PCR permet à partir d'une séquence d'ADNc et d'amorces spécifiques d'un gène d'amplifier une région, dénommé amplicon, permettant de montrer l'expression de ce gène. Le protocole de PCR utilisé est un protocole standard pour 20 µL final de milieu de réaction avec 1 µL d'ADNc formé à partir de la réaction de RT, 2 µL de tampon 10X PCR, 0,6 µL de MgCl₂ (50mM), 2 µL de dNTPs 2 mM, 2 µL de 10 µM amorce sens et anti-sens et 0,2 µL de Taq Polymérase (Invitrogen). Les cycles standards utilisés sont 94°C pour la dénaturation durant 1 minute, T_m des amorces +2°C pour l'hybridation des amorces sur la matrice d'ADNc durant 2 minutes et 72°C pour l'élongation des brins néoformés durant 2 minutes. Ces trois étapes sont répétées 30 fois puis une dernière étape à 72°C durant 10 minutes permet d'achever toute élongation avant que l'ensemble soit maintenu pour conservation à 4°C. Le nombre de cycle pourra être ajusté en fonction du signal obtenu et du niveau d'expression des transcrits observés dans chacune des lignées étudiées.

Les échantillons (10 µL) sont alors déposés ajoutés de bleu de charge contenant du Xylène Cyanol et du Bleu de Bromophénol sur un gel d'agarose 1%. Un marqueur 1kB est utilisé afin de suivre la bonne migration des gels dans des cuves *i-Mupid* (Helixxtec) dans un milieu TAE 0,5X de migration. La migration classique correspond à 30 minutes de migration à

100 V. L'intercalant de l'ADN utilisé afin de révéler l'ADN présent est le Bromure d'éthidium (BET) ou le SybrSafe (Molecular Probes).

Les amorces utilisées sont les suivantes :

Couple Oligos	Amorce Sens	Amorce AntiSens	Tm	Amplicon
ATP8B1	TTCAATGGCTACTCTGCGC	AGCACACAGCAACAGTCAGG	60	559
Beta Actine Humaine	GAACCTTGGGGGATGCTCGC	CGGGAAATCGTGCGTGACAT	60	300
CFTR	TGAAGGAGAAATCCAGATCG	GTACTGCCGCACTTTGTTCT	60	520

Tableau 3 : Amorces PCR utilisées

5. Extraction de protéines totales

Le tampon de lyse utilisé est un tampon composé de Tris HCl (50mM), Triton X100 (1% final), SDS (0,1% final), NaCl (150 mM) auquel est ajouté au dernier moment un cocktail d'inhibiteurs de protéases : Aprotinine (10 µg/mL final), Leupeptine (0,5 µg/mL final), PMSF (1 mM) et Orthovanadate (1 mM).

Avant action de ce tampon de lyse, les cellules en culture sont lavées deux fois au PBS, puis on ajoute le tampon de lyse (600 µL pour un support de 10 cm²). Les cellules sont ensuite grattées et récupérées dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Après micro-centrifugation (5 min, Vmax à 4°C), le surnageant est récupéré et la méthode de Bradford est utilisée pour déterminer la concentration en protéine des échantillons.

6. Western Blot

Le principe général est de faire migrer des protéines en fonction de leurs poids moléculaire sur un gel dont le maillage est plus ou moins dense. Ce maillage sera important pour la vitesse de migration des protéines. Les protéines ayant migré seront ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose ou PVDF afin d'immobiliser les protéines sur un support accessible à des anticorps par exemple dans le cadre d'une immuno-révélation.

Les expériences de western blot sont effectuées à un voltage constant de 100 V, la migration sur un gel SDS-PAGE entre 6 et 10 % (en fonction de la résolution souhaitée et donc de la quantité d'acrylamide ajoutée) est réalisée en condition standard sur 3h à température ambiante ou à 30 V sur la nuit en chambre froide. Le tampon de migration est constitué pour un litre de 15 g de Tris, 5 g de SDS et 72 g de Glycine. Le marqueur de poids moléculaire de chez Invitrogen See Plus2 Prestained Standard permet une identification des poids des protéines dans une gamme de 4 à 250 kDa.

Le transfert est réalisé sur membrane PVDF préalablement activée (5 secondes Méthanol 100%, 2 minutes Eau MilliQ et 10 minutes tampon de transfert). Le transfert est ensuite réalisé durant 2h à 100 V en chambre froide ou 30 V sur la nuit toujours en chambre froide. Le tampon de transfert est constitué pour un litre de 5,8 g de Tris, 29 g de Glycine et 200 ml de Méthanol.

La membrane est ensuite révélée avec le kit Western Breeze anti Rabbit ou Anti Mouse (Invitrogen) suivant le protocole fourni par l'entreprise ou via la méthode suivante.

La membrane est bloquée avec une solution PBS-5% de lait durant 1h à température ambiante. L'anticorps primaire est ajouté à la concentration désirée dans une solution de PBS 1%BSA sous agitation sur la nuit à 4°C ou durant 1h30 à température ambiante. La membrane est ensuite rincée 3 fois (5 min, 10 min et 15 min) avec du PBS. Puis l'incubation de l'anticorps secondaire correspondant en PBS 1% de lait se fait en l'utilisant à la concentration adaptée durant 1h à température ambiante sous agitation. La révélation se fait en utilisant l'ECL (Amersham) ou l'ECL Plus (Amersham) en exposant la membrane à un film autoradiographique entre 1 et 20 minutes.

Les Anticorps primaires utilisés sont :

- Pour CFTR : M3A7; anticorps monoclonal de chez ABCam dirigé contre le domaine intracytosolique NBD2 de CFTR chez la souris
- Pour ATP8B1 : Anticorps 3001, développé chez le lapin par le laboratoire et s'hybridant à la séquence hautement spécifique d'ATP8B1 S1221-A1235 : SSGRSIRKKRSPLDA

- Pour la Beta Actine, l'anticorps 18-0054 de chez Zymed développé chez le lapin est utilisé.

Les Anticorps secondaires utilisées sont des anticorps couplées à la phosphatase alcaline de type Lapin Anti-Souris et Chèvre Anti-Lapin.

7. Immunoprécipitation

Les immunoprécipitations sont toutes réalisées à partir de 750 µg de protéines totales. Ces protéines sont placées en présence de 5 µg de l'anticorps dirigé contre la protéine à immunoprécipiter durant une nuit sous agitation à 4°C. Au moment de la préparation du mélange anticorps et protéines totales, dans un autre tube Eppendorf, 30 µL de billes de protéine A Sépharose sont prélevées par échantillon et lavées trois fois avec 1 mL de PBS. L'ensemble des billes est également incubé sur la nuit à 4°C sous agitation afin de bloquer les sites de liaison non spécifique. Le lendemain, les billes sont ajoutées à l'échantillon anticorps-protéines totales auquel on ajoute 1 mL du tampon de lyse froid utilisé lors de l'extraction. L'ensemble sera incubé à 4°C durant 2h sous agitation. Les tubes sont ensuite centrifugés rapidement puis le surnageant est retiré et les billes sont lavées trois fois avec le même tampon de lyse froid. Enfin, 60 µL de tampon « Sample Buffer » contenant du β-Mercaptoéthanol sont ajoutées. L'échantillon est alors soit placé à -20°C pour une utilisation ultérieure, soit placé 5 min à 95°C et déposé sur gel pour migration.

8. Immunofluorescence

La culture des cellules dans le but de réaliser une immunofluorescence est adaptée par rapport aux conditions standards de culture cellulaire. Les cellules sont cultivées en plaques 12 puits de la marque NUNC. Dans le fond de chaque puits de la plaque est déposé une lamelle de verre sur laquelle les cellules vont être cultivées. Une fois 75-85% de confluence atteinte, le milieu de culture est retiré et les cellules sont fixées en utilisant le paraformaldéhyde (PBS-4% paraformaldéhyde 30 minutes) et perméabilisées au Triton X100 2%. Les lamelles sont alors conservées à -20°C. Afin de réaliser le marquage, les lamelles sont réhydratées à température ambiante durant 5 minutes avec du PBS. La lamelle est alors

lavée 2 fois avec du PBS puis les sites aspécifiques de fixation sont bloqués par une solution de PBS-2% BSA durant 1h.

L'anticorps primaire choisi est alors utilisé dilué dans une solution de PBS-1% BSA durant 1h. Trois lavages sont ensuite réalisés avec une préparation de PBS/Triton X100 0,025%. L'anticorps secondaire (couplé à un fluorochrome) est alors ajouté dilué à 1/200^{ème} dans du PBS-1% BSA. Trois lavages sont ensuite réalisés avec une préparation de PBS/Triton X100 0,025%. Le marquage spécifique du noyau à l'aide de Hoechst 33342 (Bleu) est alors appliqué durant 5 à 15 minutes en fonction de l'intensité voulue. Un dernier lavage au PBS est alors réalisé avant le montage de la lamelle sur une lame au moyen de VectaShield® pour visualisation sur un microscope à fluorescence. Les anticorps primaires utilisés sont les mêmes que ceux utilisés en Western Blot. Les anticorps secondaires sont par contre couplés à un fluorochrome et non à la phosphatase alcaline. Ainsi les anticorps Texas Red Goat Anti Rabbit Invitrogen (Rouge) et Alexa Fluor 488 Anti Mouse Invitrogen (Vert) ont été utilisés. Les images ont été prises sous microscopie à fluorescence.

9. Efflux d'Iode

Le canal chlore CFTR possède la préférence ionique suivante $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ lorsqu'il est localisé à la membrane plasmique (*Tabcharani et al. 1997*). Afin de réaliser des efflux d'iode permettant de mettre en évidence la fonctionnalité de CFTR, les cellules sont cultivées en plaque 12 puits. Une fois la confluence atteinte, le milieu de culture est remplacé par un milieu ionique riche en iode I^- . Ce tampon de charge (136 mM NaI, 3 mM KNO_3 , 2 mM $Ca(NO_3)_2$, 11 mM Glucose, 20 mM Hepes) permet d'enrichir le milieu intracytosolique des cellules en iode durant 30 minutes à 37°C en atmosphère humide 5% CO_2 .

La mesure de l'efflux peut alors être faite. Pour cela, durant 20 minutes, le tampon d'efflux (136 mM $NaNO_3$, 3 mM KNO_3 , 2 mM $Ca(NO_3)_2$, 11 mM Glucose, 20 mM Hepes) sera changé chaque minute. Les douze dernières fractions sont conservées pour mesure avec une sonde spécifique de détection de l'ion I^- (IonSur) en millivolt. Lors des huit derniers changements du tampon d'efflux, une stimulation pourra être réalisée par un activateur (forskoline 10 μM) ou par un cocktail (forskoline 10 μM et inh-172 10 μM). L'Inhibiteur 172

est un inhibiteur spécifique du canal CFTR. Ainsi la différence de stimulation avec et sans inh-172 correspond à l'efflux spécifique réalisé par CFTR. Les mesures sont habituellement réalisées en triplicat par condition en prenant la valeur moyenne sur les trois puits étudiés.

10. Transfection des cellules Byler par le plasmide pEGFP-ATP8B1

Le plasmide utilisé lors des expériences de transfection transitoire effectuées est le plasmide pIRES-EGFP (Clontech) dans lequel l'ADNc d'ATP8B1 de rat a été cloné. Ce plasmide bi-cistronique, appelé pEGFP-A2, permet donc une expression de l'Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) ainsi que de la protéine sauvage ATP8B1. L'EGFP nous sert de marqueur pour l'évaluation de l'efficacité de transfection. Il existe une très forte identité entre les séquences de rat et de l'Homme pour ATP8B1.

Lors de la planification d'une expérience de transfection, les cellules sont cultivées en plaque 6 puits (le protocole pourra être adapté à un autre type de support de culture). La transfection interviendra lorsque les cellules sont à 80% de confluence. L'ADN plasmidique sera introduit dans les cellules par l'intermédiaire de liposomes (Lipofectamine 2000). Ainsi, les complexes ADN-Liposomes seront réalisés selon le rapport suivant pour un puits de plaque 6 puits à transférer : 1 µg d'ADN plasmidique pour 7 µL de lipofectamine. L'ADN est placé dans 100 µL de milieu de culture non complété dans un premier tube et la lipofectamine sera placée dans un second tube avec également 100 µL de milieu de culture non complété ; les deux tubes sont rassemblés afin de former les complexes liposomes-ADN durant 15 minutes à température ambiante. Puis les complexes sont mis en contact des cellules dans un milieu sans sérum, typiquement le milieu OPTI-MEM, durant 4 à 5h. Les liposomes étant toxique pour les cellules, le milieu sera changé 4 à 5 h plus tard afin de replacer un milieu de culture complet.

11. Analyse in Silico

Afin de réaliser des alignements multiples de séquences protéiques d'ATP8B1 ainsi que de ses homologues chez différentes espèces, nous avons récupéré des séquences en norme FASTA depuis la base de données Pubmed. La norme FASTA est la norme internationale de sauvegarde des séquences biologiques de toute nature. Les fichiers en forme FASTA possèdent les caractéristiques suivantes : ce sont des fichiers en texte brut dont le contenu

commence par le signe « > » suivi d'une désignation courte de la séquence présente, un espace sépare cette courte désignation d'un commentaire facultatif de 256 caractères maximum, puis un retour à la ligne est le point de départ de la séquence biologique ininterrompue représentée par les codes, éventuellement dégénérés, à une lettre des nucléotides ou des acides aminés. Les alignements multiples ont été réalisés avec le logiciel ClustalX 1.6.3 et 2.0.1.

Afin de connaître le profil général d'hydrophobicité d'ATP8B1, une analyse de Kyte-Doolittle (*Kyte and Doolittle 1982*) a été réalisée. Afin d'effectuer cette analyse, un score d'hydrophobie est attribué à chaque acide aminé entre -4.5 et 4.5, 4.5 correspondant au score le plus hydrophobe. Ensuite, avec une fenêtre de 19 résidus, le score moyen d'hydrophobie est recherché sur l'ensemble de la chaîne peptidique. Ce score d'hydrophobie correspond à la moyenne pour la fenêtre des 19 acides aminés et est attribué à l'acide aminé central de cette fenêtre. Si ce score moyen est supérieur à 1.8, on considère qu'un domaine transmembranaire peut être présent au niveau de ce segment. Afin de vérifier la localisation et l'orientation des domaines transmembranaires d'ATP8B1, une requête sur le serveur TMPred a été réalisée (*Stoffel 1993*). L'algorithme de recherche de ce serveur est basé sur une analyse statistique basée sur TMBase, contenant une base de données de l'ensemble des domaines transmembranaires naturels pondérés statistiquement, à laquelle s'ajoute le calcul des moments d'hydrophobicités et un test statistique sur l'orientation des domaines.

Différents serveurs (ELM (*Puntervoll et al. 2003*), PhosphoELM (*Diella et al. 2004*), MPR (*Fujii et al. 2004*) et Myhits (*Pagni et al. 2004*)) ont été utilisés pour analyser la séquence protéique d'ATP8B1 afin d'établir une représentation complète en 2D de la protéine. Ces différents serveurs reposent sur la recherche de motif consensus de type Prosite. La plateforme *Myhits* (<http://myhits.isb-sib.ch/>) repose sur l'interrogation de motifs Pfam (*Finn et al. 2006*), Prosite (*Gattiker et al. 2002*) et InterPro (*Mulder et al. 2007*). Le serveur ELM (<http://www.elm.eu.org>) est une initiative européenne qui permet la recherche de motifs linéaires auxquels viennent s'ajouter des filtres de recherche permettant de diminuer le nombre de faux positifs retenus. Ainsi, une recherche en fonction du compartiment cellulaire peut être réalisée par exemple. Ces séquences consensus répondent à des règles de présentation standardisées permettant leurs identifications. L'exemple fictif suivant

permet l'identification des différentes règles : C-x(4,7)-I-[NHG]-x-{GP}. Entre chaque tiret (-), se trouve la règle de définition d'un acide aminé. Ainsi, un acide aminé requis est explicité (I pour Isoleucine), x(4,7), signifie entre 4 et 7 acides aminés de n'importe quel type, [NHG] signifie que l'un de ces trois acides aminés est requis, {GP} signifie n'importe quel acide aminé à l'exception de glycine ou proline. Le serveur MPR, Mammalian Phosphorylation Mammalian Phosphorylation Resource (v1.0.1984.33243, <http://mpr.ncbi.nih.gov>), permet suite à des tests in vitro et la mise au point d'une matrice pondérée basée sur l'environnement d'un site de phosphorylation de connaître une probabilité d'activité d'un site de phosphorylation en fonction de la séquence encadrant ce site. La haute spécificité de cette environnement en fonction du type de kinase impliqué permet de connaître quel type de kinase est susceptible d'être active sur une séquence connue. Ces différents serveurs vont donc rechercher l'ensemble des séquences consensus identifiées sur la chaîne peptidique d'ATP8B1 en fournissant sous forme de tableau les occurrences trouvées.

Un modèle 3D partiel a été construit en utilisant le serveur d'homologie de SwissProt à partir de la structure d'une protéine obtenant le meilleur score d'homologie avec ATP8B1 (*Schwede et al. 2003*). Il s'agit de la structure du cristal de la calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA1). La structure proposée utilise donc le squelette de cette protéine avec un recalcul de la localisation tridimensionnelle pour les acides aminés divergeant. Le fichier contenant le modèle final est un fichier PDB contenant atome par atome, acide aminé par acide aminé la localisation des coordonnées dans un référentiel tridimensionnel. Différents logiciels ont été utilisés pour la visualisation de notre modèle : Rasmol (2.7.1.1), Pymol (0.99rc6) ou encore DeepView (v3.7). Ces logiciels permettent une rotation de notre modèle ou encore zoom, sélection, mise en surbrillance d'acide aminé, calcul de distance, ...

Enfin le serveur STRING (<http://string.embl.de>, v7.1) a été utilisé afin de rechercher les différentes interactions possibles d'ATP8B1 avec des partenaires, en particulier CFTR. Ce serveur analyse ainsi les données publiées de tout type (expérience, génomes séquencés, postulat via du Text-mining, nombre de co-citation de plusieurs protéines, protéines de fusions naturelles dans certaines espèces, ...) afin de fournir les liens connus ou envisageables entre différentes protéines. Les requêtes effectuées seront présentées pour

une seule espèce, choisie par l'utilisateur, tout en rassemblant les données fournies par des connaissances multi-espèces.

Toujours avec ce serveur, une autre approche, celles des COGs, sera effectuée. Cette approche, contrairement à la première, s'intéresse aux signatures fonctionnelles présentes dans les protéines d'intérêt. Ainsi pour ATP8B1, la signature P ATPase sera conservée. L'analyse se fait alors à partir de l'ensemble des interactions connues pour des P ATPases en multi espèces afin de voir par exemple si une P ATPase interagit via des domaines PDZ avec une autre protéine.

III- Résultats

1. Expression des gènes CFTR et ATP8B1

1.1 Synthèse d'ARN messager dans les cellules productrices

Afin de mesurer l'expression d'ARNm de *CFTR* et d'*ATP8B1*, nous avons utilisées des cellules immortalisées facilement cultivables représentant les tissus connus pour fortement exprimer ces protéines : le colon, les cholangiocytes ainsi que le poumon. Les cellules épithéliales du colon ainsi que de l'intestin entier sont connues pour exprimer CFTR (*Hirtz et al. 2004*). ATP8B1 est fortement exprimée dans les cholangiocytes, le poumon ainsi que tout au long du tractus gastrointestinal. Les lignées HT-29 (colon) et Mz-ChA-2 (cholangiocytes) ont été choisies comme témoins positifs car ces deux lignées ont déjà été caractérisées vis-à-vis l'expression de CFTR et nous avons contrôlé l'expression de la synthèse d'ARNm d'ATP8B1.

Pour cela, nous avons cultivé ces lignées cellulaires à confluence puis extrait les ARN totaux par la méthode du Trizol (Invitrogen). Nous avons ensuite effectué une Transcription reverse afin d'obtenir les ADNc correspondant, puis amplifié par PCR les séquences spécifiques aux produits d'expression des gènes *CFTR*, *ATP8B1* ainsi que celles de *GAPDH* et *Beta-Actine* comme standard interne.

La Figure 77 montre que les lignées HT-29, Calu-3 et Mz-ChA-2 expriment les gènes *CFTR* et *ATP8B1* identifiés par la présence de fragments de 559 pb pour ATP8B1 (pistes 3, 6, 9) et 630 pb pour CFTR (pistes 2, 5, 8) (Panneaux A et B).

Au contraire, les pistes 10, 11, 12 montrent que la lignée HTCR n'exprime ni CFTR ni ATP8B1 alors que la GAPDH est exprimée (Panneau B). La lignée HTCR dérive d'un hépatocarcinome et les hépatocytes sont caractérisés comme n'exprimant pas CFTR. De plus, nous avons pu montrer ici qu'ATP8B1 n'est pas non plus exprimé dans les cellules HTCR.

La lignée Byler, immortalisée au sein de notre laboratoire à partir d'un tissu hépatique de patient PFIC1 ainsi que la lignée Bric, provenant d'un clone spontané isolé d'un

tissu de patient BRIC ont été testées pour leurs expressions d'ARN messager pour *ATP8B1* et *CFTR*. Comme le montre le panneau C de la Figure 77, les cellules Byler et Bric expriment l'ARNm de *CFTR* et d'*ATP8B1*. Le contrôle interne utilisé lors de la réaction de PCR est soit la *Beta-Actine* soit la *GAPDH*.

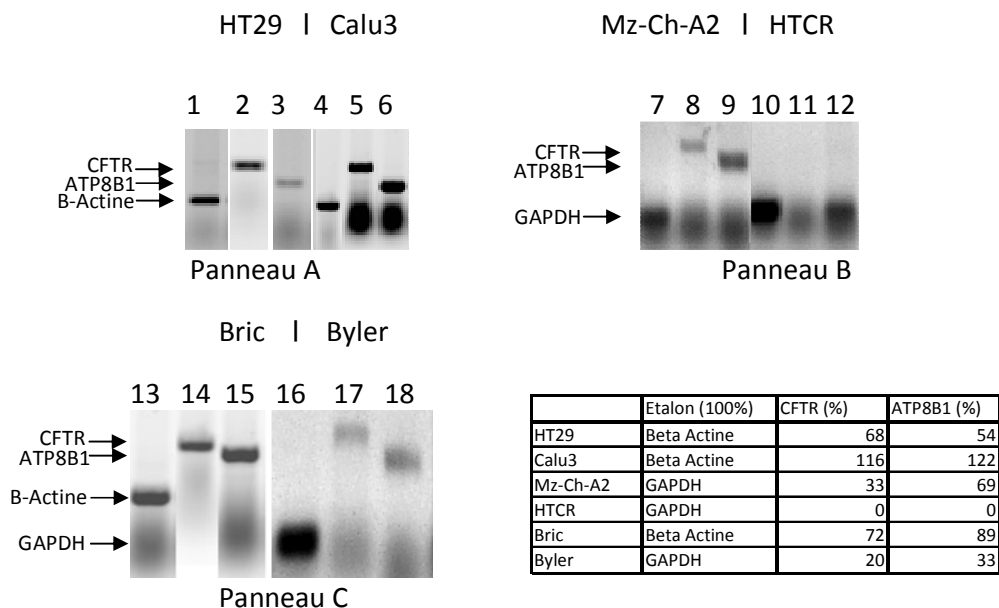


Figure 7 : Résultats de RT-PCR pour les lignées HT29, Calu-3 (Panel A); Mz-ChA-2, HTCR (Panel B) et Bric, Byler (Panel C).

Les pistes 1, 4 et 13 représentent les amplifications de la *Beta-Actine*. Les pistes 7, 10 et 16 représentent les amplifications de la *GAPDH*. Les pistes 2, 5, 8, 11, 14 et 17 représentent les amplifications de *CFTR* et les pistes 3, 6, 9, 12, 15 et 18 celles pour *ATP8B1*.

Des tests ont également été effectués avec la lignée Calu-3, exprimant les ARNs messagers de *CFTR* et d'*ATP8B1*. Différentes molécules ont été ajoutées au milieu de culture cellulaire standard durant 24h pour vérifier leur effet sur l'expression de ces gènes :

- Le PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) est un répresseur connu de l'expression génique de *CFTR* (Shen et al. 1993). Les concentrations finales utilisées sont 0,1 ou 0,2 mM.

- Le 4 α PDD (4 α - phorbol 12,13-didecanoate) est un homologue du PMA sans propriété biologique (Baird and Boutwell 1971). La concentration finale utilisée est 0,2 mM.
- La forskoline, lorsqu'elle est présente plus de 12h dans le milieu de culture cellulaire, permet une augmentation de la synthèse d'ARNm de CFTR. Sur un court laps de temps, la forskoline permet une augmentation de l'activité de CFTR donc de l'efflux ionique. La concentration finale utilisée est 0,2 mM.

Après 24h de traitement des cellules Calu-3 par ces composés, les ARN totaux ont été extrait puis, par Transcription reverse et PCR, les produits d'expression des gènes *ATP8B1*, *CFTR* et *Beta Actine* ont été recherchés. La quantification a été réalisée avec le logiciel Multigauge®. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 8.

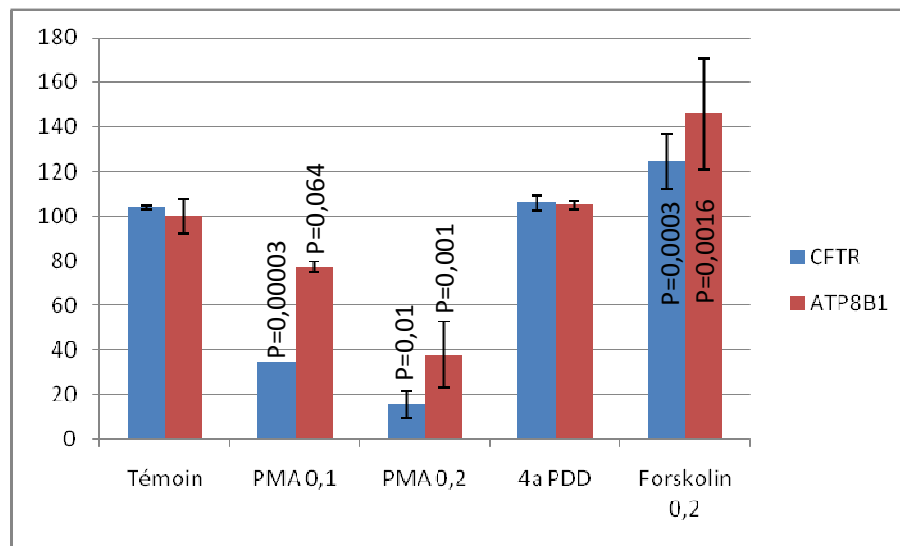


Figure 8: Expression relative normalisée par rapport à l'expression de la Beta Actine après 24h de culture en présence de PMA, 4aPDD ou forskoline (n=3). Test statistique Fisher-Snedecor entre une condition donnée et le témoin. La diminution observée entre les conditions PMA[0,1] et PMA[0,2] sont également significatives pour ATP8B1 (p=0,04) et pour CFTR (p=0,00001).

Ces résultats montrent une diminution du taux de synthèse de l'ARNm de *CFTR* ainsi que de celui d'*ATP8B1* pour les deux concentrations de PMA utilisées. De plus, la diminution de synthèse d'ARNm de *CFTR* et d'*ATP8B1* observée est proportionnelle à la concentration de PMA. Cette diminution est plus importante pour *CFTR* que pour *ATP8B1*, ce qui est attendu pour *CFTR* (Mogayzel et al. 2002). L'inhibition de l'expression d'*ATP8B1* observée ici confirme la corrélation de l'expression des gènes *ATP8B1* et *CFTR* mise en évidence chez certains patients PFIC1 et par les résultats d'expériences réalisées au laboratoire par Demeillers et col (2006).

Le 4 α PDD ne semble pas avoir d'effet sur la synthèse d'ARN messenger de *CFTR* et d'*ATP8B1* après 24h de culture des cellules. L'absence d'effet inhibiteur du 4 α PDD, analogue du PMA, confirme la spécificité de l'inhibition observée avec le PMA.

Enfin, l'exposition des cellules à la forskoline durant 24h en culture montre une légère stimulation de la synthèse d'ARNm de *CFTR* et d'*ATP8B1* (environ 20%).

Ces deux gènes donnent l'impression de répondre suivant le même schéma à la stimulation ou à l'inhibition de leur expression.

1.2 Synthèse protéique dans les cellules productrices

Nous venons de mettre en évidence la synthèse d'ARN messenger de *CFTR* et d'*ATP8B1* dans nos lignées cellulaires, nous allons maintenant rechercher la présence des protéines. A partir de cellules Calu-3, cultivées à confluence en bouteilles de type T75, nous avons extrait les protéines totales à l'aide du tampon de lyse RIPA (M et M). La concentration en protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford 1976).

Ces protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide (7,5 ou 10%) en condition dénaturante et réductrice, puis transférées sur une membrane de PVDF. Nos protéines d'intérêt ont été révélées avec des anticorps primaires spécifiques dirigés contre *CFTR* ou *ATP8B1*. Ces complexes ont ensuite été mis en évidence par des anticorps secondaires couplés à la phosphatase alcaline.

Des quantités croissantes de protéines extraites de cellules Calu-3 (20, 40 et 60 μ g) ont été analysées par SDS-PAGE, Western Blot et immunodétection. La Figure 9a (Panneau A) montre que les anticorps dirigés contre la partie C-Terminale d'*ATP8B1* révèlent la présence

de deux bandes sur la membrane dont les poids moléculaire associés sont environ 145 kDa et 90 kDa. L'intensité des bandes entre les pistes A (20 μ g), B (40 μ g) et C (60 μ g) semble directement proportionnelle à la quantité de protéines déposées.

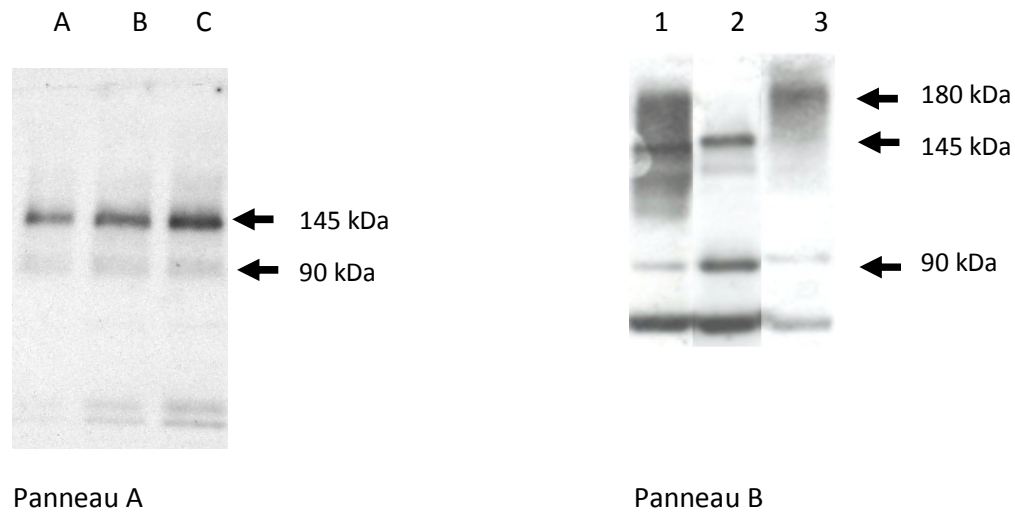


Figure 9a: Immunodétection d'ATP8B1 pour des quantités croissantes (20, 40, 60 μ g) de protéines totales de la lignée Calu-3 (Panneau A) et pour 80 μ g de protéines totales des lignées HT-29(1), Bric (2) et Byler (3) (Panneau B).

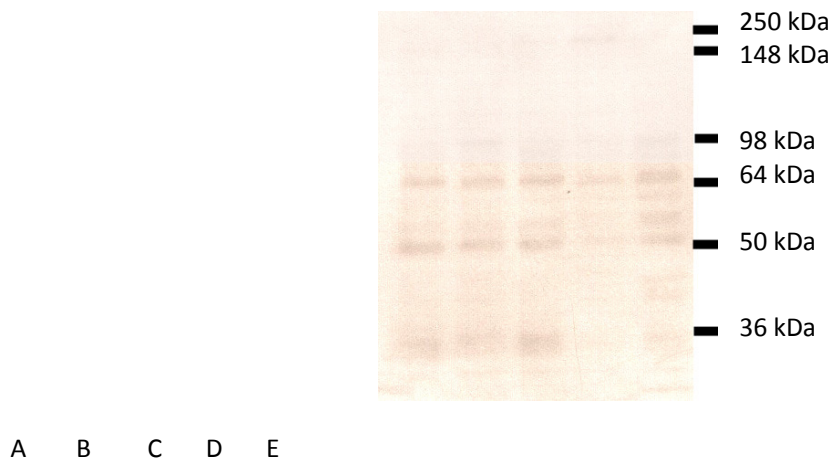


Figure 9b: Immunodétection par le serum préimmun 3001 pour 80 μ g de protéines totales des lignées IB3-1 (A), S9 (B) et HTCR (C) MZ- ChA-2 (D) et HT-29 (E).

La figure 9B montre le signal obtenu à partir du sérum pré immun ATP8B1. La révélation présentée ici correspond à un temps d'exposition de 30 minutes, contrairement aux 5 minutes utilisés en présence de l'anticorps 3001 anti ATP8B1 développé au laboratoire. Cette révélation montre une bande de 60 kDa environ ainsi qu'une bande de 50 et une

troisième de moins de 36 kDa, toutes trois de faible intensité et dans toutes les lignées utilisées.

A partir du même protocole, les lignées HT-29, Bric et Byler ont été utilisées afin de vérifier la présence d'ATP8B1. Une quantité supérieure de protéines totales (80 µg) ont été déposées sur gel car le niveau d'expression des ARNm d'*ATP8B1* est plus faible dans les lignées Bric et Byler. La lignée HT-29 (Figure 9a, B) permet une révélation identique à celle observée précédemment pour la lignée Calu-3 (Figure 9a, A) avec les deux bandes : l'une à 145 kDa et la seconde à 90 kDa. Toutefois, 2 autres bandes apparaissent : l'une faible à 130 kDa et une de plus forte intensité à environ 60kDa. La révélation d'un western blot à partir de protéines extraites de la lignée HT-29, effectué en présence du sérum pré-immun du lapin ne permet pas de détecter les bandes à 145 Kda, 130 kDa et 90kDa. La bande de 60 kDa par contre est aussi détectée par ce sérum. Il pourrait donc s'agir d'un signal non spécifique.

La lignée cellulaire Bric possède une mutation «frameshift» dans le gène *ATP8B1* (délétion d'une guanine dans le codon 1241) modifiant le cadre de lecture qui annule le signal naturel d'arrêt de traduction au codon 1252. L'absence de ce signal sur l'ARN messenger conduit à la production d'une protéine plus longue. Cette protéine de taille légèrement supérieure à 145 kDa est retrouvée dans nos cellules (Panneau B, piste 2). La lignée cellulaire Byler présente une transition de paire de base dans le codon 308 (G>T) du gène *ATP8B1*. Cela se traduit en position 308 par le remplacement d'une glycine par une valine. L'immuno-révélation du Western Blot sur ces cellules permet de révéler une bande à un plus haut poids moléculaire (180 kDa, 9a, Panneau B, piste 3). On aperçoit également une bande de faible intensité autour de 90 kDa. La protéine de 145 kDa n'est pas détectée dans cette lignée. La bande révélée à 180 kDa correspondrait au peptide de 1251 acides aminés après glycosylation et phosphorylation éventuelles. La bande à 145 kDa retrouvé chez les Bric, HT29 et Calu3 pourrait représenter une forme mature de la protéine ATP8B1 précédemment décrite dans la littérature (*Eppens et al. 2001; van Mil et al. 2004*). Enfin le peptide de 90 kDa pourrait être le résultat d'une maturation supplémentaire. Les anticorps utilisés pour la détection étant dirigés vers la partie C Terminale de la protéine permettent d'allumer ces différentes formes qui possèderaient cette partie en commun.

Ces mêmes expériences ont été réalisées avec les lignées HTCR, IB3-1 et S9. La lignée HTCR est une lignée issue de cellules provenant d'un hépatocarcinome qui n'exprime ni CFTR ni ATP8B1. Avec une quantité de 80 µg de protéines totales, les deux bandes à 90 kDa et à 145 kDa ne sont pas identifiables avec notre anticorps anti-ATP8B1. L'absence d'expression génique au niveau de cette lignée est donc ici confirmée.

La lignée IB3-1 est issue de cellules épithéliales bronchiques isolées d'un malade hétérozygote atteint de mucoviscidose. Elle possède les allèles CFTR porteurs de la mutation $\Delta F508$ sur l'un d'eux et W1282X sur l'autre. La lignée S9 correspond à la lignée IB3-1 corrigée pour l'expression de CFTR. Toujours avec une quantité de 80 µg de protéines totales (Figure 9b), les résultats du western blot pour les lignées HTCR et IB3-1 ne permettent pas d'identifier par immunodétections les peptides à 145 kDa et à 90 kDa. Par contre, le repérage d'une bande à 145 kDa à partir des cellules corrigées S9 montrent une expression de la protéine ATP8B1. L'absence du repérage de la bande à 90 kDa peut être expliquée par la faible intensité détectée de la bande à 145 kDa.

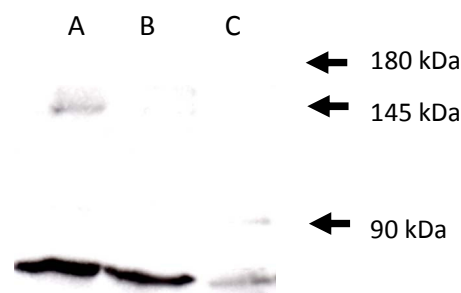


Figure 9c: Immunodétection d'ATP8B1 pour 80 µg de protéines totales des lignées S9 (A), IB3-1(B) et HTCR(C).

Comme nous avons identifié la présence d'ATP8B1 dans les extraits cellulaires Calu-3, Byler et Bric, nous allons rechercher la présence de CFTR.

La révélation par un anticorps anti-CFTR des protéines totales des cellules Calu-3 montre la bande typique attendue par immunodétection glycosylée et phosphorylée correspondant à la forme mature et fonctionnelle de la protéine (180 kDa). Cette bande de

180 kDa est appelé bande C. Une autre bande à environ 135 kDa (bande B) est également identifiable. Elle correspond à la forme « core-glycosylated » de CFTR, c'est-à-dire une forme de CFTR ayant subi une première maturation mais non encore adressée à la membrane plasmique. Ce sont les deux formes majeures observées dans les lignées cellulaires exprimant la protéine CFTR.

Pour les lignées Byler et Bric, la bande à 180 kDa peut être observée. Par contre, la bande B n'est pas révélée. Ayant travaillé à quantité constante de protéines, l'absence de la bande B est liée à la faible expression de CFTR. Par voie de conséquence, nous pouvons affirmer que pour les lignées Byler et Bric (mutants ATP8B1), le niveau d'expression de CFTR est faible, en corrélation avec la fonctionnalité d'ATP8B1. En effet, lorsqu'ATP8B1 n'est pas fonctionnelle (lignée Byler), on détecte très peu de CFTR mature. Lorsqu'ATP8B1 porte une modification provoquant le phénotype épisodique Bric, on observe beaucoup plus de CFTR mature.

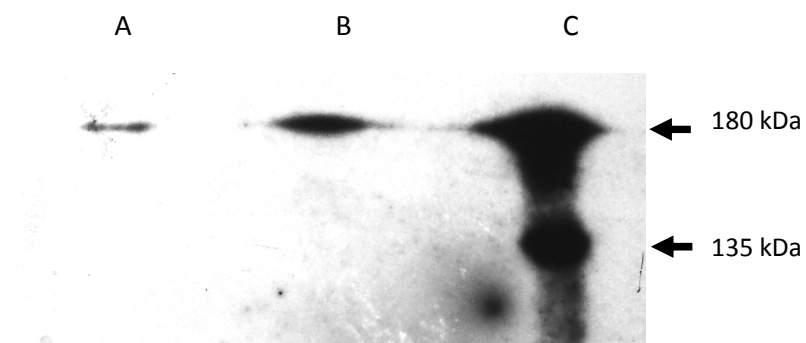


Figure 10: Immunodétection de la protéine CFTR pour 100µg de protéines totales extraites des lignées Byler (A), Bric (B) et Calu-3(C).

1.3 Immunofluorescence et localisation subcellulaire d'ATP8B1 et CFTR

Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées à partir de culture sur lamelle comme décrit dans la partie matériels et méthodes. L'anticorps utilisé pour réaliser ces expériences est l'anticorps 3001, dirigé vers la partie C-Terminale d'ATP8B1. L'anticorps anti-ATP8B1 est utilisé avec l'anticorps Texas Red, permettant une détection dans le rouge de la protéine ATP8B1. L'anticorps M3A7, dirigé contre CFTR est utilisé avec un anticorps Alexa Fluor 488 permettant une détection de CFTR dans le vert. Enfin les noyaux ont été colorés par un colorant spécifique du noyau, le Hoescht 33342.

Les résultats sont présentés pour les lignées Calu-3, Byler et Bric dans les figures ci-dessous. Les immunofluorescences nous montrent pour le panneau A la localisation de CFTR, pour le panneau B la localisation d'ATP8B1, pour le panneau C la coloration des noyaux, enfin le panneau D représente le rendu obtenu par fusion des 3 précédentes images. Ces expériences ont montré une localisation de l'expression d'ATP8B1 au niveau du réticulum endoplasmique, de la membrane plasmique (marquage moins évident) mais aussi au sein du noyau.

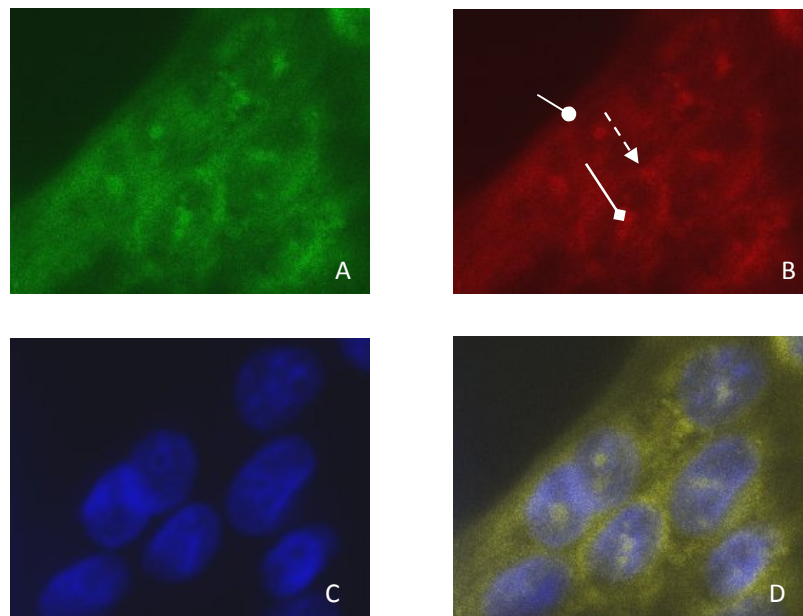


Figure 11: Détection par immunofluorescence d'ATP8B1 et de CFTR pour la lignée Calu-3

--> Marquage perinucléaire

—◆ Marquage nucléaire

Marquage de la membrane plasmique

La localisation de CFTR obtenue à la Figure 11 par immunofluorescence dans la lignée Calu-3 montre une expression de CFTR au niveau du réticulum endoplasmique autour du noyau coloré en bleu ainsi qu'au niveau de la membrane plasmique des cellules.

Cette seconde localisation représente la localisation de la protéine CFTR fonctionnelle au niveau de la membrane des cellules. Les cellules Calu-3 sont représentatives des cellules exprimant correctement et fortement CFTR.

La localisation d'ATP8B1 se caractérise autour du noyau, au niveau de la membrane plasmique (marquage moins évident) mais aussi au sein du noyau, ce qui n'a pas encore été décrit dans la littérature (panneau B). Le panneau D de cette figure montre également que la localisation autour du noyau de ces deux protéines semble confondue et montrerait ainsi une interaction possible à ce niveau de la cellule entre CFTR et ATP8B1.

Les immunofluorescences obtenues pour les lignées Byler et Bric représentent la localisation des protéines CFTR et ATP8B1 dans un contexte cholestatique sévère pour la lignée Byler et épisodique pour la lignée Bric.

Ainsi les panneaux A de la Figure 12 et de la Figure 13 montrent, comme pour la lignée Calu-3 une expression de la protéine CFTR au niveau de la membrane plasmique et autour du noyau de la cellule. L'intensité du signal pour la lignée Bric est supérieure à celle observée pour la lignée Byler, ce qui pourrait traduire un niveau d'expression plus important dans la lignée Bric que la lignée Byler.

Les panneaux B de ces mêmes figures montrent une expression d'ATP8B1 essentiellement autour du noyau et pour la lignée Bric au niveau de la membrane plasmique. Les Panneaux D montrent également, comme pour la lignée Calu-3, une localisation autour du noyau similaire, confirmant une localisation subcellulaire d'interaction possible.

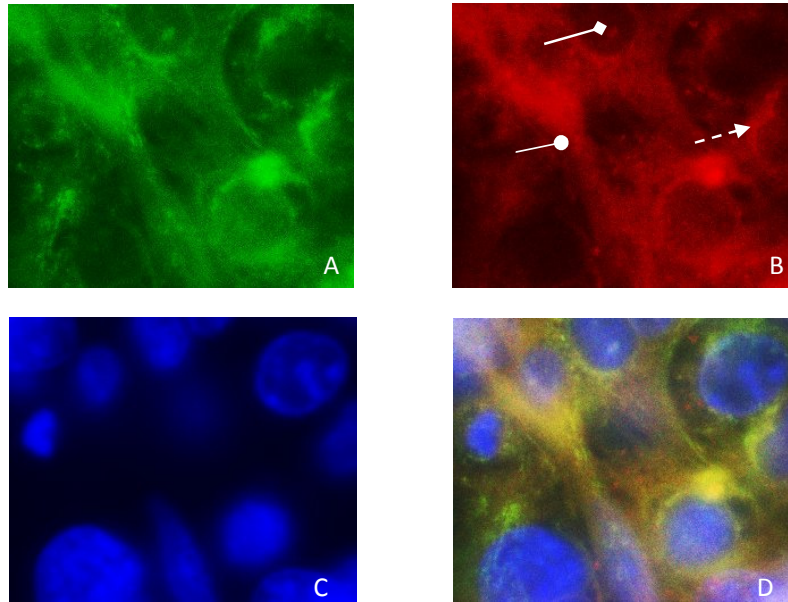


Figure 12: Détection par immunofluorescence d'ATP8B1 et de CFTR pour la lignée Bric

-- → Marquage perinucléaire

—◆ Marquage nucléaire

—● Marquage de la membrane plasmique

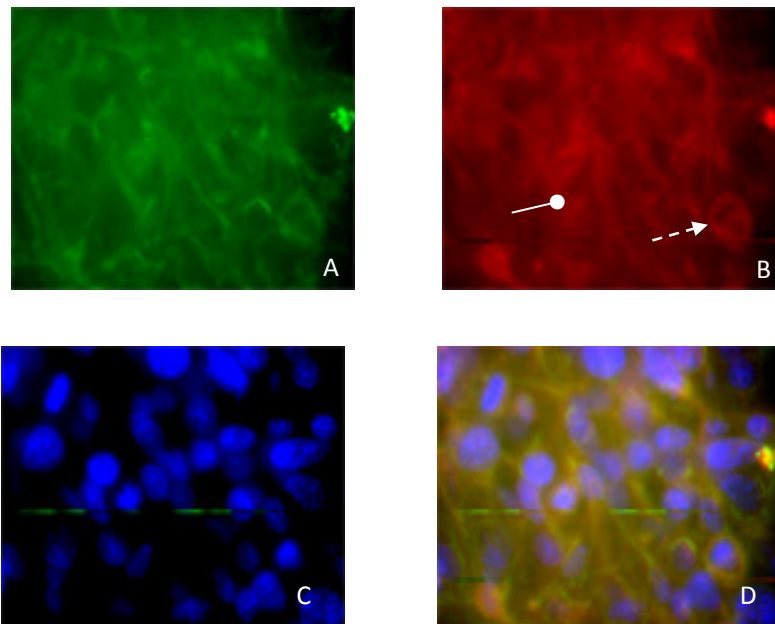


Figure 13 : Détection par immunofluorescence d'ATP8B1 et de CFTR pour la lignée Byler

Les résultats obtenus nous ont donc permis de montrer différents résultats intéressants sur la protéine ATP8B1. Ainsi l'expression d'ATP8B1 dans les lignées cellulaires étudiées est toujours corrélée à celle de CFTR. Aucune des lignées que nous avons étudiées n'exprime que l'une de ces deux protéines. Nous avons également pu révéler cette protéine avec un anticorps anti-ATP8B1 dirigé contre la région C-Terminale de la protéine et permettant la révélation d'un peptide de 145 kDa pour les lignées exprimant une protéine ATP8B1 mature.

Nos deux lignées d'intérêt Bric et Byler, portant le gène *ATP8B1* avec la mutation G1241fs et G308V respectivement nous ont également permis de montrer par immunodétection une protéine pour la lignée Bric de 145 kDa environ et pour la lignée Byler de 180 kDa environ. Par immunodétection une bande spécifiquement détectée par l'anticorps 3001 a également pu être identifiée et associée à un poids moléculaire de 90 kDa environ. L'anticorps 3001 est dirigé contre un fragment de la région C-Terminale d'ATP8B1. Cette région est spécifique de la protéine ATP8B1. En effet un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) réalisé à partir du segment reconnu par l'anticorps 3001 permet d'obtenir en résultat l'unique protéine ATP8B1. Ainsi cette bande de 90 kDa devrait correspondre à une forme clivée de la protéine ATP8B1.

Les résultats des expériences d'immunofluorescence ont permis d'identifier la localisation subcellulaire d'ATP8B1 pour une lignée exprimant la protéine complète ATP8B1 au niveau du noyau, du réticulum endoplasmique ainsi qu'au niveau de la membrane plasmique.

L'ensemble de ces résultats nous a conduit à engager une étude *in silico* de la séquence protéique d'ATP8B1 afin d'identifier les régions d'intérêts de cette protéine et d'entamer une étude structure-fonction pour ATP8B1.

2. Analyse *in silico*

Dans un premier temps, nous avons entamé une étude de similarité de la séquence ATP8B1 au sein des protéines de la famille des ATP8B chez *Homo sapiens*. Dans un deuxième temps, nous avons effectué cette même analyse par rapport à ces homologues au sein des

différentes espèces pour lesquelles la séquence de cette protéine était identifiée. Les alignements et leurs analyses ont été effectués avec le logiciel ClustalX (version 1.6.3 et 2.0.1) sous environnement windows XP ou windows Vista.

2.1 Alignement des séquences protéiques de la famille ATP8B chez *Homo sapiens*

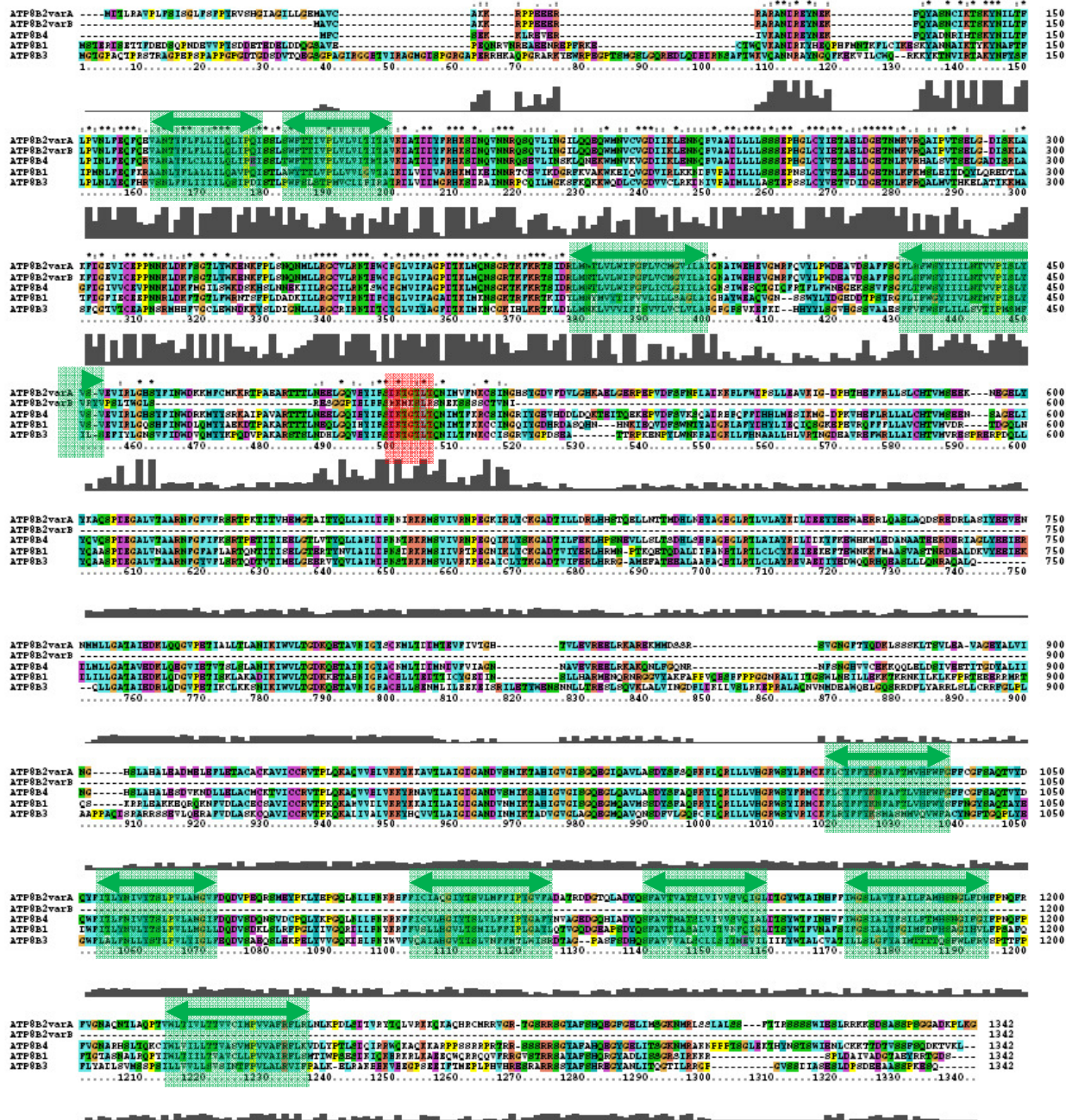
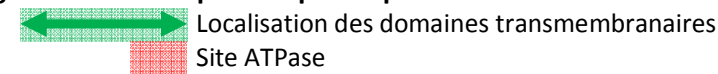


Figure 14 : Alignement des séquences protéiques des membres de la famille ATP8B chez *Homo sapiens*



La famille des ATP8B chez *Homo sapiens* représente des ATPases associées à la membrane. L'identité et la similarité entre ATP8B1 et ATP8B2A, ATP8B2B, ATP8B3 et ATP8B4 sont respectivement de 54%, 52%, 46%, 55% pour l'identité et de 70%, 70%, 65%, 71% pour les positifs.

L'analyse de l'alignement des séquences protéiques de la famille des ATP8B (**Figure 14**) montre une forte similarité des segments transmembranaires ainsi que de régions des domaines N terminaux et C-Terminaux. ATP8B2b est la seule protéine courte de 387 acides aminés alors qu'ATP8B1, ATP8B2a, ATP8B3 et ATP8B4 ont une longueur de 1200 à 1300 acides aminés.

Un gène unique code pour ATP8B2a et ATP8B2b. Les différences entre les deux protéines correspondent aux 30 premiers acides aminés d'ATP8B2a, qui ne sont pas présents pour la protéine ATP8B2b et les 30 derniers acides aminés d'ATP8B2b, la version la plus courte d'ATP8B2, qui ne possèdent aucune similarité avec la séquence protéique d'ATP8B2a. L'étude de la séquence ADN du gène ATP8B2 a montré un promoteur fort en amont de l'exon 1, correspondant aux 30 premiers acides aminés d'ATP8B2a comme nous le présentons dans la partie 2.10 de nos résultats.

Un second promoteur, plus faible, a pu être placé au sein de l'exon 1, permettant la transcription d'un second ARNm. Le transcrit initié par ce promoteur commencera au sein de l'exon 2 d'ATP8B2a et induira un épissage alternatif au sein de l'exon 10. En effet, la séquence des 30 acides aminés finaux d'ATP8B2b correspond à la traduction de la séquence intronique suivant directement l'exon 10. Les résultats obtenus par l'alignement de séquence nous permettent d'identifier 7 régions spécifiques à la famille des ATP8B.

Le gène *ATP8B2* est situé sur le chromosome 1 au locus 1q21.3. Ce gène est référencé dans les bases de données sous la forme de deux transcrits différents ATP8B2a et ATP8B2b. Le premier (NM_020452.2) correspond à la forme longue présentée précédemment et la seconde forme (ATP8B2b) est référencée sous le numéro d'accèsion Pubmed NM_001005855.1. Comme nous avons pu le décrire plus haut, les deux isoformes se distinguent par une région correspondant à 30 acides aminés en N-terminale présents sur

ATP8B2a uniquement et par une région en C-Terminale également de 30 acides aminés environ présente uniquement sur ATP8B2b.

Le premier exon d'ATP8B2a est très court, il correspond à 20 acides aminés (MDTLRAVPLFSISGLFSFPYR) et sur le chromosome à la séquence codante suivante :

A tgggaagcctagtaaatggggggtggggatggcagggaacttataagcctttcgagaaggg
P1

A tggagcctgcccAccctgtttcctgatgccctgccaggtgtttcctggctcatgttcct

A ccacccaccctttggggaaactgctttctagtaagcacaagcactactcattgccgcca

A gaacacatgagagcctccattgtccctgggatggataccttgagagctgttcccttttt
B M D T L R A V P L F

A tcaatatctggcctcttctcctttccctacaggcatgggctttgtaaagtctcagcccc
B S I S G L F S F P Y R P2

A ccatgtcacccaaggcaggggcAtgatgggaggtggtggggaagtccctctttcccagg

A aaccatcatggcagtaagaggagagactgggagaaggaggctgggggaggggcagggctc

A agagctggagaagaggggtctcaaaagaggtctcatgaggggaggggaagggttatcctca

A gcttcctgacctcattcgtctgtcacttcttgcagggctctcccatgggattgctgggatc
B R V S H G I A G I

A ttgctgggtgagatggcagtggt //
B L L G E M A V C //
C M A V C //

Fin de l'exon 10

A atcatcatcctcaacaccgttgtgccatttctactctatgt↓caggtatgtgccttctctg

B I I I L N T V V P I S L Y V intron 10

C I I I L N T V V P I S L Y V R Y V P S L

A acctggggtctctccagggagtcaggcgggccatagaacttttcttttctatgaagatg

C T W G L S R E S G G P I E L F F S M K M

A aagtccttgagaagtaacgagaagtcctcttcttctgtactgtaaacatttga^ggttat

C K S L R S N E K S S S S C T V N I Stop

Figure 15 : Comparaison des séquences d'ATP8B2a et ATPB2b

A : séquence du gène ATP8B2

B : séquence protéique de la protéine ATP8B2a (codée par 28 exons)

C : séquence protéique de la protéine ATP8B2b

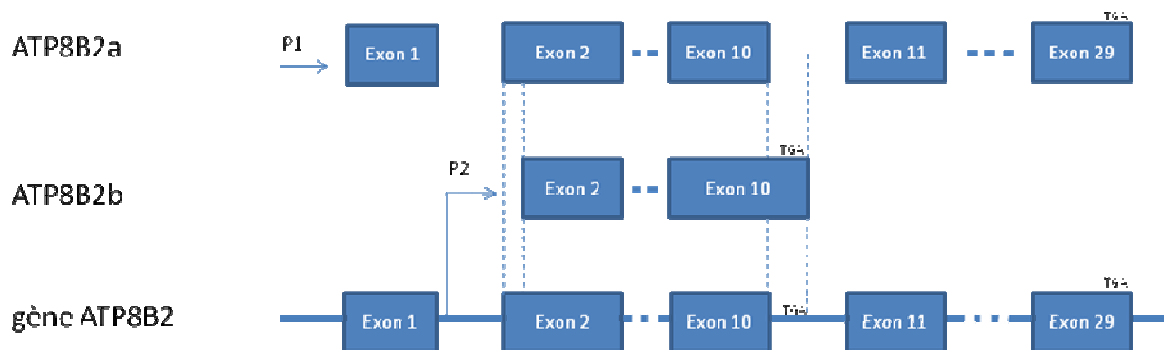
Les séquences d'intérêt ont été présentées sur la figure ci-dessus avec pour légende : la séquence spécifique à ATP8B2a correspondant à l'exon 1 et au début de l'exon2 en rouge (ATG en gras souligné), la séquence qui correspond à l'intron 1 est en italique, la séquence consensus de la TATA Box (P1) est également indiquée ainsi que la localisation du 5' de l'ARNm.

Ainsi, il semblerait que la TATA box (P2) de la forme la plus courte, ATP8B2b, soit localisée au sein de l'intron 1. A partir de la séquence en acides aminés d'ATP8B2b, il a été possible d'identifier le codon d'initiation de la traduction ainsi que sa position sur l'ARNm. La traduction des codons à partir de cet ATG permet une identité d'alignement avec la séquence protéique d'ATP8B2b figurant dans la littérature. A l'aide de la plateforme MFOLD, il est possible d'obtenir une représentation graphique de la structure 2D de la partie 5' de cet ARNm. De façon surprenante, cet AUG est présent au sein d'une structure en épingle, alors que la localisation typique d'un AUG permettant une initiation de la traduction se trouve en amont de 14 nucléotides d'une épingle relativement stable, capable de réduire la vitesse de la sous-unité 40S du ribosome telle que définit par M. Kozak (*Kozak 1990*). Différentes représentations de cette région de l'ARNm à partir de séquences nucléotidiques plus longues montrent de manière très fréquente la présence de l'AUG au sein d'une épingle de faible énergie. Or, Kozak, en 1986, avait montré que la présence d'un AUG au sein d'une épingle ne réduit pas le potentiel d'initiation de la traduction lorsque il s'agit d'une épingle de faible énergie comme c'est le cas de notre représentation (*Kozak 1986*). De plus, l'AUG d'initiation de traduction d'ATP8B2b se situe, de manière assez fréquente dans nos modèles, 17 nucléotides en amont d'une épingle énergétiquement stable. Enfin, l'organisation atypique de cette région, et de l'initiation de la traduction d'ATP8B2b semblerait cohérente avec une expression tissu-spécifique de ce variant du gène *ATP8B2*.

Il est important de noter que la forme la plus courte du transcrit du gène ATP8B2, le variant b, possède une très grande similarité avec le peptide 1-308 d'ATP8B1 que nous pensons correspondre au peptide signal d'ATP8B1.

Ainsi, il semble probable que deux promoteurs soient impliqués dans cette maturation. Le premier permettant la synthèse du premier exon d'ATP8B2 et ainsi la formation d'ATP8B2a comme le montre la figure ci-dessous.

Lors de la formation d'ATP8B2b, ce premier exon n'est pas transcrit et la traduction ne commence qu'à partir de l'ATG se trouvant au niveau d'une structure en épingle à cheveux permettant une traduction plus facile. Lorsque cette forme d'ATP8B2 est traduite, il semble que le signal correspondant à la localisation du 10^{ème} intron ne soit pas reconnu car la traduction continue alors au niveau de cet intron de la forme ATP8B2a pour la traduction des 30 acides aminés. A ce niveau de la séquence se trouve un codon stop TGA qui provoque la fin de la traduction.



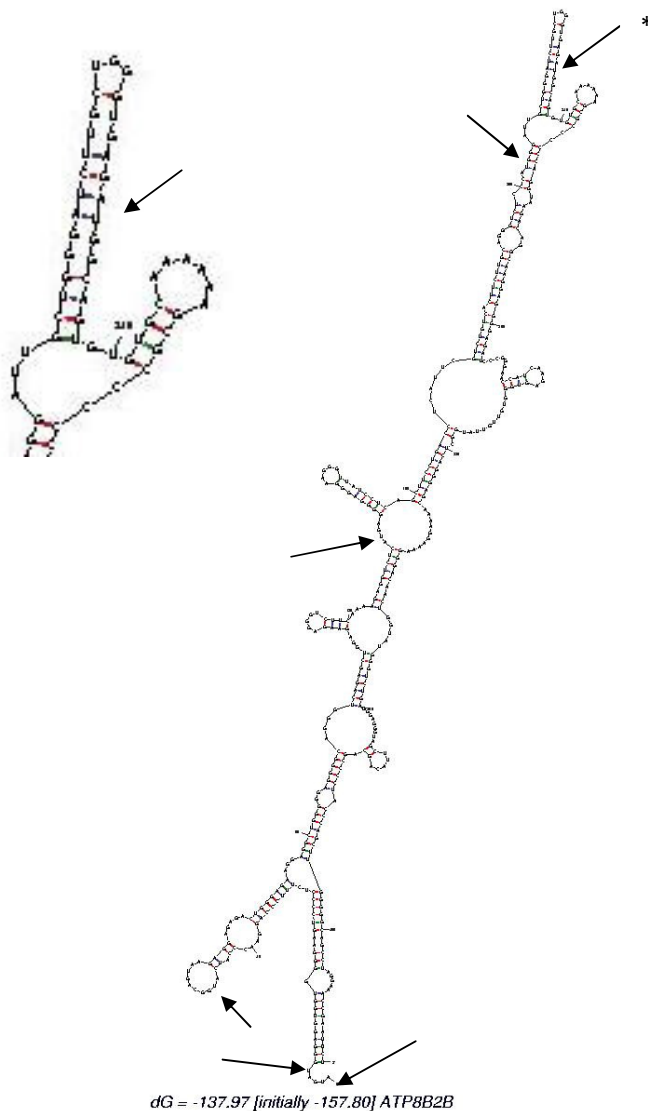


Figure 16 : Structure de la région ARN correspondant à la région différente entre ATP8B2a et ATP8B2b (MFOLD).

Les flèches indiquent la localisation des ATG possibles pour l'initiation de la traduction. L'ATG indiqué avec un astérisque représente le début de la traduction d'ATP8B2b, le variant le plus court des ATP8B2, dont manque les 30 premiers acides aminés de la séquence d'ATP8B2a.

2.2 Alignement de séquences protéiques ATP8B1 inter espèces

L'alignement de séquence inter-espèces d'ATP8B1 (Figure 17 et Tableau 4) montre une séquence hautement conservée au sein des espèces où la séquence d'ATP8B1 est disponible.

L'identité, ainsi que la similarité, entre les séquences de *Homo sapiens* et *Mus musculus*, *Canis familiaris*, *Ratus norvegicus*, *Xenopus tropicalis* pour ATP8B1 est respectivement de 94%, 94%, 93%, 76% pour l'identité et de 97%, 97%, 96%, 86% pour les positifs.

Les résultats obtenus entre ATP8B1 chez *Homo sapiens* et *Saccharomyces cerevisiae* DNF1P et DNF2P (ses homologues pour cette espèce) sont respectivement de 36%, 36% et de 54%, 55% pour les positifs. Les deux séquences d'ATP8B1 chez *Saccharomyces cerevisiae* (DNF1P et DNF2P) sont moins similaires en raison de 17 régions de 3 à 116 acides aminés qui ne sont pas retrouvées chez les autres homologues d'ATP8B1.

Les deux domaines N-Terminaux de DNF1P et DNF2P sont hautement spécifiques de ces protéines et n'ont aucune corrélation avec d'autres protéines connues.

Protéine	ATP8B1 <i>Mus musculus</i>	ATP8B1 <i>Ratus norvegicus</i>	ATP8B1 <i>Canis familiaris</i>	ATP8B1 <i>Xenopus tropicalis</i>	ATP8B1 (DNF1P) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATP8B1 (DNF2P) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Numéro d'accèsion	NP_001001488	Données du Laboratoire	XP_533394	NP_001025562	NP_011093	NP_010378

Tableau 4 : Numéros d'accèsion (Pubmed) des séquences utilisées

Protéine	ATP8B1 <i>Homo sapiens</i>	ATP8B2a <i>Homo sapiens</i>	ATP8B2b <i>Homo sapiens</i>	ATP8B3 <i>Homo sapiens</i>	ATP8B4 <i>Homo sapiens</i>
Numéro d'accèsion	NP_005594	NP_065185	NP_001005855	NP_620168	NP_079113

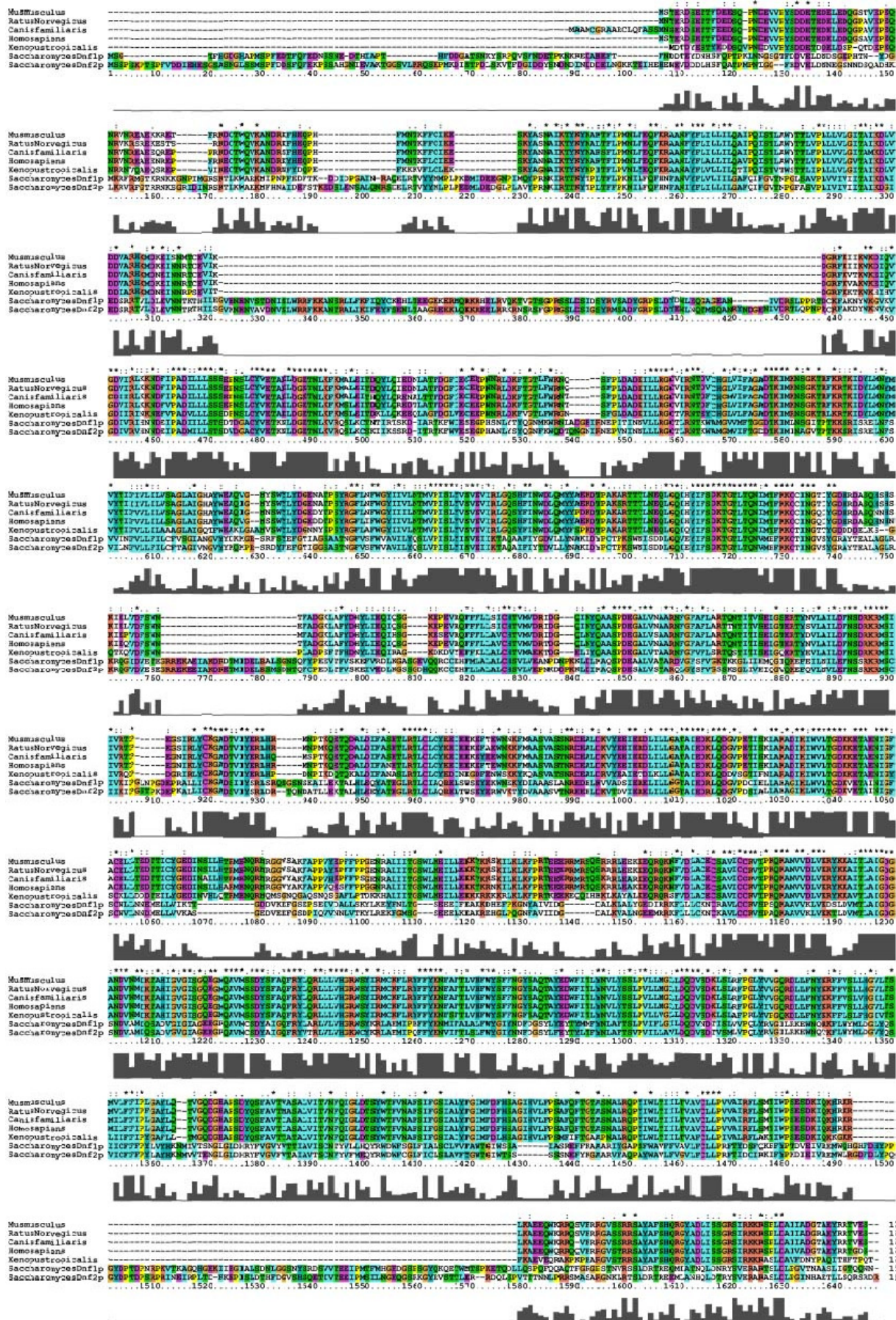


Figure 17 : Alignement inter-espèces des séquences identifiées d'ATP8B1

2.3 Hydrophatie générale et domaines transmembranaires d'ATP8B1

Nous avons décidé de tracer un profil d'hydrophobicité de la protéine en utilisant la méthode d'analyse développée par Kyte et Doolittle. Cette analyse permet à partir d'un score attribué à chaque acide aminé de donner une idée de l'environnement hydrophobe d'un segment de 19 acides aminés par le calcul du score moyen associé qui est déplacé sur la séquence. Comme le montre le diagramme de Kyte-Doolittle, ATP8B1 est globalement hydrophobe dans ses segments N et C-Terminaux. L'analyse de la structure secondaire d'ATP8B1 (diagramme de Kyte-Doolittle et analyse TMPred (serveur web : http://www.ch-embnet.org/software/TMPRED_form.html)) nous permet de confirmer la prédiction de la position des différents domaines transmembranaires de la protéine (Klomp et al. 2004). La présence d'hélices alpha au sein de la boucle cytosolique suggère l'existence d'un domaine hydrophobe structurellement défini au sein de la protéine.

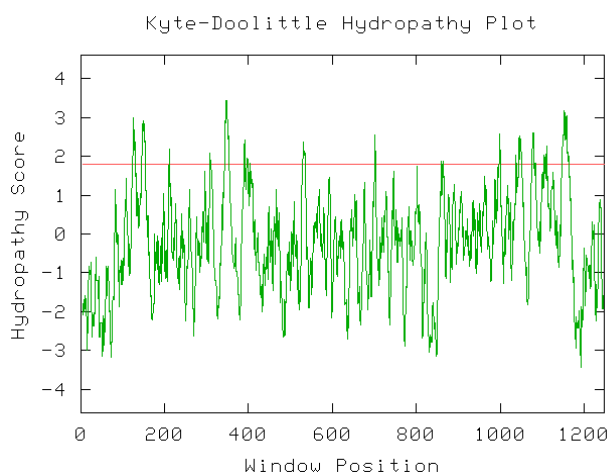


Figure 18: Diagramme de Kyte-Doolittle d'ATP8B1

Des analyses complémentaires en utilisant les propriétés de TMPred (analyse statistique de la fréquence d'apparition d'une séquence donnée en tant que domaine transmembranaire)(Tableau 5) (Stoffel 1993) ont permis de montrer la prédiction de 9 hélices alpha transmembranaires prédites avec un score de 15644. Le domaine 1(*) est ajouté en raison du haut score obtenu avec TMPred et de sa présence prédite par un autre serveur (Puntervoll et al. 2003). Par conséquent, nous obtenons 10 domaines transmembranaires avec une incertitude possible sur le premier domaine présenté. Cette structure à 10 domaines transmembranaires correspond à la structure typique des P ATPases de type IV.

L'interrogation du serveur TMPred montre aussi qu'ATP8B2a, ATP8B3 et ATP8B4 possèdent également de nombreux domaines transmembranaires ; 9 chez ATP8B2a et 10

chez ATP8B3 et ATP8B4. La protéine plus courte ATP8B2b ne possède que 5 domaines transmembranaires. Ces domaines sont alignés et les résultats sont présentés dans le Tableau 4. ATP8B3 a une expression unique au sein des testicules (*Harris and Arias 2003*). ATP8B2 (a ou b) est exprimée dans de nombreux tissus tels que l'aorte, l'ensemble du tractus digestif, la rate, le thymus, l'utérus, la prostate (*Harris and Arias 2003*). Ces protéines sont exprimées de façon plus importante au sein de l'utérus et de l'aorte. ATP8B4 est exprimée de façon quasi ubiquitaire avec une expression plus importante au sein des ovaires, du foie y compris au stade fœtal, et de la rate et de façon très modérée au sein du pancréas, du muscle squelettique et du cerveau (*Nagase et al. 2001*).

Ainsi, les domaines transmembranaires de ces différentes protéines peuvent se représenter de la manière suivante (données obtenues à partir de TMPred) :

	ATP8B1	ATP8B2a	ATP8B2b	ATP8B3	ATP8B4
Domaine 1	119-136 *		56 - 76	160-177	72-92
Domaine 2	140-157	102-124	76 - 93	177-195	233-256
Domaine 3	335-357	309-331	234 -256	381-400	276-294
Domaine 4	386-408	357-379	276-298	426-448	320-346
Domaine 5	959-976	904-923	318-340	964-985	881-901
Domaine 6	983-1003	938-957		1028-1046	904-924
Domaine 7	1033-1056	988-1010		1079-1101	955-978
Domaine 8	1069-1086	1025-1044		1115-1135	996-1012
Domaine 9	1097-1115	1051-1073		1138-1157	1019-1039
Domaine 10	1145-1163	1098-1120		1189-1207	1067-1085
Longueur	1251	1223	387	1300	1192

Tableau 5: Localisation et orientation des domaines transmembranaires des isoformes ATP8B

2.4 Construction de la représentation 2D d'ATP8B1

Le travail mené pour la représentation 2D d'ATP8B1 a également été réalisé auprès de ces différentes protéines afin de mieux les caractériser. Ainsi il a pu être montré une grande homologie entre ces différentes protéines. De façon plus intéressante, les motifs mis en avant pour ATP8B1 ont également pu être retrouvés au sein des différentes formes d'ATP8B.

L'analyse des résultats obtenus à partir de ELM (*Puntervoll et al. 2003*), Myhits (*Pagni et al. 2004*) et MPR à partir de la séquence protéique complète ainsi que l'analyse TMPRed présentée (Tableau 4) ont permis la construction d'un modèle 2D. L'ensemble de ces serveurs fournit, à partir de séquences FASTA, les réponses de l'identification de domaine consensus souvent associé à un score. Ces résultats sont fournis sous forme de tableaux chiffrés qui pour la séquence d'ATP8B1 ont fourni plus de 4000 lignes de résultats. L'analyse en croisant l'ensemble des résultats de ces tableaux a permis d'éliminer les séquences avec les scores les plus faibles et de ne conserver que les sites ayant une forte probabilité d'être actif au niveau de la protéine. La figure 19 montre une représentation de la séquence primaire de la protéine sur laquelle ont été localisés manuellement tous les sites d'intérêts retenus. L'analyse de la bibliographie des mutations répertoriées a permis de connaître la localisation des mutations connus afin de les positionner sur la séquence primaire d'ATP8B1. Il en ressort dans une première analyse une localisation entre certaines mutations connues et des domaines fonctionnels prédits. ATP8B1 pourrait être divisée en deux grands domaines transmembranaires (4 hélices alpha en N-Terminal et 6 dans le segment C-Terminal) ainsi que deux domaines cytosoliques (157-335 et 412-950).

Pour établir la localisation dans notre modèle des hélices transmembranaires, nous avons utilisés les résultats de TMPRed (Tableau 4) mais nous nous sommes aussi appuyés sur les résultats de localisation fonctionnelle d'ATP8B1. En effet, l'équipe d'Ujhazy (*Ujhazy et al. 2001*) a proposé la localisation d'ATP8B1 au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes, agissant comme une flippase de la phosphatidylserine. Nos expériences d'immunofluorescence (Figure 11, Figure 12 et Figure 13) ont montré une localisation d'ATP8B1 également autour du noyau. Cette localisation semble indiquer qu'ATP8B1 pourrait être présente au niveau du réticulum endoplasmique (RE). La phosphatidylserine pourrait ainsi être transportée du cytoplasme vers la membrane interne ou au sein de la lumière du RE. La phosphatidylserine a déjà pu être associée à la maturation de certaines protéines au sein du RE (*Eidelman et al. 2002*).

A l'inverse, les cinq domaines de l'autre cote de la membrane ne représentent en moyenne que 20 acides amines. Ce modèle 2D mets en lumière une forte corrélation entre certaines fonctions prédites (*Hulo et al. 2008*) et des mutations connues. Seules les

mutations provoquant des courtes délétions ou des mutations ponctuelles ont été retenus pour cette étude puisque des modifications du cadre de lecture ou des délétions importantes provoquent souvent des protéines tronquées ou immature. Les mutations retenues sont présentes sur l'ensemble de la séquence de la protéine.

L'ensemble des sites consensus d'intérêts ont été représentés sur ce modèle (site d'interaction protéique (PDZ), site de modification post-traductionnelle (myristoylation, glycosylation), signaux de phosphorylation (SH2, PKC, Tyrosine kinase, caséine kinase) . Cette grande quantité d'information n'a pas permis de pousser l'investigation expérimentale sur l'ensemble des domaines d'étude. Notre travail se concentrant dans un premier temps sur les domaines consensus contenant des mutations connues provoquant une cholestase intra hépatique familiale progressive de type 1 ou une cholestase intra hépatique bénigne récurrente. Toutefois, l'étude de l'ensemble des domaines identifiés sera poursuivie dans le cadre d'un développement futur des recherches au sein du laboratoire français d'accueil.

2.5 Domaines transmembranaires et site ATPase

On observe ainsi une architecture globale de la protéine hautement conservée. La forme la plus courte d'ATP8B, l'isoforme 2b, correspond par alignement au fragment N-Terminal de la protéine, soit par comparaison à ATP8B1 au fragment 40-406. Le segment correspondant au segment 340-387 d'ATP8B2b est spécifique de cette isoforme et ne partage aucune similarité avec les autres ATP8B. ATP8B2b, de façon surprenante ne contient donc pas de domaine ATPase puisque le domaine ATPase des ATP8B se situe une centaine d'acides aminés après le fragment correspondant à ATP8B2b.

Cependant, l'isoforme ATP8B2a est elle beaucoup plus proche d'ATP8B1. En effet, sur cette protéine on retrouve l'organisation en deux grands segments transmembranaires regroupant 4 domaines en N-terminal, une grande boucle cytosolique et 6 domaines transmembranaires en C-Terminal. On retrouve la signature du domaine ATPasique en position 425-441, ce qui représente comme pour ATP8B1 une distance de 50 acides aminés environ la séparant du domaine transmembranaire précédent.

La structure d'ATP8B4 est également proche de celle d'ATP8B1 et d'ATP8B2a puisque la protéine se découpe également en deux grands domaines transmembranaires, l'un en N-Terminal (4 domaines) et le second en C-Terminal (6 domaines). Le domaine ATPasique d'ATP8B4 se situe en position 402-418, soit encore une fois environ 50 acides aminés après le domaine transmembranaire précédent (320-346).

La structure d'ATP8B3 enfin possède la même organisation générale. Les 4 domaines transmembranaires N-Terminaux et les 6 domaines C-Terminaux permettent la formation d'une grande boucle cytosolique (segment 448-964). La fonction ATPase est portée par la région 502-518 correspondant à la séquence SDKTGTLTQNIMTFKRC.

ATP8B1 appartient à la famille des ATPases de type P ayant une activité de transport des phospholipides (*Tang et al. 1996*). Des mutations appartenant au domaine ATPase de ATP8B1 peuvent provoquer une forme pathologique PFIC1 (P) ou BRIC (B). Les mutations S453Y (B), D454G (B) and T456M (P) sont localisées au niveau de l'unique domaine E1-E2 ATPase. Aucune autre mutation connue n'intervient directement dans ce domaine. Ce

domaine hautement conservé est caractéristique de la famille des ATPases, et des mutations dans ce domaine peuvent altérer ou inhiber la fonction ATPasique de la protéine. Les mutations BRIC concernent les acides aminés en amont du site ATPase ce qui peut probablement produire un défaut local de structure du peptide. Le phénotype PFIC1 est directement relié à la perte d'une thréonine qui est très importante pour le site consensus du domaine ATPase (pattern consensus DKTGTLT) (Hulo et al. 2008). De plus, la substitution de cette thréonine par une méthionine semble introduire une modification conformationnelle en augmentant l'hydrophilie locale (-0.5 au lieu de -1.0 sur le profil d'hydrophobicité de Kyte Doolittle).

2.6 Domaines de phosphorylation

Le recensement des sites de phosphorylation de la protéine donne 31 sites potentiels phosphorylables de la protéine ATP8B1 par une

	:***.*****	
Musmusculus	DFNSDRKRMSI	605
RatusNorvegicus	DFNSDRKRMSI	604
Canisfamiliaris	DFNSDRKRMSI	622
Homo sapiens	DFNSDRKRMSI	605
Xenopus tropicalis	DFNSDRKRMSI	603
SaccharomycesDnf1p	EFNSSRKRMSC	851
SaccharomycesDnf2p	EFNSSRKRMSC	896

Protéine Kinase A ou C ou une Caséine kinase. A ce jour, on n'a aucune évidence sur la fonctionnalité de chacun de ces sites.

Figure 20 : Alignement inter-espèces d'un domaine de phosphorylation d'intérêt d'ATP8B1

Cependant, une première approche visant à identifier les domaines consensus colocalisés avec des mutations connues chez des patients PFIC1 ou BRIC a été entreprise. Au sein d'un domaine de phosphorylation hautement conservé chez les ATP8B1 inter-espèces, un regroupement de mutations (R600Q (B), R600W (B) et R602X (P)) a pu être identifié. Ce regroupement est dans la région F595-S605 dont la séquence est FNSDRKRMS. Cette région correspond à deux domaines consensus différents de phosphorylation par la PKC dont le site consensus inversable est [ST]-x-[RK] (Hulo et al. 2008). Ce domaine est hautement conservé au sein des différentes formes d'ATP8B1, même celles présentes chez *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 17).

Ainsi, l'efficacité de la phosphorylation de la serine 598 par la PKC et celle de la serine 604 par la Protéine Kinase C delta ou la Protéine Kinase A pourrait être altérée par ces mutations. Les patients portant la mutation R602X développent un PFIC1 probablement en raison de la signature 602-RMS-604 perdue, et ce, même si le motif 598-SDR-600 n'est pas modifié. Le domaine 602-RMS-604 semble donc primordial au bon fonctionnement d'ATP8B1. L'analyse réalisée ici nécessite une vérification expérimentale de la

phosphorylation de ce motif ainsi que l'importance de ce motif dans la fonction d'ATP8B1 par mutagenèse dirigée.

Les patients portant les mutations R600Q ou R600W présentent un phénotype BRIC. Même si le motif 598-SDR-600 est altéré, une phosphorylation par la PKC peut intervenir et la protéine peut donc être fonctionnelle. Ce fait semble indiquer que la serine 598 n'est pas essentielle à la fonction d'ATP8B1. En conclusion, ces trois mutations pourraient toucher des domaines consensus et par conséquent modifier la phosphorylation de la serine 604 et/ou de la serine 598 en inhibant l'accès de ces sérines aux kinases. En effet, les mutations R600Q, R600W and R602X remplacent des acides aminés positifs polaires par des acides aminés polaires non chargés. Enfin, l'Arginine 602 pourrait également faire partie d'un site potentiel de phosphorylation par une protéine kinase dépendante de l'AMPc dont le site consensus est KRMS, renforçant l'importance de cette région pour la fonction d'ATP8B1.

D'autres patients PFIC1 portent les mutations Y500H (P) ou D554N (P). Ces acides aminés, tyrosine 500 et acide aspartique 554 sont directement localisés sur des sites consensus de phosphorylation par la Caséine Kinase II. 16 autres sites de phosphorylation par la CKII sont répandus tout au long de la molécule (Figure 17) mais n'ont pas été associés à des mutations d'ATP8B1.

2.7 Myristoylation

Le site de myristoylation proposé pour ATP8B1 en position 556 est également hautement conservé au sein des formes longues d'ATP8B.

	ATP8B1	ATP8B2a	ATP8B2b	ATP8B3	ATP8B4
Séquence du site de clivage	SPDE	SPDE	N/A	SPDE	SPDE
Localisation du site de clivage	552-555	527-530	N/A	595-598	495-498
Séquence consensus de myristoylation	GALVNAA RN	GALVTAARN	N/A	GALVTAARN	GALVTAARN
Localisation de la glycine myristoylée	556	531	N/A	599	499

Tableau 6 : Alignement au sein de la famille des ATP8B chez *Homo sapiens* d'un site d'intérêt de myristoylation

Ainsi la myristoylation des P ATPases de type IV semble pouvoir intervenir pour chacune de ces formes puisque la signature du clivage caspase précède directement celui du site consensus de myristoylation. Il est intéressant de noter que cette signature pour ATP8B1 est légèrement différente par rapport aux autres membres de la famille des ATP8B comportant cette région de la protéine. En effet, le site consensus est G-{EDRKHPFYW}-x-x-[STAGCN]-{P}. Il correspond donc aussi bien en position 5 à la présence d'une asparagine pour ATP8B1 qu'à celle d'une thréonine pour ATP8B2a, ATP8B3 et ATP8B4. La lecture de ce pattern s'effectue suivant la règle suivante :

- G obligatoire en position 1, et nécessairement en N-Terminal
- N'importe quel acide aminé à l'exception de « EDRKHPFYW » en position 2
- N'importe quel acide aminé en position 3 et 4
- L'un des acides aminés suivants « STAGCN » en position 5
- N'importe quel acide aminé sauf une proline en position 6

Douze sites possibles de myristoylation ont pu être identifiés sur la séquence d'ATP8B1, répartis sur l'ensemble de la protéine (Figure 17). Deux de ces domaines incluent des mutations provoquant un phénotype de type PFIC1. Il s'agit des mutations D554N (P), K709fs (P). Une mutation de type BRIC 795delGNR (B) est également colocalisé avec un site possible de myristoylation. Aucun autre site prédit de myristoylation ne comporte de mutations connues.

La mutation K709fs est le résultat de l'insertion de 20 nucléotides induisant l'addition de 6 acides aminés ainsi que la présence d'un changement de cadre de lecture sur la fin de la protéine. Ce changement de cadre de lecture provoque une modification importante de la protéine ce qui peut la rendre inopérante et ne semble donc pas relié au site de myristoylation (Tableau 6).

Un patient BRIC porte une délétion de trois acides aminés (Glycine 795, Asparagine 796 et Arginine 797) sur un site potentiel de myristoylation. La perte de ces acides aminés semble altérer la fonction d'ATP8B1 sans toutefois la rendre complètement non fonctionnelle. La perte de ces acides aminés peut provoquer un changement conformationnelle dans ce segment ou une modification du repliement de cette région importante de la protéine, provoquant un phénotype BRIC.

D'après notre étude, le site potentiel d'intérêt est le site localisé sur la séquence 552-SPDEGALVNAARNFG-566 d'ATP8B1. L'environnement de la glycine 556 est par conséquent modifié par la mutation D554N qui empêche le clivage par une caspase (*Hulo et al. 2008*) du site consensus 552-SPDE-555. Si le site de clivage est masqué, la libération d'une glycine N-terminale ne peut intervenir et par conséquent la myristoylation ne peut avoir lieu. De plus, ce segment suit directement un pic d'hydrophobicité, selon le diagramme de Kyte-Doolittle (Figure 18). Il semble donc possible que cette interaction entre une région hydrophobe et la membrane favorise la myristoylation de la glycine 556 après clivage.

Par conséquent, la différence de séquence en position 5 de ce motif ne modifie pas la possibilité d'obtenir une myristoylation à partir de ce segment. Il est important que le site caspase soit actif afin de libérer la glycine qui se retrouvera en N-terminal du nouveau fragment présent.

De plus, ATP8B3 se distingue des autres protéines de cette famille par la localisation en N-Terminale de la protéine d'une séquence signal de myristoylation. Cette caractéristique ainsi que l'expression tissu-dépendante de cette protéine correspond à une singularité de cette protéine.

2.8 Liaisons aux récepteurs nucléaires

Le signal NRBox, correspondant au pattern LXXLL est également retrouvé au sein des différentes formes d'ATP8B, à l'exception de l'isoforme ATP8B2b. On retrouve ainsi ce signal aux positions décrites dans le tableau ci dessous, toujours dans un environnement proche du domaine transmembranaire le plus proche.

	ATP8B1	ATP8B2a	ATP8B2b	ATP8B3	ATP8B4
Séquence du site de la NR Box	LQRLL	LQRLL	N/A	LQRLL	LQRLL
Localisation de la NR Box	931-937	885-891	N/A	977-983	853-859
Localisation du domaine Transmembranaire le plus proche	959-976	904-923	N/A	964-985	881-901
Distance en aa	28	19	N/A	0	28

Tableau 7 : Alignement au sein de la famille ATP8B chez *Homo sapiens* du domaine NRBox

ATP8B3 se distingue ici au niveau de la distance séparant la NR Box du plus proche domaine transmembranaire. Il apparait donc que dans le cas d'ATP8B3 ce signal ne puisse être actif puisqu'il est précisément inclus dans la membrane. Pour les autres protéines, ATP8B1, ATP8B2a et ATP8B4, ce signal pourrait être actif et donner un rôle de régulateur de l'expression génique à ces protéines comme il a déjà été proposé dans un article pour ATP8B1 (*Demeilliers et al. 2006*).

La séquence protéique d'ATP8B1, présente au sein de sa région C-terminale, un domaine de liaison au récepteur de la membrane nucléaire NRBox situé entre la tyrosine 931 et la leucine 937. La séquence YLQRLL correspond à la séquence consensus LXXLL du domaine NRBox. Ce domaine est localisé entre deux signaux de liaison au Signal Transducers and Activators of Transcription type 5 (STAT5): 931-YLQR-934 et 944-YIRM-947 respectivement dont la séquence consensus est Y-[VLTFIC]-X-X. Ce segment contient également un domaine de phosphorylation par la PKA comprenant la sérine 943. Il est également proche du domaine transmembranaire (Phénylalanine 950 à Sérine 969). Cette région d'ATP8B1 présente donc toutes les caractéristiques afin de pouvoir interagir avec un domaine d'interaction avec la membrane nucléaire.

Enfin, cette séquence consensus permet l'interaction avec SHP (*Johansson et al. 2000*), protéine dont l'expression génique est altérée chez les patients *PFIC1* (*Demeilliers et al. 2006*). Il semble donc possible que toutes les protéines ATP8B1 matures, ou plus probablement le segment myristoylé G556-S1251 interagissent via le domaine NRBox afin d'être internalisées au sein du noyau. Cette hypothèse suggère donc que la version tronquée d'ATP8B1 puisse jouer un rôle de régulateur transcriptionnel en association avec STAT5. Cette hypothèse est également corroborée par des résultats que nous avons déjà publiés (*Demeilliers et al. 2006*) montrant une diminution de la transcription de CFTR lorsque l'expression d'ATP8B1 est supprimée via l'utilisation de siRNA spécifique. Nous avons également observée par PCR Temps Réel que l'ADNc provenant de foie de patients *PFIC1* montraient une diminution très importante de la synthèse d'ARNm de CFTR (*Demeilliers et al. 2006*). Enfin, nos immunofluorescences (Figure 11, Figure 12 et Figure 13) montrent une expression d'ATP8B1 au niveau du noyau.

2.9 Mutations et domaines transmembranaires

Certaines mutations connues interviennent au sein des domaines transmembranaires prédits d'ATP8B1. Ces mutations sont L127P (P), I344F (P), S403Y (P), N958fs (P), R952X (P), G1040R (P) et L1047fs (P). Toutes ces mutations peuvent, en raison de leurs localisations, modifier localement le potentiel hydrophobe de la protéine codée et perturber ses points d'ancrage au sein du RE ou de la membrane plasmique. Certaines de ces mutations doivent perturber la maturation ou l'adressage de la protéine conduisant les protéines non fonctionnelles au protéasome.

2.10 Maturation proposée au niveau du site de clivage G308 d'ATP8B1

Le signal G308 pour ATP8B1 correspondant au site de clivage proposé est un motif hautement conservé au sein de la famille des ATP8B puisque même la forme la plus courte possède ce signal. Il intervient au sein de ces différentes protéines dans les régions identifiées ci-dessous :

	ATP8B1	ATP8B2a	ATP8B2b	ATP8B3	ATP8B4
Glycine	308	278	245	350	245
TM le plus proche	335-357	309-331	276-298	381-400	276-294
Distance en aa	27	31	31	31	31

Tableau 8 : Alignement du site contenant la Glycine 308 d'ATP8B1 au sein de la famille ATP8B chez *Homo sapiens*

```

Musmusculus      . *:::* * *****
RatusNorvegicus  CHGLVIFAGADTKIM
Canisfamiliaris  CHGMVIFAGADTKIM
Homosapiens      CHGLVIFAGADTKIM
Xenopustropicalis CHGLVLFAGADTKIM
SaccharomycesDnflp AMGVVVFEGGDTKIM
SaccharomycesDnf2p AMGMVIFEGGDTKIM

```



On note ainsi que la distance séparant ce site de clivage de la membrane est conservé.

La mutation G308V est localisée au niveau d'un site de clivage impliqué dans la maturation de la protéine. Cette mutation est la plus courante au sein de la communauté amish. L'existence au niveau de la séquence d'une valine remplaçant une glycine fait disparaître ce domaine de clivage et donc la maturation d'une pré-protéine. Donc, l'hypothèse suivant laquelle la forme non clivée d'ATP8B1 ne puisse obtenir un repliement

convenable ou ne puisse être exportée correctement peut être formulée; la protéine étant non fonctionnelle.

Le diagramme hydropathique (Figure 18) montre que la glycine 308 se trouve dans un environnement local très hydrophobe, suggérant ainsi une possible interaction de ce segment avec la membrane du réticulum endoplasmique au niveau du site de reconnaissance par une signal-peptidase. Lorsque le gène porte la mutation G308V, la protéine exprimée est révélée avec un poids additionnel de 30 kDa (Figure 9). Ce peptide de 30 kDa pourrait donc correspondre aux 308 premiers acides aminés de la forme pro-ATP8B1. Il est important de noter que l'environnement de la G308 est hautement conservé au sein des différentes ATP8B1 inter-espèces et au sein des protéines de la famille des ATP8B comme le montre la Figure 14 ainsi que la Figure 17.

2.11 Construction d'un modèle 3D partiel d'ATP8B1

Afin de compléter les informations obtenues à partir de la structure secondaire d'ATP8B1 et de la représentation 2D réalisée, nous avons élaboré une modélisation partielle de sa structure tertiaire. Pour cela, nous avons utilisé l'homologie existante avec la calcium ATPase du réticulum sarcoplasmique dont la structure 3D a déjà été réalisée (RCSB :1SU4) (*MacLennan and Green 2000*). Cette protéine cristallographiée possède la séquence la plus proche de celle de notre protéine (48% pour la région 101-865, Gap 141 acides aminés dont certains segments partagent 80% de similarité) (Figure 21). A partir de ces résultats, nous avons utilisé le serveur d'homologie Swissprot afin de construire, notre représentation 3D pour la région 101-865. Malgré la faible identité correspondant à la limite basse à partir de laquelle on peut réaliser un modèle par homologie (*Baker and Sali 2001*), nous avons tenté la construction de ce modèle qui peut représenter une approximation importante de la structure de la protéine (environ 25% d'identité entre la séquence du modèle 1SU4 et celle d'ATP8B1 chez *Homo sapiens*). Il faut toutefois noter que dans le cas de protéines membranaires, peu de protéines modèles ont déjà pu être cristallographiés.

Cette région d'ATP8B1 peut être divisée en deux grands domaines d'intérêts. Le premier représente les 4 hélices alpha parallèles (119-136, 140-157, 335-357 and 386-408) correspondant aux 4 premiers domaines transmembranaires d'ATP8B1 (en bleu Figure 21). Les domaines extramembranaires courts sont représentés en haut en blanc sur la même figure (segments 136-140 en jaune et 357-386 en rouge). La partie restante de la protéine inclut deux segments, 157-335 et 408-865, qui sont repliés afin de former un seul grand domaine globulaire (Figure 21). La partie la plus proche de la membrane de ce domaine globulaire, au plus près des domaines transmembranaires, contient le domaine ATPasique (mauve) et la partie la plus éloignée contient les deux domaines de phosphorylation incluant la serine 598 et la serine 604 (en bleu clair).

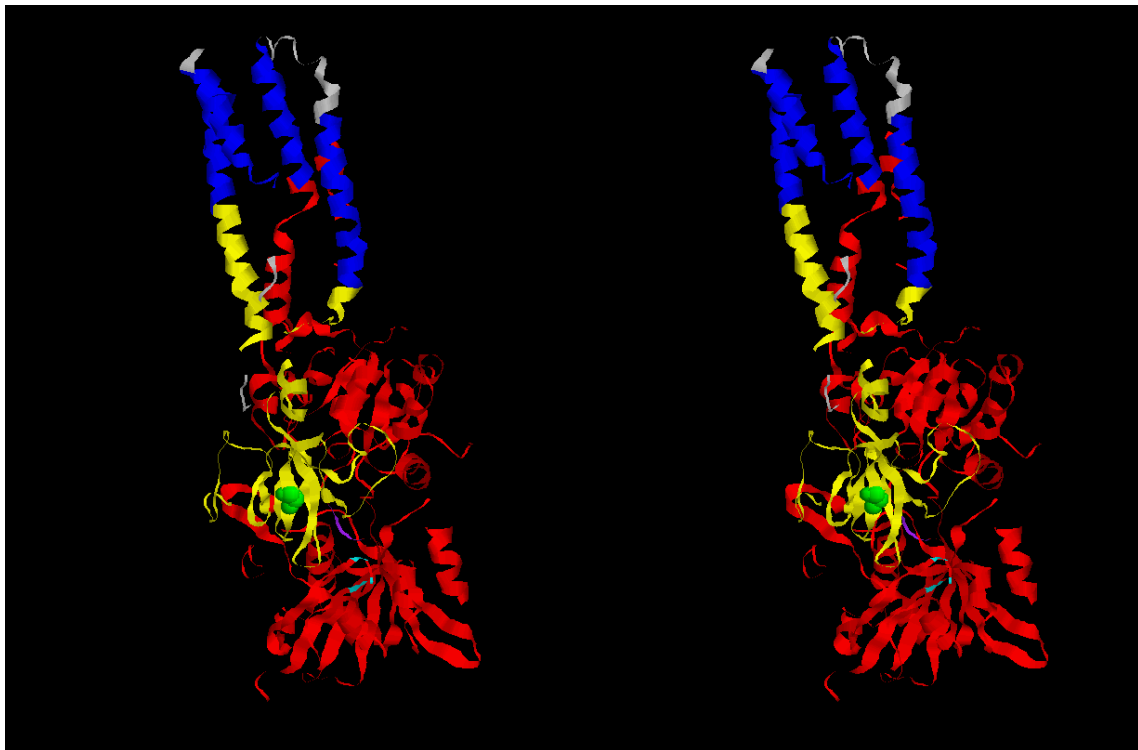


Figure 21 : Représentation du modèle 3D partiel d'ATP8B1 obtenu

Le clivage G308 provoque la disparition du peptide 1-307 d'ATP8B1. Afin de reproduire cette maturation, ce segment est masqué sur la représentation fournie (Figure 22 en vert). La perte de ce peptide signal montre la présence d'un sillon divisant le domaine globulaire en deux domaines.

En comparant les deux représentations 3D, il est possible de noter que le peptide 1-308 masque l'entrée de ce sillon et donc l'accès de l'ATP à la protéine. L'accessibilité de ce site ATPase est représentée par l'intermédiaire de la thréonine 456 en mauve ainsi que des deux sites de phosphorylation S598 et S604 en bleu (Figure 21).

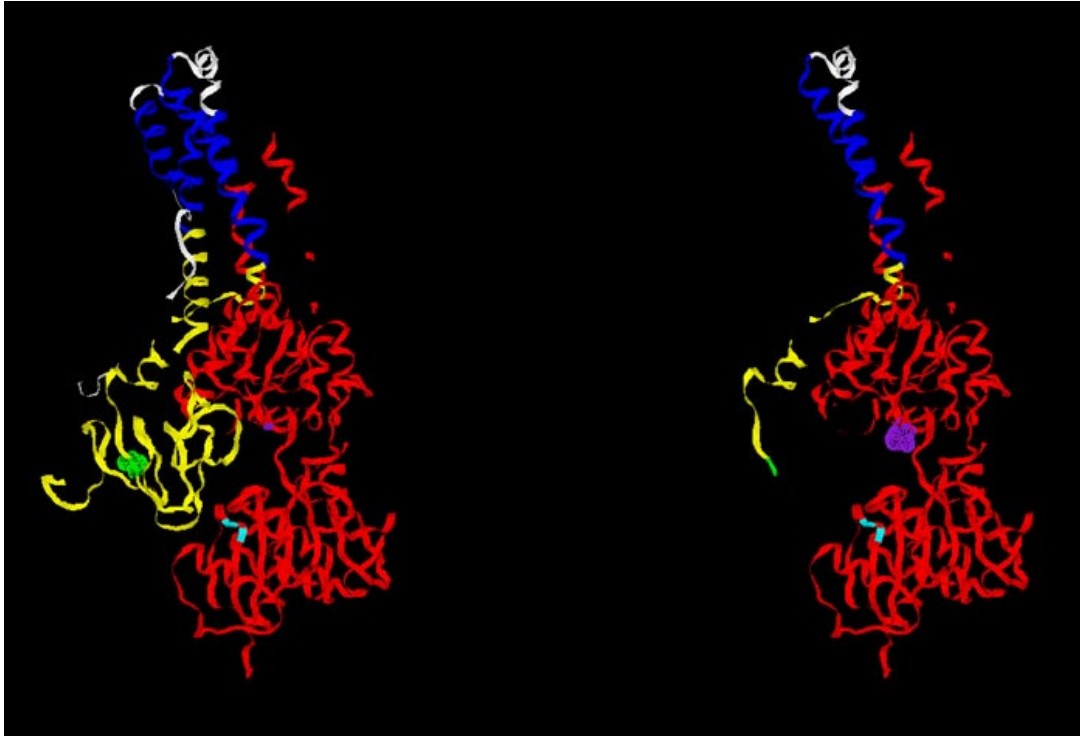


Figure 22 : Comparaison de la structure d'ATP8B1 avant et après clivage des 308 premiers acides aminés

La modélisation partielle d'ATP8B1 nous a permis de montrer l'implication de mutations importantes qui semblent altérer la topologie et donc la fonctionnalité de la protéine. Ces mutations sont toutes des mutations provoquant le phénotype grave PFIC1 et se rassemblent dans un domaine sphérique de 15 Å de diamètre (Figure 23).

Aucune mutation provoquant un phénotype épisodique de type BRIC n'est retrouvée au sein de cette sphère. Au contraire, les mutations BRIC semblent se répartir sur l'ensemble du modèle 3D proposé.

Nous avons retrouvé au sein de cette sphère la leucine 288 ce qui semble confirmer de part sa localisation son implication dans l'accessibilité du site de clivage G308.

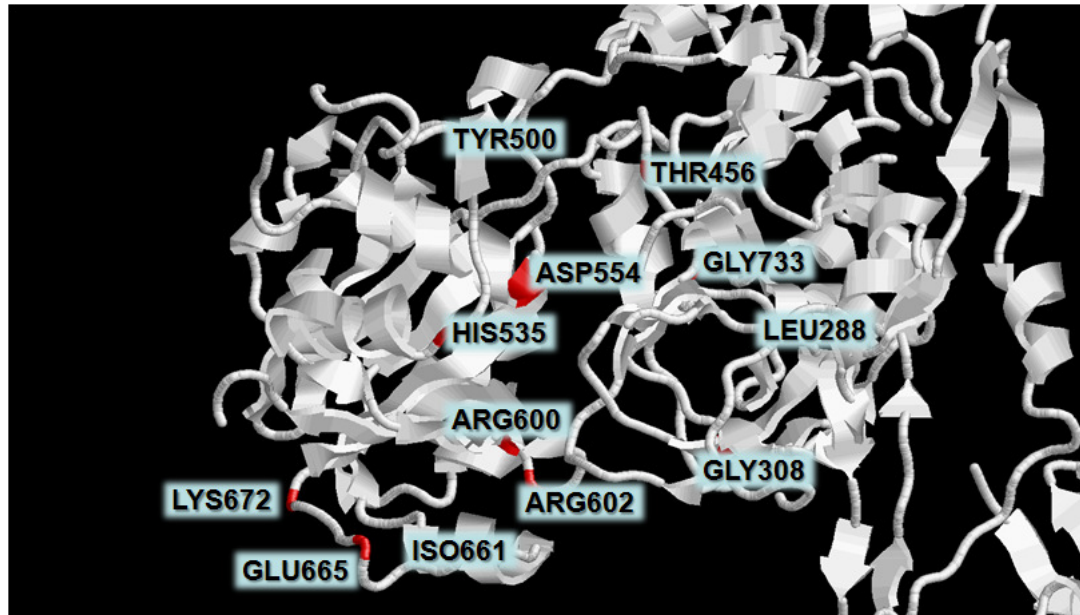


Figure 23: Représentation de la sphère d'intérêt de 15 Å autour de la fonction ATPase d'ATP8B1

Dans cette même région, on retrouve la glycine 733 dont la mutation est la plus proche spatialement du domaine ATPase d'après notre modèle 3D. Cette mutation, G733R, introduit un acide aminé chargé positivement à la place de la glycine qui permettait une libre rotation des chaînes peptidiques à cet endroit. Cette mutation pourrait donc bloquer un changement de conformation dans cette région de la protéine ou encore l'acquisition de la conformation active d'ATP8B1.

De plus, les mutations H535L (P), I661T (P), E665X (P), K672fs (P) concernent des acides aminés localisés à la surface de la partie la plus éloignée de la membrane du domaine globulaire d'ATP8B1 contenant les domaines de phosphorylation. Ces mutations n'étaient

pas associées à des fonctions prédites à partir de la séquence protéique d'ATP8B1 comme indiqué sur la représentation 2D d'ATP8B1 mais cette représentation partielle de la protéine montre que les modifications introduites par ces mutations pourraient être structurellement importantes. L'environnement du domaine ATPase pourrait ainsi être modifié par les mutations intervenant au sein de cette sphère d'intérêt.

2.12 Analyse prédictive de l'interactome d'ATP8B1

Ces analyses des représentations 2D et 3D d'ATP8B1 construites à partir de la séquence protéique d'ATP8B1 nous ont également permis de localiser des domaines potentiels d'interaction avec différents partenaires. Les observations des tableaux cliniques de patients PFIC1 et de patients mucoviscidosiques montrent des symptômes communs comme l'anomalie de sudation qui est directement reliée au défaut d'expression de CFTR. Des résultats précédents ont montré que l'expression génique de CFTR était réduite chez les patients PFIC1 (*Demeilliers et al. 2006*) et récemment des immunoprécipitations ont montré que la forme de 180 kDa d'ATP8B1 était co-précipité avec CFTR.

Nous avons réalisés des immunoprécipitations avec des anticorps anti-ATP8B1 à partir de 750µg de protéines totales extraites avec les lignées sélectionnées, Calu-3, Byler et Bric. Pour ces trois lignées cellulaires, la révélation avec des anticorps anti-ATP8B1 et anti-CFTR a été réalisée. Deux résultats de ces expériences sont présentés dans la figure 24. Seul le témoin positif, représenté par la lignée Calu-3 exprimant CFTR et ATP8B1, a été réalisé. Nous n'avons pas eu l'occasion d'éteindre le signal par un compétiteur, cependant cette expérience est programmée au sein du laboratoire.

Une immunoprécipitation réalisée sur un extrait de protéine totale de cellules Calu-3 a permis la révélation par des anticorps anti-ATP8B1, après Western Blot, de trois bandes de 90Kda, 145 kDa et 180 kDa (Figure 24, Piste A). La seconde, avec un signal plus faible, ne permet de mettre en évidence qu'une bande entre 120 et 180 kDa pouvant correspondre à la protéine ATP8B1 de 145 kDa (Figure 24, Piste 3). Après déstabilisation des premiers complexes, nous avons recherché la présence de CFTR par formation de complexe avec l'anticorps M3A7. Une bande située légèrement au dessus du marqueur de 130 kDa estimée à 145 kDa, pourrait correspondre à la forme B de la protéine CFTR apparaît sur la membrane

(Piste D). Ce peptide est conventionnellement reconnu comme étant la forme glycosylée non phosphorylée de CFTR correspondant à sa présence au sein du réticulum endoplasmique. La forme fonctionnelle de CFTR (dont le poids est de 180-190 kDa) n'a pu être détectée suite à une immunoprécipitation d'ATP8B1.

Pour la seconde immunoprécipitation avec anti-ATP8B1, les mêmes observations peuvent être faites pour les profils obtenus avec les extraits protéiques de la lignée Bric (Piste 2,5 et C,F). Pour la lignée Byler, nous avons obtenu une réponse négative dans l'une de nos expériences surement associé à une faible extraction des protéines ou une dégradation des protéines de notre échantillon (Piste B et E). Cependant, une seconde expérience a permis de montrer la mise en évidence unique de la bande de 180 kDa d'ATP8B1 (Piste 1). La révélation de cette membrane, après déstabilisation des complexes ATP8B1, a permis de montrer la présence dans l'immunoprécipitat d'une bande de 145 kDa environ (Piste 4).

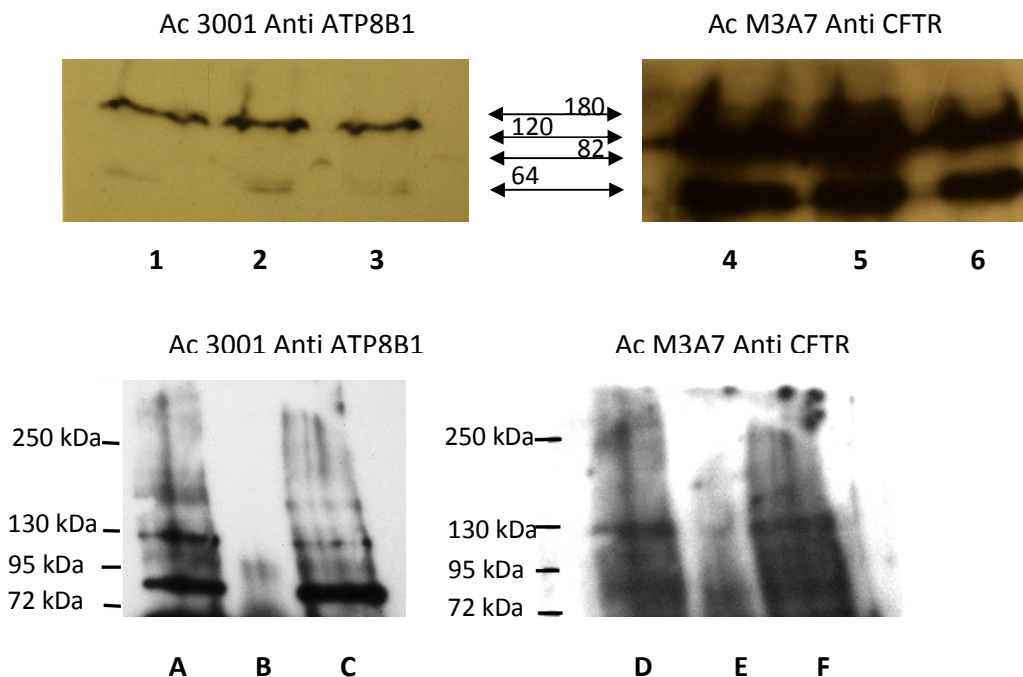


Figure 24: Immunoprécipitation anti-ATP8B1 révélée par des anticorps anti-ATP8B1 ou anti-CFTR (1,4 et B,E :Byler; 2,5 et C,F : Bric; 3,6 et A,D : Calu-3)

Ces expériences semblent montrer par la présence de CFTR dans les immuno-complexes obtenus avec les anticorps anti-ATP8B1 que cette protéine interagit physiquement avec ATP8B1. Ces résultats d'immunoprécipitation nous ont conduits à nous demander l'impact d'ATP8B1 sur la maturation possible de CFTR. En effet, si ATP8B1, dans sa forme de 180 kDa interagit physiquement directement ou par l'intermédiaire d'une protéine tierce avec la bande B de CFTR au niveau du réticulum endoplasmique, il est envisageable qu'ATP8B1 participe à la bonne maturation de CFTR. Une équipe a montré que la phosphatidylsérine était requise lors de la maturation de CFTR au niveau du réticulum endoplasmique (Eidelman et al. 2002).

Une revue de bibliographie montre que les partenaires d'ATP8B1 sont relativement peu identifiés chez l'Homme ou la souris mais montre également que de nombreux partenaires de CFTR sont connus. Une recherche effectuée à partir du serveur STRING v7.0 et v7.1 (Snel et al. 2000; von Mering et al. 2003; von Mering et al. 2005; von Mering et al. 2007) a montré différents partenaires possibles reliant CFTR et ATP8B1. Cette recherche se base suivant différents principes possibles d'interaction. Le premier correspond à une interaction publiée dans un article référencé dans les bases de données de publications internationales. Ce serveur utilise également une approche prédictive à partir d'une approche de Text-Mining, par rapport aux suppositions proposées dans ces mêmes articles.

Enfin, il utilise une approche génomique à partir des génomes de nombreuses espèces en analysant les éventuelles protéines contenant des fusions partielles ou des domaines en communs d'interaction au sein de plusieurs génomes non redondants. L'interrogation ATP8B1/CFTR donne un résultat centré sur CFTR du à la richesse des informations contenues dans la littérature sur cette protéine. Une première analyse au niveau de la figure 25 permet de définir deux regroupements de protéines. Le premier cluster (en haut à droite) contient les protéines responsables du transport de CFTR par les vésicules du Golgi à la membrane plasmique (SNAP25, VAMP). Le second cluster (en bas, à gauche) est celui qui nous intéresse plus particulièrement car il contient ATP8B1. La seule interaction directe pour ATP8B1 dans le réseau protéique chez *Homo sapiens*, proposée en Figure 25, est avec ABCC2 (MRP2) un transporteur inorganique de la membrane canaliculaire des hépatocytes en raison de la fréquence de co-citation de ces deux transporteurs

hépatobiliaires dans les publications (*Chen et al. 2005*). Ce transporteur, MRP2, est également en interaction avec PDZK1 (*Bagorda et al. 2002; Lamprecht and Seidler 2006*) et la calnexine (*Chevet et al. 1999*) (CANX) qui interagissent tout deux directement avec CFTR (*Loo et al. 1998; Lamprecht and Seidler 2006*). La calnexine est une protéine chaperonne impliqué dans l'adressage de CFTR. PDZK1 est une protéine impliquée lors de la phosphorylation de CFTR par la PKA. Cependant, un tel complexe incluant 2 intermédiaires pour établir un lien entre ATP8B1 et CFTR n'est pas satisfaisant dans notre modèle par rapport au fonctionnement physiologique d'ATP8B1. D'une part, les liens établis par le serveur impliquent des protéines dont la localisation subcellulaire est hétérogène et l'expression de leurs gènes non homogènes (variation tissus spécifiques). La Calnexine et PDZK1 sont impliquées dans l'adressage des protéines membranaires, tandis que CFTR, ATP8B1 et ABCC2 sont des transporteurs. Enfin, ABCC2 connaît une expression unique au niveau de la membrane canaliculaire des hépatocytes alors que PDZK1, CFTR et ATP8B1 sont exprimées dans de nombreux tissus.

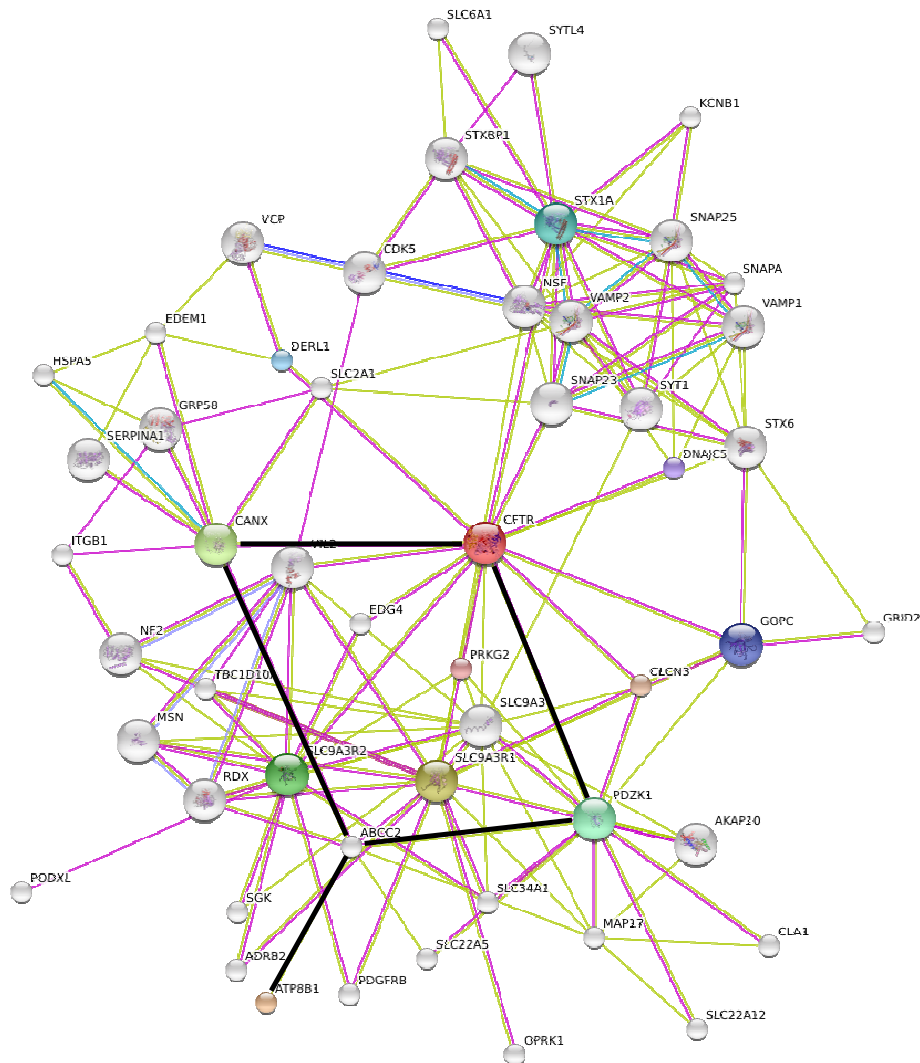


Figure 25: Interactome minimum entre ATP8B1 et CFTR chez *Homo sapiens*

Les interactions d'intérêts sont soulignées par un trait gras noir reliant le chemin le plus court entre ATP8B1 et CFTR.

Une seconde approche a donc été entreprise par l'intermédiaire des COGs (Clusters of Orthologous Groups) (*Tatusov et al. 2003*) (Figure 27). Cette approche utilise en plus de l'approche protéique, une approche génomique qui prend en compte les signatures de domaines fonctionnels (gènes dits orthologues) afin de rechercher les interactions connues entre ces différents éléments. Nous obtenons deux résultats intéressants. Tout d'abord, COG1132 et COG0474 semblent interagir directement par l'intermédiaire de différents liens

fournis par la littérature : i) co-expression chez *Caenorhabditis elegans*, ii) ces deux COGs sont dans un même environnement proche pour deux génomes non redondant (*Shewanella denitrificans* et *Lactobacillus johnsonii*) et iii) enfin ils sont co-mentionnés dans de nombreuses publications (*Strautnieks et al. 1998; Patel et al. 2003*). L'identification de ces deux COGs représente ATP8B1 et CFTR respectivement.

Un second résultat relie KOG0206, KOG3528, KOG0054 et KOG0675 (Figure 26). Ces COGs représentent KOG0206 : ATP8B1, KOG3528 : PDZK1, KOG0054 : CFTR, KOG0675 : CANX. Par conséquent, nous faisons l'hypothèse qu'ATP8B1 interagit avec CFTR ou PDZK1 par l'intermédiaire d'un domaine PDZ. De plus, PDZK1 est l'un des nombreux partenaires identifiés de CFTR (*Lamprecht and Seidler 2006*). Ainsi, nous pouvons formuler l'hypothèse que PDZK1 agirait comme intermédiaire entre ATP8B1 et CFTR. Des interactions impliquant les domaines PDZ C-Terminaux d'ATP8B1 sont proposées en raison de l'existence d'une protéine fusionnée chez *Tetraodon Nigroviridis* et en raison de la présence de la signature PDZ présente sur ATP8B1. La calnexine a également été identifiée comme l'un des partenaires privilégiés de CFTR (*Chevet et al. 1999*). Cependant, CANX est en relation entre PDZK1 et CFTR mais pas avec ATP8B1.

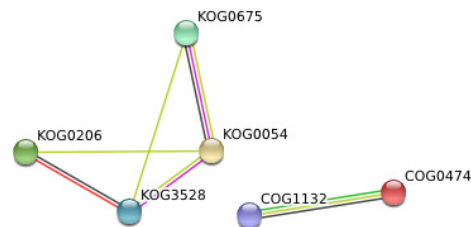


Figure 26: Interactome obtenu par l'approche des COGs entre CFTR et ATP8B1 chez *Homo sapiens*

Les résultats présentés dans cette figure confirment bien ceux obtenues en immunoprécipitation mettant en évidence l'interaction possible au niveau cytosolique ou membranaire entre CFTR et ATP8B1, soit en direct, soit par l'intermédiaire d'une autre protéine qui pourrait être PDZK1. Dans les perspectives, la recherche de PDZK1 dans les immunoprécipités avec les anticorps anti-ATP8B1 est envisagée. Cependant, ces premières observations ne font pas apparaître d'interaction entre ATP8B1 et d'autres protéines qui pourraient expliquer son effet sur l'expression de plusieurs gènes (BSEP, CFTR, ...).

L'interactome proposé en Figure 27 est celui pour les interactions prédites chez *Homo sapiens* pour ATP8B1.

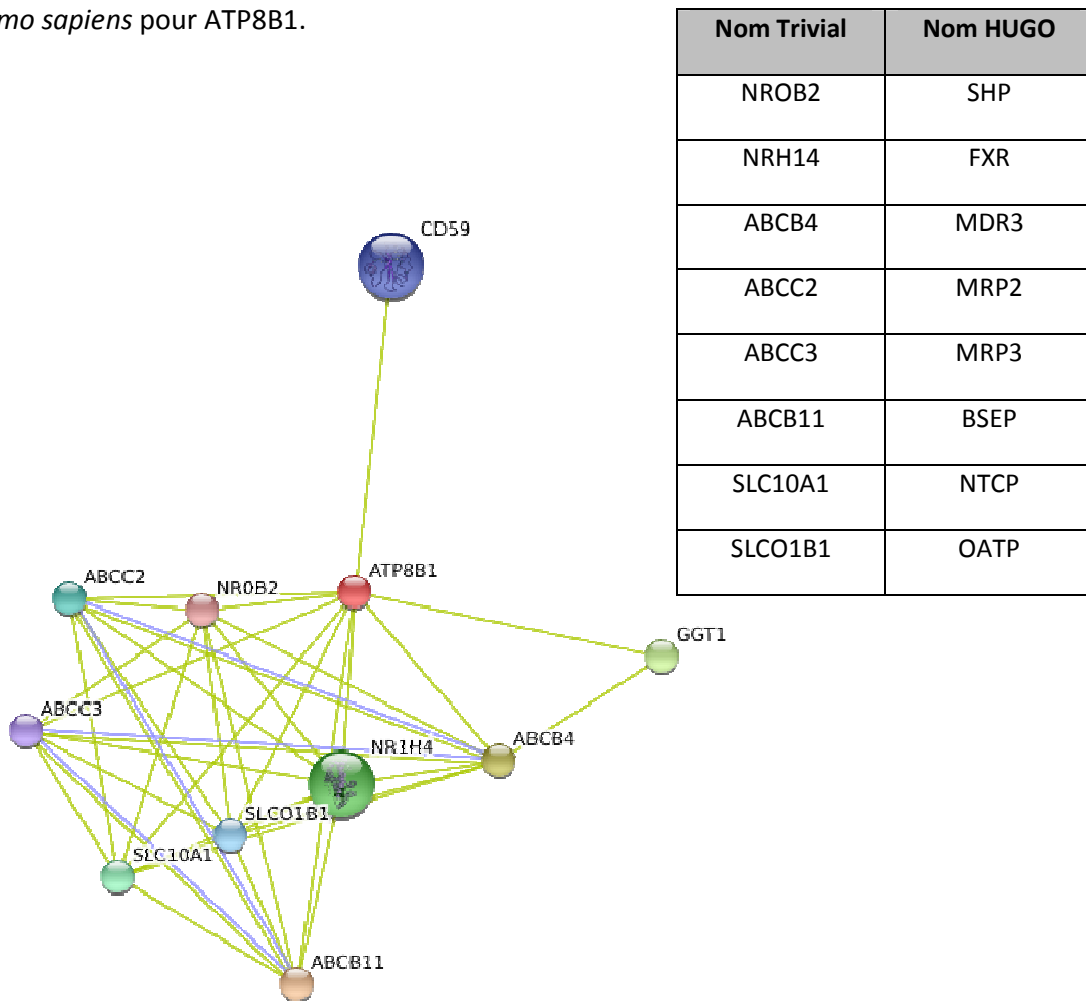


Figure 27: Interactome d'ATP8B1 obtenu chez *Homo sapiens* par Text Mining (Mars 2008)

STRING Server

Le tableau présenté permet de connaître la correspondance entre les noms triviaux des protéines indiquées et les noms des gènes correspondant suivant la nomenclature internationale HUGO.

Cet interactome montre que des interactions entre ATP8B1 et NR1H4 sont proposées. NR1H4 est le nom du gène codant pour FXR, le Farnesoid X Receptor (*CJ 2000; Caron et al. 2006*). Or l'expression de ce facteur de régulation a pu être caractérisée par PCR en Temps Réel chez les patients PFIC1. Cette expression est diminuée de façon importante (*Alvarez et al. 2004*). CD59 est une glycoprotéine de surface impliquée dans l'activation du complément. ATP8B1 semblerait également pouvoir être en interaction avec GGT1, la

Gamma-Glutamyltransférase 1, protéine présente entre les deux feuilletts de la membrane canaliculaire des hépatocytes. ATP8B1 semble également en interaction avec ABCC2, comme déjà proposé au niveau de l'interactome d'*Homo sapiens*. Une interaction proposée également directement avec ATP8B1 est avec ABCB4, le transporteur des phospholipides de la membrane canaliculaire des hépatocytes. Enfin, une interaction est proposée entre ATP8B1 et NROB2, l'homologue de SHP, la Small Heterodimer Protein. SHP est connu pour être un inhibiteur de la transcription de FXR chez l'Homme.

Nous avons poursuivi cette étude par la même interrogation chez *Mus musculus*. L'interactome prédit chez *Mus musculus* (Figure 28) montre des interactions possibles avec BSEP, le transporteur des acides biliaires. ATP8B1 chez la souris semble également avoir une interaction possible avec Tex292, une protéine du nucléole impliquée dans des cholestases intra-hépatiques. ATP8B1 pourrait également interagir avec ENSMUSP00000041983 qui est une amino-acid N-acyltransférase, cette enzyme serait requise lors de la myristoylation de la protéine car la glycine N-terminale doit être acylée avant la myristoylation. ATP8B1 interagirait également avec SHP, comme proposé chez *Homo sapiens* mais aussi avec NTCP2, permettant la réabsorption des acides biliaires au niveau des hépatocytes. La dernière interaction proposée correspond à une interaction avec un facteur apoptotique exprimé au niveau du réticulum endoplasmique le Bifunctional Apoptosis Regulator (BAR).

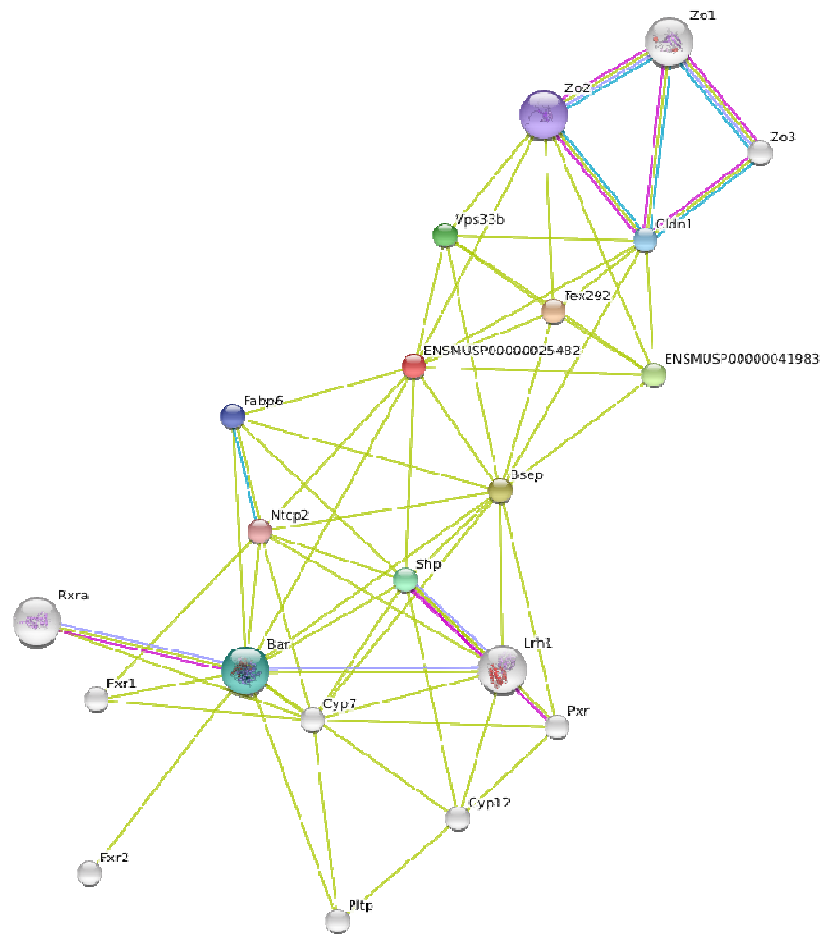


Figure 28: Interactome d'ATP8B1 (ENSMUSP0000025482) obtenu chez *Mus musculus* par Text Mining (Mars 2008) STRING Server

Etant donné la possible interaction de CFTR avec la protéine ATP8B1, nous avons voulu analyser la fonctionnalité du canal CFTR en utilisant différents modèles cellulaires, dont ceux issus de patients PFIC1 ou BRIC, où la protéine ATP8B1 n'est pas ou peu fonctionnelle et ainsi montrer l'impact de ces modifications sur l'efficacité du transport par CFTR. Pour cela, nous avons utilisé une méthode décrite dans la littérature permettant la mesure de l'efflux de l'ion I^- (Robert *et al.* 2005). Ainsi, on peut s'attendre dans le cas où ATP8B1 est altérée à une modification du profil d'efflux, démontrant une action de notre protéine sur la fonctionnalité du canal CFTR.

3 Mise en évidence de l'activité physiologique de CFTR

CFTR a été identifié comme étant l'un des canaux principaux du chlore à la membrane apicale des cellules épithéliales avec activité sécrétoire. Cette protéine est responsable d'une grande partie du transport transépithélial de chlore et secondairement d'eau par pression osmotique. Ainsi, Sheppard et Welsh (*Sheppard and Welsh 1999*) ont montré que la perméabilité anionique du canal CFTR était $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$. Cette donnée est spécifique à CFTR par rapport aux autres transporteurs de chlore. Par conséquent, l'activité de transport assuré par CFTR peut être mise en évidence, d'une façon indirecte, par la technique de mesure de l'efflux d'iode. Ainsi, dans notre système d'étude, les ions Cl^- ne sont pas disponibles et CFTR transportera alors l'ion I^- . Ce transport d'ions I^- permettra de détecter l'activité de transport du canal CFTR par l'intermédiaire d'une sonde spécifique à la détection d'iode après stimulation de l'activité de CFTR par la forskoline.

Afin de vérifier que cet efflux est dû à l'activité de CFTR, l'inhibiteur spécifique de CFTR, l'inhibiteur-172 (*Wang et al. 2004*) (concentration finale : 10 μM), est ajouté au moment de la stimulation par la forskoline. La différence entre l'efflux obtenu avec la forskoline seule et le cocktail « forskoline + inh-172 » informera sur l'activité de transport spécifique dû à CFTR. Cette approche nous permet donc de vérifier la fonctionnalité de CFTR parmi différentes lignées exprimant ATP8B1 mature ou modifiée. Les lignées HT-29 et MZ-ChA-2 seront utilisées comme témoins positifs alors que la lignée HTCR sera le témoin négatif de cette étude.

3.1 Mesure de l'efflux d'iode pour la lignée HT-29

La Figure 29 montre les résultats des efflux avec et sans stimulations. L'efflux des cellules HT-29 non stimulées est représenté en bleu. Il montre une diminution constante sur l'ensemble des 12 minutes de mesure d'efflux. Lorsque les HT-29 sont stimulées avec 10 μM de forskoline, un pic de sécrétion peut être observé (30 à 35 mV d'amplitude après 1 minute de stimulation, courbe rouge). Le retour au niveau basal d'efflux est observé à partir de 3 minutes de stimulation. Cependant, l'efflux avec stimulation demeure plus actif que l'efflux sans stimulation, pour chacune des minutes de mesure restantes. L'efflux obtenu avec le cocktail « forskoline+inh-172 » est représenté en vert sur la Figure 29. Cet efflux montre une

inhibition du pic de sécrétion observé en présence de forskoline seule. Un efflux plus important que l'efflux standard est toutefois détecté après ajout du cocktail. La différence entre l'efflux avec forskoline et avec forskoline/inh-172 représente l'efflux spécifique dû au canal CFTR. La différence entre les efflux sans stimulation et forskoline/inh-172 représente l'efflux dû aux canaux chlore, autres que CFTR, stimulables par la forskoline.

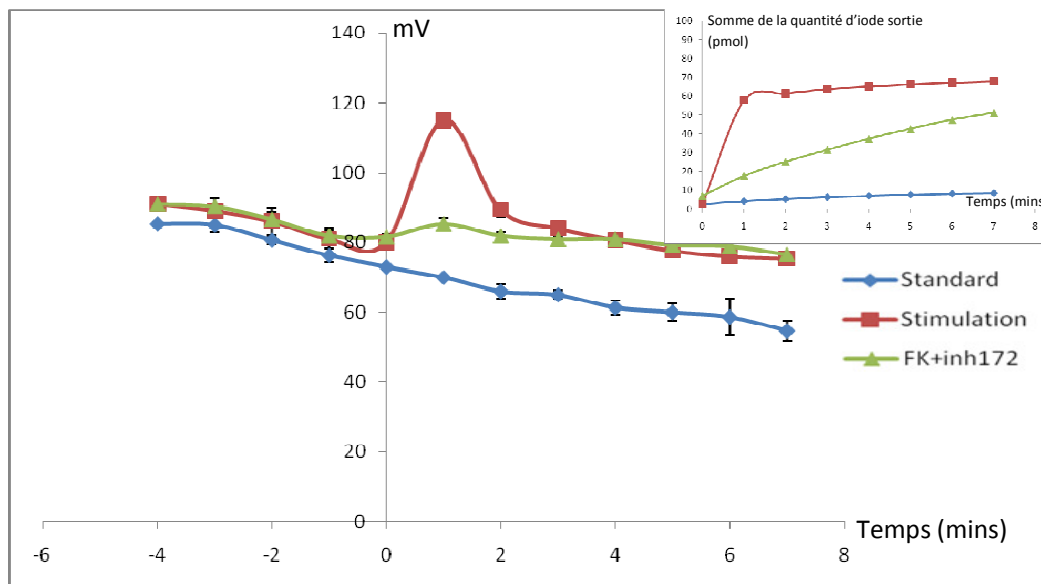


Figure 29: Efflux Iode mesuré pour la lignée HT-29 (n=9)

3.2 Mesure de l'efflux d'iode pour la lignée Mz-ChA-2

Cette lignée cholangiocytaire exprime de manière constitutive CFTR. Les efflux mesurés en condition standard, ou sans stimulation (Figure 30), montrent une diminution lente durant le temps de mesure similaire à celle observable pour la lignée HT-29. L'efflux mesuré avec une stimulation par 10 μ M forskoline montre un pic (d'une amplitude de 35 mV) après une minute de stimulation. Une fois le pic de stimulation terminé, l'efflux reprend une pente basale d'efflux avec toutefois une réduction de la quantité d'iode transportée (20 mV). L'utilisation de l'inhibiteur 172 a permis de montrer un profil proche de celui obtenu pour la lignée HT-29 en présence de l'inhibiteur-172 et de forskoline. Cette expérience permet de décrire l'efflux spécifique au canal CFTR.

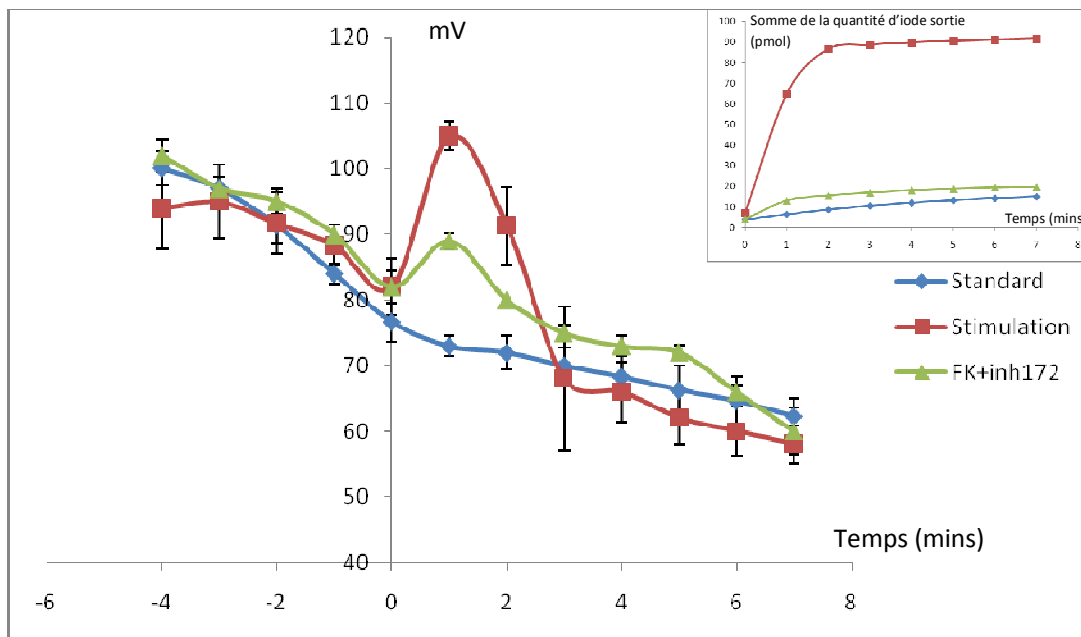


Figure 30: Efflux iodé mesuré pour la lignée Mz-ChA-2 (n=9, n=6 pour FK+inh172)

3.3 Mesure de l'efflux d'iode pour la lignée HTCR

Les efflux réalisés avec la lignée cellulaire HTCR (Figure 31), qui n'exprime pas CFTR, ne montre pas de réelle différence entre l'efflux mesuré en condition standard ou en condition de stimulation par 10 μ M forskoline. Par conséquent, cette lignée représente notre témoin négatif d'efflux.

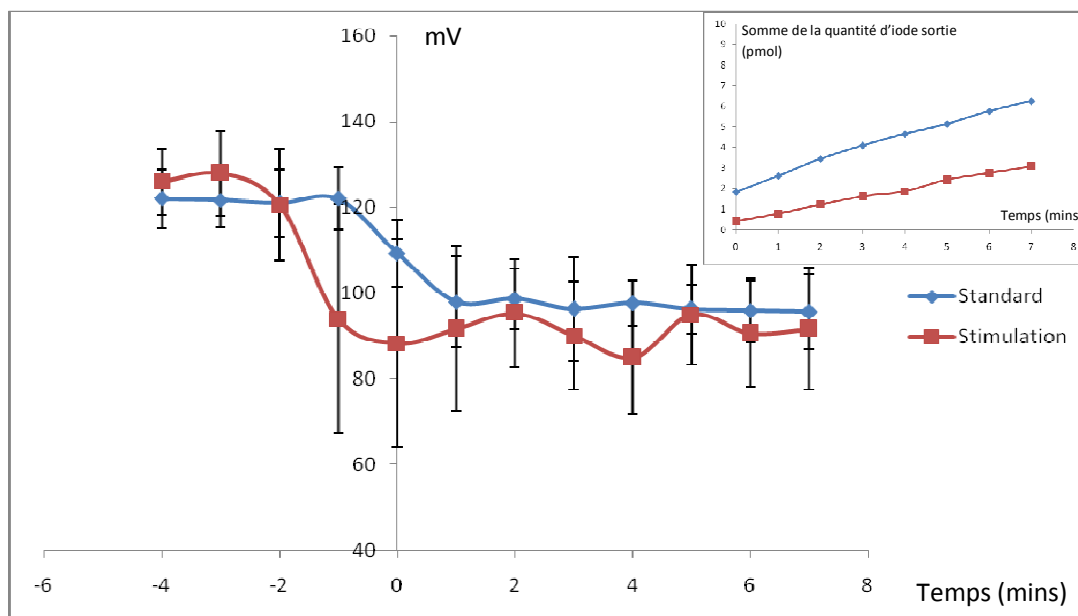


Figure 31 : Efflux iodé mesuré pour la lignée HTCR (n=9)

3.4 Mesure de l'efflux d'iode pour la lignée Bric

L'efflux mesuré en condition standard avec cette lignée cellulaire montre un efflux quasi constant. L'efflux mesuré avec stimulation de 10 μ M Forskoline montre un pic de sécrétion prolongé durant 3 minutes (Figure 32). Le niveau pré-stimulation est récupéré après 7 minutes de stimulation. La stimulation observée est significativement prolongée et l'amplitude du pic est plus importante que pour les lignées exprimant CFTR (HT-29 et Mz-ChA-2). L'ajout de l'inh-172 montre que l'augmentation de l'efflux observé en présence de forskoline est dépendant de CFTR.

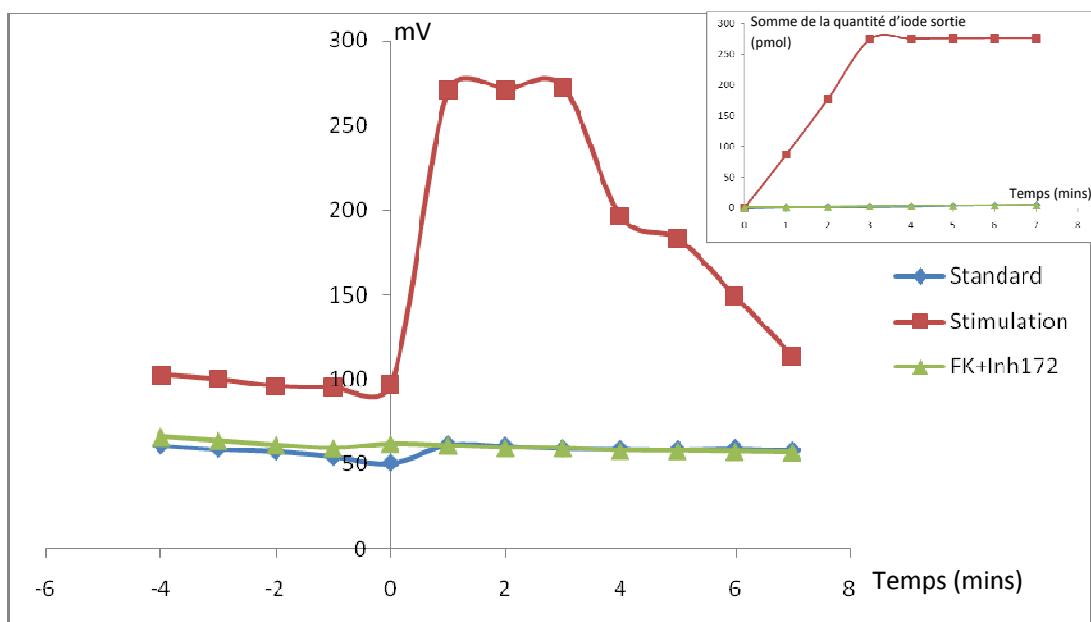


Figure 32 : Efflux iode mesuré pour la lignée Bric (n=9)

3.5 Mesure de l'efflux d'iode pour la lignée Byler

Les mesures d'efflux en condition standard avec la lignée Byler (Figure 33) montrent un profil similaire à celui de la lignée HTCR (Figure 31). Ce profil correspond à une lignée n'exprimant pas la protéine CFTR fonctionnelle à la membrane. Cependant, nous avons pu détecter une faible expression par Western Blot de cette protéine dans la lignée Byler.

Notre étude *in silico* ainsi que nos immunoprécipitations montrent une interaction physique possible entre ATP8B1 et CFTR. De plus, ATP8B1 semble être le transporteur de la phosphatidylsérine (*Ujhazy et al. 2001*), un aminophospholipide requis lors de la maturation de CFTR au niveau du réticulum endoplasmique (*Eidelman et al. 2002*).

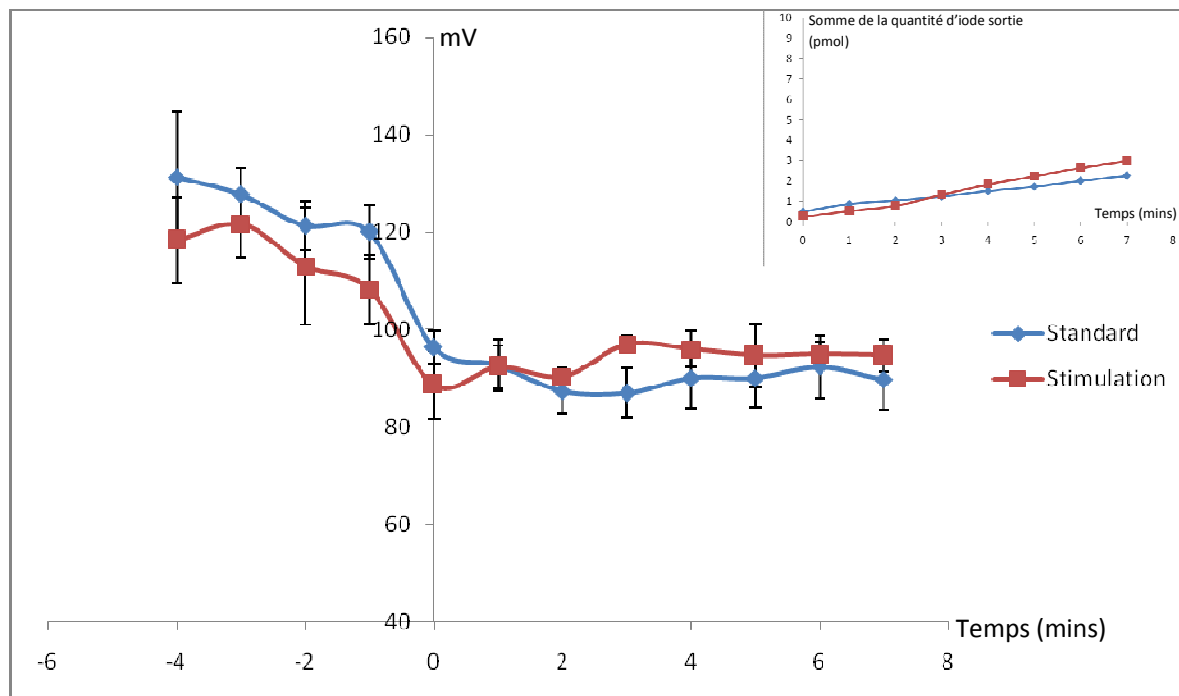


Figure 33 : Efflux d'iode mesuré pour la lignée Byler à 37°C (n=9)

Une dégradation par le protéasome de CFTR, chez certains patients PFIC1, pourrait expliquer la non-fonctionnalité de cette protéine ainsi que l'anomalie de sudation observée chez ces patients comme cela a pu être décrit chez les patients mucoviscidosiques portant la mutation $\Delta F508$. Afin d'étudier l'impact possible de la mutation G308V d'ATP8B1 sur la maturation/adressage de CFTR, nous avons réalisé l'efflux d'iode avec des cellules de la lignée Byler préalablement cultivées durant 24h à 27°C (*Egan et al. 1995*). La culture à cette température est connue pour rétablir l'adressage de CFTR à la membrane lorsqu'une séquestration se produit au niveau du réticulum endoplasmique, comme c'est le cas pour la mutation $\Delta F508$, la plus courante de CFTR.

Le profil obtenu pour la lignée Byler placée durant 24h à 27°C montre un profil correspondant à une lignée exprimant une protéine CFTR fonctionnelle à la membrane (Figure 34). En effet, un pic de sécrétion d'ions I^- est observé après une minute de

stimulation avec 10 μ M de Forskoline (en rouge). Puis, le retour à une pente basale d'efflux (en rouge), comparable à l'efflux obtenu en condition standard (en bleu) est observable. L'utilisation du cocktail « forskoline+inh-172 » (en vert) nous montre l'activité spécifique de CFTR dans le transport des ions I⁻. Ainsi le pic observé après une minute de stimulation correspond en quasi-totalité au transport par CFTR des ions I⁻, un pic d'une très faible amplitude étant visible en présence de l'inhibiteur de CFTR (inh-172).

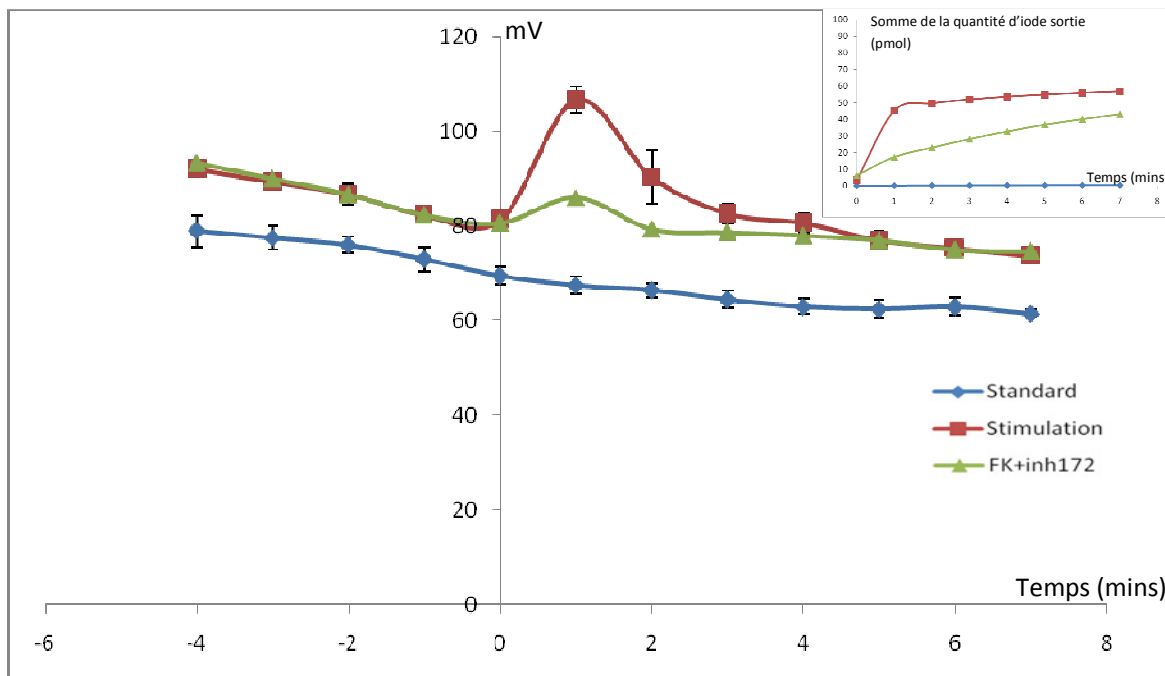


Figure 34 : Efflux d'iodure mesuré pour la lignée Byler à 27°C (n=9)

Ces résultats montrent que nous avons restaurés une activité fonctionnelle de CFTR à la membrane des cellules Byler, porteuse de la mutation ATP8B1-G308V. Notre culture à 27°C durant 24h a permis de passer outre la voie d'adressage impliquant la protéine ATP8B1 et nécessitant la présence de phosphatidylsérine (*Eidelman et al. 2002*).

Il apparaît malgré ces résultats que le rôle d'ATP8B1 dans cette étape d'adressage/maturation reste mal défini et demande une investigation plus approfondie. Pour cela, nous avons procédé à l'évaluation de l'activité de CFTR dans la lignée Byler placée à 37°C mais transfectée par un plasmide bi-cistronique comportant l'EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) et l'ADNc d'ATP8B1 sauvage. Nous souhaitons ainsi, dans ce modèle cellulaire et dans des conditions de culture standard, réintroduire la protéine fonctionnelle ATP8B1. Préalablement aux mesures d'efflux (Figure 35), une observation de chacun des

puits au microscope fluorescent a pu montrer une efficacité de transfection moyenne de 60% de cellules exprimant l'EGFP et par conséquent ATP8B1. Le comptage des cellules fluorescentes dans plusieurs champs a été effectué afin de quantifier cette efficacité de transfection.

Le profil observé dans ce cas montre un pic présent après une minute de stimulation avec la forskoline d'une amplitude de 15 mV environ avant un retour au niveau basal d'efflux. L'efflux sans stimulation montre une légère diminution durant la totalité de l'expérience. Ces résultats semblent indiquer qu'une certaine proportion de la population cellulaire exprime fonctionnellement CFTR. L'expérience de la mesure de l'efflux en présence de l'inhibiteur 172 permet de montrer sans équivoque que l'efflux mesuré ici est provoqué par le canal CFTR spécifiquement puisqu'en sa présence l'efflux d'iode est presque intégralement inhibé.

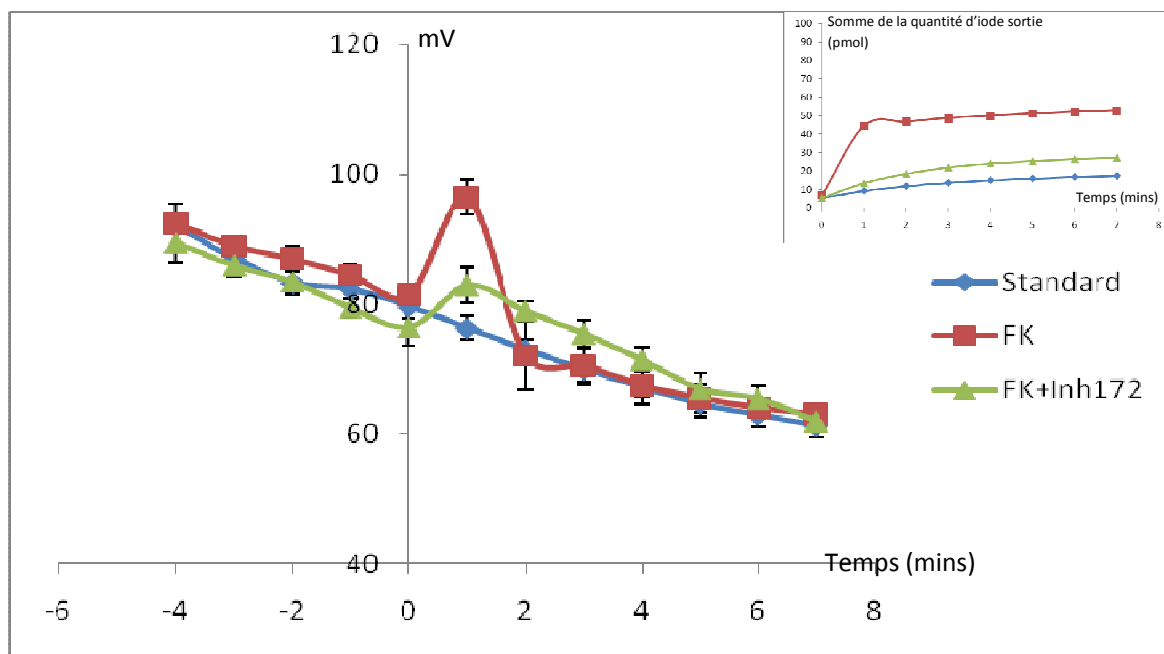


Figure 35: Efflux Iode mesuré pour la lignée Byler transfectée par le plasmide pEGFP-A2 (n=6)

Les résultats de réintroduction de la séquence sauvage d'ATP8B1 dans notre lignée Byler, porteuse de la mutation ATP8B1-G308V, et ceux de sa culture à 27°C, apportent la preuve qu'ATP8B1 joue un rôle important dans l'activité de CFTR comme cela a été établi via l'efflux d'iode. ATP8B1 serait probablement impliquée dans la maturation et ou l'adressage de CFTR lors de son passage par le RE et avant sa translocation à la membrane plasmique.

IV- Discussion

Notre étude porte sur la régulation de l'expression du gène CFTR par le produit du gène ATP8B1. Dans un premier temps, afin de vérifier leurs expressions géniques et protéiques, nous avons pu montrer que des modèles cellulaires représentatifs des tissus où l'expression génique d'ATP8B1 avait pu être identifiée possédaient également une expression du gène CFTR. Ainsi, un modèle pulmonaire (cellules Calu-3), un modèle intestinal (cellules HT-29) ainsi qu'un modèle de cellules cholangiocytaires (Mz-ChA-2) ont tous montré une expression de ces deux gènes. Par contre, une lignée dérivée d'un hépatocarcinome (HTCR) n'exprime ni ATP8B1 ni CFTR. Enfin, deux lignées cellulaires développées au laboratoire, chacune représentative d'un phénotype cholestatique différent (l'une représentant le modèle de la cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 1 (homozygote ATP8B1-G308V) et la seconde représentant le modèle de la cholestase intra-hépatique récurrente bénigne (homozygote ATP8B1-G1241fs)) montrent également une expression des transcrits ARNms de ces deux gènes. Ainsi, les différentes lignées testées ont montré soit une expression conjointe de ces deux gènes soit une absence d'expression de ces deux gènes.

Par la suite nous avons testé la réponse à différentes stimulations capables de modifier l'expression de leurs gènes. Ainsi, une première expérience a été réalisée avec des cellules Calu-3 cultivées durant 24h en présence de deux concentrations différentes de phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). Le PMA, utilisé à des concentrations de 0.1 et 0.2 mM provoque une diminution significative de l'expression d'ATP8B1 proportionnelle à la concentration de PMA utilisée. Par rapport à notre témoin, nous observons une diminution de 25% pour une concentration 0,1 mM de PMA ($p=0,06$) et de 65% pour une concentration 0,2 mM de PMA ($p=0,001$). Enfin, la diminution observée entre ces deux échantillons est également hautement significative ($p=0,00001$).

Le PMA est un répresseur connu de l'expression génique de CFTR et un activateur de la PKC. Le PMA influence la transcription génique par l'intermédiaire de facteur se liant au site AP1 du promoteur. Il a également été démontré que le PMA permettait une dégradation plus rapide des ARNms CFTR. L'activation des PKC est également importante sur l'expression de CFTR. Ainsi la PKC α est impliqué dans la voie de signalisation Ras Src/PyMT qui conduit à une diminution de l'expression de CFTR (Davenport et al. 1996). La diminution constatée par l'activation des PKC peut également être abolie par l'utilisation d'inhibiteurs des PKC comme l'équipe de Bargon (1992).

Toutefois, son effet sur l'expression génique d'ATP8B1 n'avait jamais été testé auparavant. Ainsi l'expression génique d'ATP8B1 semble soumise aux mêmes processus de régulations que CFTR. Ces données sont confirmées par l'utilisation d'un homologue du PMA, le 4 α PDD, qui ne permet pas

l'activation de la Protéine Kinase C et qui est couramment utilisée comme contrôle négatif du PMA. En effet, après un traitement de 24h, les niveaux d'expression en présence de ce composé ne permettent pas de voir de différences significatives par rapport au témoin non traité. Ces données montrent que le PMA est bien l'élément responsable de la diminution de l'expression génique d'ATP8B1. Cette réponse au PMA est la même que celle observée pour CFTR, avec toutefois un effet moins important pour *ATP8B1* que pour *CFTR*. Il semble donc que l'activation des PKC joue un rôle significatif pour l'expression d'ATP8B1. Une recherche *in silico* du domaine AP-1 sur les séquences nucléotidiques du promoteur d'ATP8B1 n'a pas permis de révéler sa présence. Il est possible que d'autres éléments de réponse soient impliqués.

La même lignée cellulaire, Calu-3, exprimant fortement ATP8B1 et CFTR, a également été cultivée durant 24h en présence d'une concentration de 0,2 mM de forskoline. Ce traitement a déjà été utilisé (*Mogayzel et al. 2002*) pour tester l'expression de CFTR et montre une augmentation de l'activité de son promoteur en réponse à un traitement long (24 ou 48h). Le niveau d'expression d'ATP8B1 est augmenté significativement par rapport au témoin ($p=0,0016$). Le promoteur d'ATP8B1 est donc activé par le traitement forskoline appliqué et montre une régulation proche de celle de *CFTR*. Notre étude est la première permettant de montrer qu'ATP8B1 réagit également à ce traitement prolongé à la forskoline. La cascade d'événements cellulaires conduisant à l'activation du gène ATP8B1 reste actuellement à élucider.

Dans chacune des lignées cellulaires utilisées dans cette étude, l'observation de la synthèse d'ARNm a toujours été associée à une expression de la protéine ATP8B1. En effet, la protéine ATP8B1 mature est identifiable avec notre anticorps 3001 dirigé contre la partie C-terminale de la protéine sous la forme d'un peptide de 145 kDa déjà identifié par les équipes travaillant sur ATP8B1. Cette forme est présente dans les lignées S9 et Calu-3 (tissu pulmonaire) ainsi que dans les lignées HT29 (intestin) et Mz-ChA-2 (cholangiocytes). Un peptide dont le poids associé est de 90 kDa est également détectable dans les lignées HT29, Calu3 et Mz-ChA-2. Ce peptide pourrait correspondre à une forme clivée de la protéine comportant sa région C-Ternale. Enfin une bande à 60kDa est également présente dans l'ensemble des lignées cellulaires dans lesquelles nous avons recherchés l'expression d'ATP8B1. Cette bande semble être aspécifique puisque la lignée HTCR, qui n'exprime pas ATP8B1, permet la détection de ce peptide. La lignée Bric, qui contient le gène *ATP8B1* avec la mutation G1241fs permet l'identification des bandes à 90 et 145 kDa. La modification G1241fs intervient 10 acides aminés avant la fin de la séquence de la protéine. Cette modification ne semble pas affecter le poids de la protéine ATP8B1. Le profil pour la lignée Byler, qui comporte le gène *ATP8B1* avec la mutation G308V, mutation la plus fréquente dans la population amish, est différente.

Les peptides identifiables sont associés à des poids de 180, 90 et 60 kDa. Ainsi la bande aspécifique (60 kDa) est présente ainsi que la bande de 90 kDa identifiable dans les lignées exprimant le gène ATP8B1 sans mutation. Cependant, le point important est l'absence d'une bande de 145 kDa. L'absence de la bande de plus haut poids moléculaire et l'identification d'une bande de 180 kDa dans cette lignée nous ont conduits à suspecter un défaut au niveau des modifications post-traductionnelles.

Ces résultats préliminaires nous ont amenés à réaliser une étude *in silico* de la séquence de la protéine ATP8B1. Pour cela, la recherche de la localisation des domaines transmembranaires ainsi que la recherche des domaines consensus présents sur la séquence d'ATP8B1 nous ont permis d'associer de nombreuses mutations, et donc des modifications ponctuelles de la protéine, à des fonctions probables de la protéine.

Un alignement réalisé avec les différentes séquences protéiques des membres identifiés de la famille ATP8B chez *Homo sapiens* a montré une très forte similarité (plus de 70%) qui indique que les différents membres de la famille ATP8B possèdent une structure semblable et probablement des fonctions proches dans la cellule. Ainsi, lorsque les séquences protéiques d'ATP8B1, ATP8B2a, ATP8B2b, ATP8B3 et ATP8B4 sont alignées, les domaines transmembranaires de ces différentes protéines sont également alignés. L'exception dans cette famille semble être ATP8B2b qui possède une séquence beaucoup plus courte (380 au lieu de 1300 en moyenne). ATP8B2b ne possède pas de site ATPase mais possède une très forte identité avec ATP8B2a. Le gène ATP8B2 possède ainsi la caractéristique par rapport aux autres membres de la famille des ATP8B d'avoir deux transcrits différents. Son transcrit le plus court, ATP8B2b de 380 acides aminés possède une forte similarité avec la région N-terminale d'ATP8B1 (segment 1-308).

Notre étude *in silico* a montré dans un premier temps que le segment de la protéine ATP8B1 de 20 acides aminés centré sur la glycine G308 d'ATP8B1 chez *Homo sapiens* était hautement conservé chez les différentes espèces pour lesquelles la séquence d'ATP8B1 était connue mais aussi au sein de la famille des ATP8B. De plus, cette séquence semblerait contenir un site de clivage par une endopeptidase pour laquelle la présence d'une glycine est capitale. En effet, la modification d'une glycine par une valine modifie la séquence de la protéine en faisant disparaître complètement le site reconnu par l'endopeptidase. Ce résultat nous indique donc que la modification G308V d'ATP8B1 empêcherait le clivage du segment 1-308 de la protéine. Ce segment dont le poids théorique est de 34 kDa correspond à la différence de poids entre la bande de 145 kDa d'ATP8B1 identifiable dans les lignées cellulaires analysées et la bande de 180 kDa observée pour la lignée Byler

qui porte le gène *ATP8B1* avec la mutation G308V. Ce segment de la protéine semble donc être particulièrement critique pour la fonctionnalité de la protéine ATP8B1. Ces différents résultats nous conduisent à émettre pour la première fois l'hypothèse d'une maturation de la préprotéine ATP8B1 de 1251 acides aminés en une protéine mature de 943 acides aminés, résultant du clivage des 308 premiers acides aminés de la protéine. La préprotéine de 1251 acides aminés, avec les modifications posttraductionnelles pouvant intervenir dès le réticulum endoplasmique comme les glycosylations ou les phosphorylations, correspondrait à la bande d'un poids de 180 kDa. Le clivage de ce peptide conduirait à la formation d'un peptide de 308 acides aminés, d'un poids moléculaire de 34 kDa environ et d'un peptide de 145kDa, correspondant à la forme mature d'ATP8B1 avec ses modifications post-traductionnelles. Les recherches menées au laboratoire avec un anticorps dirigé contre la région N-terminale de la protéine, n'ont pas donné de résultats concluant en raison de la forte homologie de séquence entre les protéines ATP8B.

Notre analyse *in silico* s'est également intéressée à d'autres segments de la protéine. Ainsi, la modification D554N, générée par la mutation la plus fréquente dans une autre population à forte consanguinité, les esquimaux du Groenland, met en évidence dans un segment de 20 acides aminés centrés sur la glycine 556 un site de myristoylation pour la protéine. Ce site de myristoylation, pour être actif, nécessite la présence d'une glycine en N-terminale du peptide à myristoyler afin de subir une acylation. La glycine 556 pourrait être cette glycine N-terminale. Pour cela, la nécessité d'un second clivage de la protéine est requise. Or, les acides aminés qui précèdent ce site de myristoylation correspondent à un site de clivage par une caspase, permettant ainsi la libération de la glycine 556 en tant que glycine N-terminale. La modification D554N intervient directement dans le site consensus de cette endopeptidase et abolit complètement son action, faisant disparaître le résidu aspartate, lieu de reconnaissance et de clivage spécifique aux caspases. Par conséquent, la libération de la glycine 556 N-terminale ne serait plus possible et la myristoylation de ce segment devient donc irréalisable. Le segment 556-1251 devrait correspondre, sans modification post-traductionnelle à un poids de 76 kDa. Le peptide associé à une bande de 90 kDa pourrait donc correspondre à ce fragment de la protéine qui contient la région C-terminale de la protéine ainsi que des sites de phosphorylation et de glycosylation. Par conséquent, nous pouvons formuler une nouvelle hypothèse stipulant la présence d'un second site de maturation au niveau de la glycine 556. Avec les anticorps spécifiques de la partie C-terminale d'ATP8B1, les westerns et les immunoprécipitations révèlent une bande de 90 kDa qui pourrait correspondre à ce peptide.

Ces premiers résultats nous ont par la suite conduits à analyser plus en détail le rôle possible du fragment 556-1251 dans la cellule. Ce segment contient des sites de liaison avec les facteurs de

transcriptions STAT5 et STAT3 ainsi qu'une NRBox (aa940-950) qui est un signal d'interaction avec les récepteurs nucléaires et tout particulièrement avec SHP, la Small Heterodimer Protein. Cette protéine connaît une expression diminuée chez certains patients PFIC1. Cette hypothèse semble vérifiée par la présence d'un marquage en immunofluorescence avec les anticorps anti-ATP8B1 dans le noyau des cellules Calu-3 et Bric et un signal beaucoup plus faible pour la lignée Byler, pour laquelle le clivage des 308 premiers peptides ne se réaliserait pas. Ce segment 556-1251 comporte une glycine en N-terminale ainsi qu'un domaine de myristoylation qui permet le réadressage de ce fragment de la protéine vers un organite cellulaire et en particulier vers le noyau dans notre cas.

Le rôle de SHP dans le noyau a déjà pu être mis en évidence en particulier au niveau de son interaction avec le domaine NRBox. Ce domaine permet une interaction physique entre une protéine possédant ce domaine consensus et la protéine SHP. Or, SHP est capable de se lier au promoteur de *FXR*, le Farnesoid X Receptor, afin d'en réprimer l'expression. *FXR* est un facteur de transcription connu pour augmenter l'expression de nombreux gènes parmi lesquels *BSEP*, le transporteur des acides biliaires. Ces observations sont en accord avec les niveaux d'expression de ces différents gènes chez les patients PFIC1. En effet, la mesure par PCR temps réel de l'expression de *BSEP*, de *FXR* et de *SHP* a pu être mesurée après biopsie dans des tissus de patients PFIC1. Ces mesures ont montré que le niveau d'expression de *FXR*, ainsi que celui de *BSEP*, est diminué chez ces patients. Or dans le cas des patients PFIC1, le fragment de 90 kDa correspondant à la région C terminale de la protéine ne semble pas réadressé au noyau dans le cas d'une mutation G308V par exemple. Si ce fragment n'est plus réadressé au noyau, SHP ne peut être séquestrée. Par conséquent, le taux de *FXR* sera diminué. Cette diminution de l'expression de *FXR* provoquera la diminution de l'expression de *BSEP* puisque *FXR* est un activateur de son expression génique. De plus, *FXR* permet également de potentialiser la liaison à l'ADN de *HNF1 α* . Or ce facteur de transcription est un activateur de *CFTR*. Ainsi la diminution de l'expression de *FXR* provoquera indirectement la diminution de l'expression de *CFTR*. Cette diminution de l'expression de *CFTR* est observable chez certains patients PFIC1 comme a pu le montrer une étude en PCR en Temps réel.

Cette analyse montrant une interaction entre un fragment d'ATP8B1 et SHP nous a conduits à aborder l'étude de l'ensemble des interactions d'ATP8B1 possibles que nous avons détaillé dans la partie résultats de ce manuscrit. La protéine ATP8B1 pourrait donc interagir physiquement avec la protéine CFTR. L'immunoprécipitation que nous avons réalisée avec des anticorps anti-ATP8B1 a permis de montrer la présence parmi les protéines co-immunoprécipitées de la forme glycosylée mais non-phosphorylée de la protéine CFTR (dite forme B) présente uniquement au niveau du réticulum endoplasmique de la cellule. Ces résultats ont pu être corroborés par une analyse *in silico*

de l'interactome conjoint de ces deux protéines qui propose une interaction possible directement entre ces deux protéines ou par l'intermédiaire de PDZK1. La protéine PDZK1 est une protéine impliquée dans la maturation des protéines depuis le réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique interagissant avec les protéines possédant un domaine PDZ. Si ATP8B1 interagit avec CFTR au niveau du réticulum endoplasmique et participe à la bonne maturation de CFTR, il est possible que le rôle de transporteur d'aminophospholipides d'ATP8B1 soit important. En effet, la phosphatidylsérine a déjà été démontré comme étant essentielle à la maturation de la protéine CFTR. Ainsi, dans le cas de la mutation $\Delta F508$, le défaut de maturation a pu être attribué par l'équipe d'Eidelman (2002) à un défaut de reconnaissance de la phosphatidylsérine pour la phosphatidylcholine. ATP8B1 pourrait ainsi avoir un rôle d'enrichissement du microenvironnement proche de CFTR et de protéine passerelle avec PDZK1 afin de permettre une bonne maturation de la protéine au niveau du réticulum endoplasmique. Un tel rôle de la protéine n'avait pas été proposé auparavant.

Cette étude *in silico* sur la séquence de la protéine ATP8B1 a été complétée par une approche structurale de la protéine permettant d'obtenir une représentation 3D partielle de la protéine. La région 101-865 a ainsi pu être obtenue à partir du serveur d'homologie SwissPort. Cette représentation 3D nous a permis d'obtenir une première visualisation tridimensionnelle de la protéine. Ainsi le site ATPasique d'ATP8B1 se trouve dans une poche dont l'entrée est bloquée par le segment 101-308 modélisé ce qui correspondrait à la région clivée lors de la maturation de la protéine ATP8B1. De plus, à l'entrée de ce sillon contenant le site ATPase, une région hautement conservée dans les différentes espèces où la protéine ATP8B1 a été identifiée contenant deux sites proches de phosphorylation par la PKC est d'un intérêt majeur. En effet, une mutation intervenant sur le premier site provoque une forme BRIC de la pathologie alors qu'une mutation intervenant sur le second site provoque une forme PFIC1. Cela nous indique que la phosphorylation de ce segment est importante pour la fonctionnalité de la protéine ATP8B1. De plus, nous avons pu positionner, toujours sur notre modèle 3D, l'ensemble des mutations provoquant un phénotype PFIC1. Un tiers des modifications ponctuelles provoquant cette pathologie sont concentrées dans une sphère de 15 Å de diamètre centré sur le domaine ATPasique et dans le sillon libéré par le clivage des 308 premiers acides aminés. Les mutations présentes dans cette sphère se répartissent sur l'ensemble de la séquence protéique et le repliement correct de la protéine permet leur concentration autour du domaine fonctionnel d'ATP8B1. Ces résultats viennent donc compléter les premiers résultats obtenus et nous conduisent à un modèle structurale cohérent par rapport aux observations cliniques liées à des modifications de la protéine ATP8B1. Ainsi, cette sphère de 15 Å serait capitale dans sa structure

à la fonctionnalité d'ATP8B1, et l'hypothèse de clivage des 308 premiers acides aminés est ici étayée par un encombrement stérique bloquant l'accès au site ATPasique de la protéine en présence de ce fragment. Notre modèle 3D demande à être complété par la région C-terminale de la protéine qui contient entre autre le domaine NRBox, les 6 domaines transmembranaires ainsi que deux domaines d'interaction PDZ.

Afin d'explorer ce rôle de la protéine ATP8B1, nous avons voulu évaluer physiologiquement la fonctionnalité de la protéine CFTR dans différentes lignées cellulaires, tout particulièrement dans les modèles cellulaires disponibles au laboratoire exprimant ATP8B1 portant les mutations G308 ou G1241fs. Cette étude de la fonctionnalité de CFTR a été réalisée à partir de la méthode des efflux d'iode en présence d'un activateur large du canal CFTR, la forskoline ainsi qu'en présence d'un cocktail de forskoline et de l'inhibiteur spécifique de CFTR, l'Inh172, dans le cas où une activation de CFTR pouvait être observée en présence de forskoline.

Ainsi, la lignée HTCR a tout d'abord été utilisée en tant que témoin négatif des efflux mesurés. Cette première lignée a permis de montrer un efflux faible et constant représentant moins de 0,5 pmol d'iode par minute en présence et en absence de forskoline. Ce faible efflux peut être imputable à une diffusion facilitée ou à d'autres transporteurs.

La lignée Mz-ChA-2, exprimant CFTR et ATP8B1, présente un profil très différent avec une stimulation importante de l'efflux d'iode durant une minute correspondant à une vitesse de 30 pmol durant la première minute avant de reprendre une vitesse de 1 pmol durant la fin des mesures. L'efflux sans stimulation a montré une vitesse constante de sortie de l'iode d'environ 6nmol/L par minute. La lignée Mz-ChA-2 est connue pour fortement exprimer CFTR mais aussi d'autres canaux permettant le transport d'iode, les mesures avec l'inhibiteur de CFTR réalisées pour cette lignée montre un profil d'expression proche de celui de la lignée HT-29.

Les résultats pour la lignée intestinale HT29, qui exprime CFTR et ATP8B1 dans leurs formes matures, montrent sans stimulation une vitesse de sortie de 1 pmol par minute. Cette faible sortie peut être due, ici encore à une diffusion facilitée de l'iode. En présence de forskoline, la vitesse d'efflux sur la première minute est proche de 30 pmol par minute puis revient à une vitesse de 1 pmol par minute. Ainsi, après une première stimulation des canaux CFTR sur la première minute, il semble qu'une stimulation plus prolongée ne puisse intervenir. En présence du cocktail forskoline/inhibiteur, la vitesse de sortie de l'iode est de 7 pmol et ne montre aucun pic de sécrétion. L'action de l'inhibiteur montre donc que la présence de ce pic de sécrétion est du à CFTR et qu'il

existe un efflux plus faible d'iode probablement du à l'action d'autres canaux stimulés par la forskoline mais ne permettant pas un efflux d'iode important.

Les cellules portant la mutation G1241fs d'ATP8B1 ont permis de montrer des résultats dont le profil est différent de ceux présentés dans les deux lignées précédentes. Sans stimulation, la vitesse d'efflux de l'iode est proche de 1 pmol par minute durant l'ensemble des mesures. Ce résultat est proche du modèle n'exprimant pas CFTR à la membrane correctement, la ligne HTCR. Cependant, la même lignée soumise à une stimulation forskoline montre un efflux durant 3 minutes ayant une vitesse d'environ 40 pmol par minute puis se stabilise à une vitesse de 1 pmol par minute sur la fin de l'expérience. Ainsi, cette lignée montre une stimulation qui est prolongée (trois minutes au lieu d'une) dans le temps avec une vitesse de sortie légèrement supérieure. Il est donc possible d'envisager que cette lignée soit capable d'accumuler plus d'iode durant la phase d'incubation qui précède l'expérience d'efflux. Une autre hypothèse que nous pouvons formuler est une stimulation prolongée maintenant ouvert plus longtemps les canaux CFTR. Des expériences de patch-clamp pourraient expliquer ce phénomène.

Enfin la dernière lignée utilisée pour ces expériences fonctionnelles de CFTR est la lignée Byler qui exprime le gène ATP8B1 avec la mutation G308V. Les vitesses d'efflux mesurées pour cette lignée en condition standard de culture (37C, %CO₂) montre avec ou sans stimulation une vitesse de sortie de 1 pmol par minute durant l'expérience. Des cellules de la même lignée cultivée en condition de basse température soit 27 C montrent un tout autre profil. Tout d'abord, sans stimulation la vitesse de sortie de l'iode est proche de celle mesurée en condition de culture standard avec une vitesse d'efflux inférieure à 1 pmol par minute de mesure durant l'expérience. Cependant les profils avec stimulation forskoline et en présence du cocktail forskoline/inhibiteur-172 différent de la culture réalisée en condition standard. Ainsi en présence seule de forskoline, lors de la première minute de stimulation une vitesse de sortie de 25 pmol par minute est observée. Après la première minute d'efflux, on observe un retour à une vitesse d'environ 1 pmol par minute. De plus, en présence du cocktail forskoline/inhibiteur 172 on observe une vitesse constante d'efflux d'environ 6nmol/L par minute. Ces résultats montrent que la culture à 27C permet de rétablir l'expression à la membrane de CFTR mais aussi sont activité de transporteur. Afin de vérifier l'hypothèse de l'implication d'ATP8B1 dans la maturation de CFTR nous avons rétabli l'expression de la protéine ATP8B1 mature dans cette lignée portant de façon endogène la mutation G308V du gène ATP8B1.

Pour une population de 60% de cellules transfectées nous avons pu obtenir sans stimulation une vitesse d'efflux de 6 pmol environ, proche de celle observée pour la lignée Mz-ChA-2 également

sans stimulation. Cependant, en présence de forskoline, cette lignée cellulaire corrigée au niveau de l'expression de CFTR a permis de montrer une vitesse d'efflux d'iode sur la première minute proche de 30 pmol par minute, cohérente avec celle observé parmi les lignées exprimant CFTR. En effet, aucune lignée n'exprimant pas CFTR n'a permis d'observer une telle vitesse d'efflux durant la première minute de stimulation par la forskoline. Toutes les lignées exprimant CFTR de façon fonctionnelle, y compris la lignée Byler corrigée avec l'ADNc d'ATP8B1, ont permis de montrer une vitesse d'efflux supérieure à 20 pmol/minute durant la première minute de stimulation à la forskoline.

V-Conclusion

L'ensemble de ces résultats nous conduit à proposer un nouveau schéma global pour le rôle biologique de l'ATPase ATP8B1.

Tout d'abord, la transcription de l'ARNm d'ATP8B1 dans le noyau permet sa traduction en un peptide de 1251 acides aminés au niveau du réticulum endoplasmique où les premières modifications post-traductionnelles comme les glycosylations peuvent intervenir. Dans notre modèle, nous proposons l'existence d'une pré-protéine ATP8B1 d'un poids moléculaire de 180 kDa qui serait ancrée dans la membrane du réticulum. A ce niveau, elle pourrait subir un clivage en position 308 afin de générer un peptide de 145 kDa qui devrait assurer un rôle de flippase de la phosphatidylsérine du cytoplasme vers la lumière du réticulum. Ce peptide de 145 kDa n'a pas pu être décelé au sein d'une lignée issue de cellules d'un patient PFIC1 portant la mutation G308V, inhibant le site de coupure par une endopeptidase présent à ce niveau de la chaîne peptidique. Le clivage du peptide permet l'activation de la fonction ATPasique indispensable pour le transport de la phosphatidylsérine. Cette partie N-terminale de la protéine bloque l'accès de l'ATP au site actif de la protéine ce qui rend le peptide 180 kDa non fonctionnel. Un tiers des modifications provoquées par des mutations PFIC1 ponctuelles ou des courtes délétions sont contenues dans une sphère de 15 Å correspondant à l'environnement peptidique de ce domaine ATPase. Il serait donc indispensable pour le bon fonctionnement de la protéine ATP8B1.

Toujours au sein du réticulum endoplasmique, la protéine CFTR est également traduite et permet la présence d'un polypeptide rapidement glycosylée (forme dite core-glycosylated). Le polypeptide ATP8B1 interagirait alors physiquement, directement ou indirectement, avec CFTR afin d'enrichir son microenvironnement en phosphatidylsérine, requise pour sa bonne maturation. Cette interaction physique a pu être mise en évidence par l'intermédiaire d'immunoprécipitations présentées dans ce travail. Ces immunoprécipitations ont permis de montrer une interaction entre le peptide de 180 kDa ou 145 kDa d'ATP8B1 et celui de 145 kDa de CFTR confortant ainsi le modèle que nous

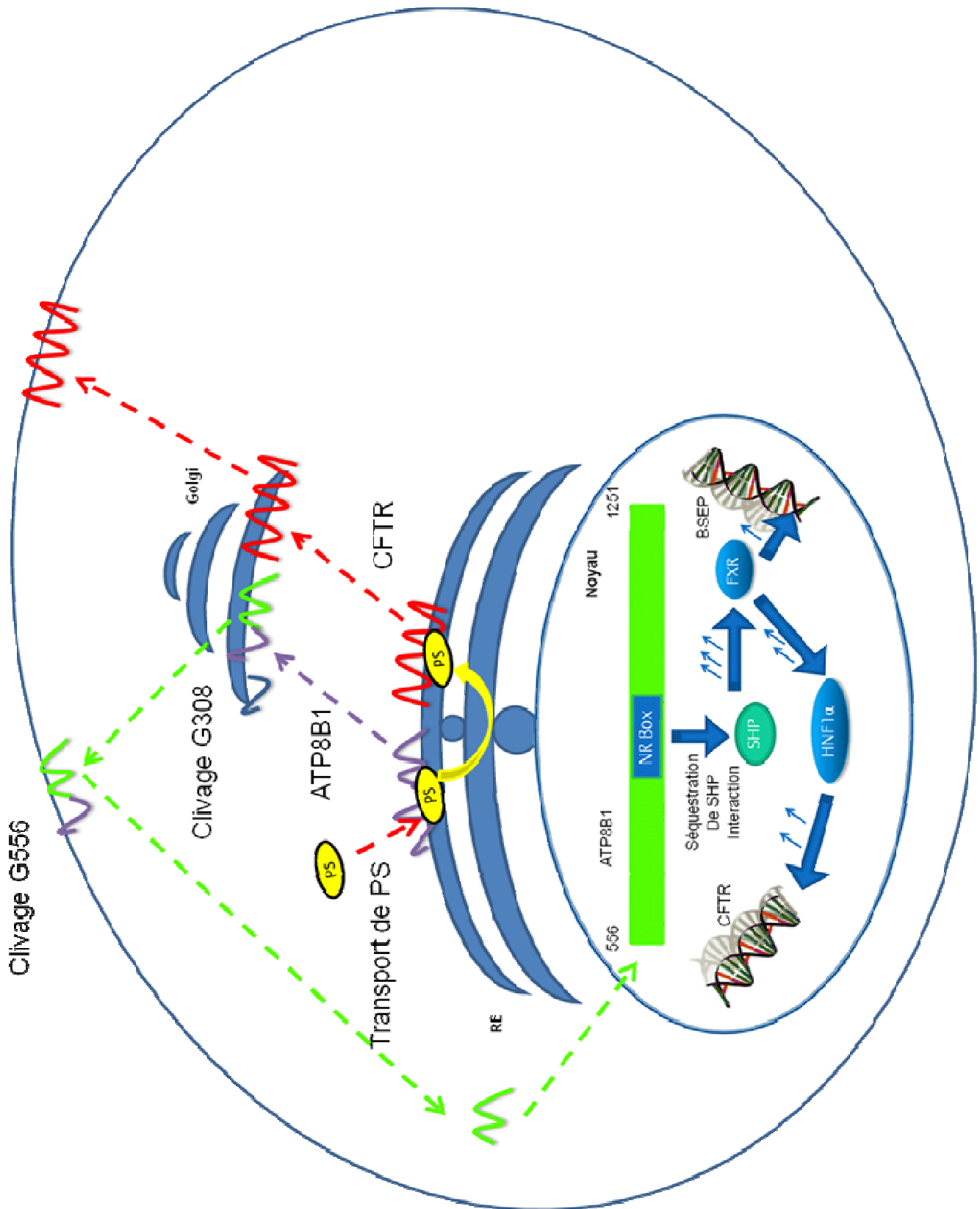
proposons. L'analyse in silico de la séquence peptidique d'ATP8B1 a montré l'existence de domaines PDZ et l'étude de l'interactome a permis de mettre en évidence l'existence d'un lien entre ATP8B1 et PDZK1. PDZK1 est connue comme étant une protéine chaperonne, partenaire de CFTR, et son rôle supposé dans notre système serait de permettre la formation d'un complexe protéique entre ATP8B1 et CFTR.

Les protéines seraient par la suite acheminées vers l'appareil de Golgi afin de terminer leurs maturations pour être adressé au site final de localisation cellulaire. A un endroit non défini qui pourrait être l'appareil de Golgi, ATP8B1 subirait un nouveau clivage en position G556 permettant une myristoylation en vue du réadressage d'un peptide d'environ 90 kDa, correspondant à la région G556-S1251 d'ATP8B1, vers le noyau. Ce réadressage vers le noyau permettrait à ATP8B1 de jouer un rôle de régulateur de transcription via la région consensus d'interaction avec un récepteur nucléaire, la NRBox. Cette région consensus permet une interaction avec SHP, la Small Heterodimer Protein, qui est un inhibiteur de la transcription de FXR, le Farnesoid X Receptor. Or l'expression génique de FXR est diminuée chez les patients PFIC1. De plus, FXR est un activateur de la transcription de BSEP, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'expression génique de BSEP, l'absence de sécrétion des acides biliaires observée chez les patients PFIC1 et donc le développement de la pathologie. Enfin, FXR potentialise la liaison d'HNF1 α à l'ADN, un facteur nucléaire des hépatocytes. HNF1 α est également identifié comme un activateur de CFTR. Ainsi, la diminution d'expression génique de CFTR observée chez les patients PFIC1 serait due à une diminution de son activation via HNF1 α qui pourrait être provoquée par une diminution de l'expression de FXR sachant que l'expression génique de FXR est sous le contrôle de son inhibiteur de transcription SHP. Par conséquent, dans le noyau, le fragment G556-1251 aurait pour rôle de séquestrer SHP via son interaction au niveau de la NRBox. Cette séquestration permet l'expression de FXR et donc l'expression génique de BSEP et de CFTR grâce à l'action potentialisée d'HNF1 α .

En cas de défaut d'expression de ce fragment au sein du noyau, SHP ne serait plus correctement séquestrée et par conséquent l'expression génique de FXR serait diminuée. Cette diminution serait ainsi observable au niveau de l'expression de BSEP et de CFTR ; celle ci a pu être identifiée par PCR en Temps réel sur des tissus de patients PFIC1.

Les données bibliographiques ainsi que les résultats présentés dans cette étude donnent un éclairage nouveau à la pathologie PFIC1. L'absence d'ATP8B1 fonctionnel provoque la perte du transport de phosphatidylsérine, la diminution drastique de la synthèse de BSEP empêchant le transport des acides biliaires ainsi qu'une diminution de l'expression de CFTR, induisant une faible hydratation de la bile. Ces différents phénomènes conduisent à des symptômes partagés entre les patients PFIC1 et les patients.

L'ensemble de ces résultats et analyses nous conduit à proposer un schéma de synthèse regroupant les différentes hypothèses émises sur la fonctionnalité d'ATP8B1 au sein d'une cellule.



Représentation schématique du modèle hypothétique des fonctions biologiques d'ATP8B1.

Perspectives

Les travaux menés dans le cadre de cette thèse ont pu apporter un éclairage sur deux des mutations les plus fréquentes du gène *ATP8B1*. Dans la continuité de ce travail, nous sommes en train de développer des lignées cellulaires contenant différentes constructions de plasmide portant des mutations de l'ADNc d'*ATP8B1* que nous souhaitons rendre stable. Nous allons essayer de reproduire la mutation la plus fréquente dans les populations esquimaudes du Groenland (D554N) que nous situons au niveau d'un site de clivage de la protéine, ainsi que plusieurs mutations présentes au niveau du domaine ATPase (D454G et T456M). De plus, nous envisageons de réaliser de nouvelles lignées stables comportant de nouvelles mutations d'*ATP8B1* telles que G892R (très fréquente dans la population irlandaise) ou R600W et R602X, localisé au niveau d'un site riche en domaine consensus de phosphorylation. Toutes ces constructions permettront de développer une étude fonctionnelle d'*ATP8B1*.

Nous envisageons également d'explorer le lien possible entre PDZK1 et *ATP8B1* pour différentes lignées exprimant ces deux protéines mais aussi au sein de nos modèles cellulaires exprimant un gène *ATP8B1* muté par immunoprécipitation de ce complexe et révélation par des anticorps spécifiques.

Enfin la recherche de la localisation subcellulaire d'*ATP8B1*, ainsi que de ses différentes formes sera explorée à partir de modèles cellulaires exprimant la version fonctionnelle d'*ATP8B1* via un modèle cholangiocytaire et un modèle intestinal. L'effet des mutations dans le gène *ATP8B1* sur la localisation subcellulaire de la protéine sera également recherché.

Table des Illustrations

Figure 1: Anatomie générale du foie.....	13
Figure 2 : Schéma d'un lobule hépatique.....	14
Figure 3 : Représentation schématique de la protéine ATP8B1	25
Figure 4 : Représentation schématique de la protéine CFTR.....	27
Figure 5 : Classification des mutations de CFTR.....	28
Figure 6 : Interactions connues de la protéine CFTR.....	40
Figure 7 : Résultats de RT-PCR pour les lignées HT29, Calu-3 (Panel A); Mz-ChA-2, HTCR (Panel B) et Bric, Byler (Panel C).	55
Figure 8: Expression relative normalisée par rapport à l'expression de la Beta Actine après 24h de culture en présence de PMA, 4aPDD ou forskoline (n=3). Test statistique Fisher-Snedecor entre une condition donnée et le témoin. La diminution observée entre les conditions PMA[0,1] et PMA[0,2] sont également significatives pour ATP8B1 (p=0,04)et pour CFTR (p=0,00001).	56
Figure 9a: Immunodétection d'ATP8B1 pour des quantités croissantes (20, 40, 60µg) de protéines totales de la lignée Calu-3 (Panneau A) et pour 80 µg de protéines totales des lignées HT-29(1), Bric (2) et Byler (3) (Panneau B).	58
Figure 10: Immunodétection de la protéine CFTR pour 100µg de protéines totales extraites des lignées Byler (A), Bric (B) et Calu-3(C).	61
Figure 11: Détection par immunofluorescence d'ATP8B1 et de CFTR pour la lignée Calu-3.....	62
Figure 12: Détection par immunofluorescence d'ATP8B1 et de CFTR pour la lignée Bric.....	64
Figure 13 : Détection par immunofluorescence d'ATP8B1 et de CFTR pour la lignée Byler.....	64
Figure 14 : Alignement des séquences protéiques des membres de la famille ATP8B chez <i>Homo sapiens</i>	66
Figure 15 : Alignement inter-espèces des séquences identifiées d'ATP8B1.....	73
Figure 16: Diagramme de Kyte-Doolittle d'ATP8B1	74
Figure 17: Représentation 2D de la protéine ATP8B1.....	78
Figure 18 : Alignement inter-espèces d'un domaine de phosphorylation d'intérêt d'ATP8B1.....	80
Figure 19 : Comparaison des séquences d'ATP8B2a et ATPB2b	68
Figure 20 : Structure de la région ARN correspondant à la région différente entre ATP8B2a et ATP8B2b (MFOLD).....	71

Figure 21 : Représentation du modèle 3D partiel d'ATP8B1 obtenu	87
Figure 22 : Comparaison de la structure d'ATP8B1 avant et après clivage des 308 premiers acides aminés	88
Figure 23: Représentation de la sphère d'intérêt de 15 Å autour de la fonction ATPase d'ATP8B1	89
Figure 24: Immunoprécipitation anti-ATP8B1 révélée par des anticorps anti-ATP8B1 ou anti-CFTR ..	91
Figure 25: Interactome minimum entre ATP8B1 et CFTR chez <i>Homo sapiens</i>	94
Figure 26: Interactome obtenu par l'approche des COGs entre CFTR et ATP8B1 chez <i>Homo sapiens</i> .	95
Figure 27: Interactome d'ATP8B1 obtenu chez <i>Homo sapiens</i> par Text Mining (Mars 2008) STRING Server	96
Figure 28: Interactome d'ATP8B1 (ENSMUSP00000025482) obtenu chez <i>Mus musculus</i> par Text Mining (Mars 2008) STRING Server.....	98
Figure 29: Efflux Iode mesuré pour la lignée HT-29 (n=9).....	100
Figure 30: Efflux Iode mesuré pour la lignée Mz-ChA-2 (n=9)	101
Figure 31 : Efflux Iode mesuré pour la lignée HTCR (n=9).....	101
Figure 32 : Efflux Iode mesuré pour la lignée Bric (n=9)	102
Figure 33 : Efflux Iode mesuré pour la lignée Byler à 37°C (n=9).....	103
Figure 34 : Efflux Iode mesuré pour la lignée Byler à 27C (n=9)	104
Figure 35: Efflux Iode mesuré pour la lignée Byler transfectée par le plasmide pEGFP-A2 (n=3)	105

Table des Tableaux

Tableau 1 : Mutations provoquant une cholestase intra-hépatique familiale progressive de type 1 (PFIC1).	26
Tableau 2 : Mutations provoquant une cholestase intra-hépatique récurrente bénigne (BRIC).	26
Tableau 3 : Amorces PCR utilisées.....	46
Tableau 4 : Numéros d'accession (Pubmed) des séquences utilisées.....	72
Tableau 5: Localisation et orientation des domaines transmembranaires d'ATP8B1	75
Tableau 6 : Alignement au sein de la famille des ATP8B chez <i>Homo sapiens</i> d'un site d'intérêt de myristoylation.....	81
Tableau 7 : Alignement au sein de la famille ATP8B chez <i>Homo sapiens</i> du domaine NRBox	83
Tableau 8 : Alignement du site contenant la Glycine 308 d'ATP8B1 au sein de la famille ATP8B chez <i>Homo sapiens</i>	85

Bibliographie

- Agnel, M., T. Vermat and J. M. Culouscou (1999). "Identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea." FEBS Lett **455**(3): 295-301.
- Aleksandrov, A. A., X. Chang, L. Aleksandrov and J. R. Riordan (2000). "The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating." J Physiol **528 Pt 2**: 259-65.
- Alonso, E. M., D. C. Snover, A. Montag, D. K. Freese and P. F. Whittington (1994). "Histologic pathology of the liver in progressive familial intrahepatic cholestasis." J Pediatr Gastroenterol Nutr **18**(2): 128-33.
- Alvarez, L., P. Jara, E. Sanchez-Sabate, L. Hierro, J. Larrauri, M. C. Diaz, C. Camarena, A. De la Vega, E. Frauca, E. Lopez-Collazo and P. Lapunzina (2004). "Reduced hepatic expression of farnesoid X receptor in hereditary cholestasis associated to mutation in ATP8B1." Hum Mol Genet **13**(20): 2451-60.
- Ando-Akatsuka, Y., I. F. Abdullaev, E. L. Lee, Y. Okada and R. Z. Sabirov (2002). "Down-regulation of volume-sensitive Cl⁻ channels by CFTR is mediated by the second nucleotide-binding domain." Pflugers Arch **445**(2): 177-86.
- Apell, H. J. (2004). "How do P-type ATPases transport ions?" Bioelectrochemistry **63**(1-2): 149-56.
- Arnell, H., A. Nemeth, G. Anneren and N. Dahl (1997). "Progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): evidence for genetic heterogeneity by exclusion of linkage to chromosome 18q21-q22." Hum Genet **100**(3-4): 378-81.
- Auland, M. E., B. D. Roufogalis, P. F. Devaux and A. Zachowski (1994). "Reconstitution of ATP-dependent aminophospholipid translocation in proteoliposomes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10938-42.
- Axelsen, K. B. and M. G. Palmgren (1998). "Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily." J Mol Evol **46**(1): 84-101.
- Bagorda, A., L. Guerra, F. Di Sole, C. Hemle-Kolb, R. A. Cardone, T. Fanelli, S. J. Reshkin, S. M. Gisler, H. Murer and V. Casavola (2002). "Reciprocal protein kinase A regulatory interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 in a renal polarized epithelial cell model." J Biol Chem **277**(24): 21480-8.
- Baird, W. M. and R. K. Boutwell (1971). "Tumor-promoting activity of phorbol and four diesters of phorbol in mouse skin." Cancer Res **31**(8): 1074-9.
- Baker, D. and A. Sali (2001). "Protein structure prediction and structural genomics." Science **294**(5540): 93-6.
- Ballou, M., C. Z. Margolis, B. Schachtel and Y. E. Hsia (1973). "Progressive familial intrahepatic cholestasis." Pediatrics **51**(6): 998-1007.

- Bals, R. (2000). "Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection." Respir Res **1**(3): 141-50.
- Bals, R., D. J. Weiner, R. L. Meegalla, F. Accurso and J. M. Wilson (2001). "Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid." Am J Respir Cell Mol Biol **25**(1): 21-5.
- Bargon, J., B. C. Trapnell, K. Yoshimura, W. Dalemans, A. Pavirani, J. P. Lecocq and R. G. Crystal (1992). "Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene can be regulated by protein kinase C." J Biol Chem **267**(23): 16056-60.
- Bassas, A., M. Chehab, H. Hebby, M. Al Shahed, H. Al Hussein, A. Al Zahrani and S. Wali (2003). "Living related liver transplantation in 13 cases of progressive familial intrahepatic cholestasis." Transplant Proc **35**(8): 3003-5.
- Beuers, U., M. Bilzer, A. Chittattu, G. A. Kullak-Ublick, D. Keppler, G. Paumgartner and F. Dombrowski (2001). "Tauroursodeoxycholic acid inserts the apical conjugate export pump, Mrp2, into canalicular membranes and stimulates organic anion secretion by protein kinase C-dependent mechanisms in cholestatic rat liver." Hepatology **33**(5): 1206-16.
- Bezprozvanny, I. and A. Maximov (2001). "Classification of PDZ domains." FEBS Lett **509**(3): 457-62.
- Bompadre, S. G. and T. C. Hwang (2007). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: a chloride channel gated by ATP binding and hydrolysis." Sheng Li Xue Bao **59**(4): 431-42.
- Boucher, R. C. (2004). "New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease." Eur Respir J **23**(1): 146-58.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brone, B. and J. Eggermont (2005). "PDZ proteins retain and regulate membrane transporters in polarized epithelial cell membranes." Am J Physiol Cell Physiol **288**(1): C20-9.
- Brouillard, F., M. Bouthier, T. Leclerc, A. Clement, M. Baudouin-Legros and A. Edelman (2001). "NF-kappa B mediates up-regulation of CFTR gene expression in Calu-3 cells by interleukin-1beta." J Biol Chem **276**(12): 9486-91.
- Bucheimer, R. E. and J. Linden (2004). "Purinergic regulation of epithelial transport." J Physiol **555**(Pt 2): 311-21.
- Bull, L. N., V. E. Carlton, N. L. Stricker, S. Baharloo, J. A. DeYoung, N. B. Freimer, M. S. Magid, E. Kahn, J. Markowitz, F. J. DiCarlo, L. McLoughlin, J. T. Boyle, B. B. Dahms, P. R. Faught, J. F. Fitzgerald, D. A. Piccoli, C. L. Witzleben, N. C. O'Connell, K. D. Setchell, R. M. Agostini, Jr., S. A. Kocoshis, J. Reyes and A. S. Knisely (1997). "Genetic and morphological findings in progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease [PFIC-1] and Byler syndrome): evidence for heterogeneity." Hepatology **26**(1): 155-64.

- Bull, L. N., M. J. van Eijk, L. Pawlikowska, J. A. DeYoung, J. A. Juijn, M. Liao, L. W. Klomp, N. Lomri, R. Berger, B. F. Scharschmidt, A. S. Knisely, R. H. Houwen and N. B. Freimer (1998). "A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis." Nat Genet **18**(3): 219-24.
- Cabrera-Abreu, J. C. and A. Green (2002). "Gamma-glutamyltransferase: value of its measurement in paediatrics." Ann Clin Biochem **39**(Pt 1): 22-5.
- Cafferata, E. G., A. M. Gonzalez-Guerrico, L. Giordano, O. H. Pivetta and T. A. Santa-Coloma (2000). "Interleukin-1beta regulates CFTR expression in human intestinal T84 cells." Biochim Biophys Acta **1500**(2): 241-8.
- Cai, S. Y., L. Wang, N. Ballatori and J. L. Boyer (2001). "Bile salt export pump is highly conserved during vertebrate evolution and its expression is inhibited by PFIC type II mutations." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **281**(2): G316-22.
- Carlton, V. E., A. S. Knisely and N. B. Freimer (1995). "Mapping of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease) to 18q21-q22, the benign recurrent intrahepatic cholestasis region." Hum Mol Genet **4**(6): 1049-53.
- Carlton, V. E., L. Pawlikowska and L. N. Bull (2004). "Molecular basis of intrahepatic cholestasis." Ann Med **36**(8): 606-17.
- Caron, S., B. Cariou and B. Staels (2006). "FXR: More than a bile acid receptor?" Endocrinology **147**(9): 4022-4.
- Catty, P., A. de Kerchove d'Exaerde and A. Goffeau (1997). "The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases." FEBS Lett **409**(3): 325-32.
- Cavestro, G. M., L. Frulloni, E. Cerati, L. A. Ribeiro, V. Corrente, M. Sianesi, A. Franze and F. Di Mario (2002). "Progressive familial intrahepatic cholestasis." Acta Biomed Ateneo Parmense **73**(3-4): 53-6.
- Chen, F., M. Ananthanarayanan, S. Emre, E. Neimark, L. N. Bull, A. S. Knisely, S. S. Strautnieks, R. J. Thompson, M. S. Magid, R. Gordon, N. Balasubramanian, F. J. Suchy and B. L. Shneider (2004). "Progressive familial intrahepatic cholestasis, type 1, is associated with decreased farnesoid X receptor activity." Gastroenterology **126**(3): 756-64.
- Chen, H. L., Y. J. Liu, C. H. Feng, C. Y. Wu, M. K. Shyu, R. H. Yuan and M. H. Chang (2005). "Developmental expression of canalicular transporter genes in human liver." J Hepatol **43**(3): 472-7.
- Chevet, E., C. A. Jakob, D. Y. Thomas and J. J. Bergeron (1999). "Calnexin family members as modulators of genetic diseases." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 473-80.
- CJ, L. G. S. (2000). "Régulation du métabolisme du cholestérol et des acides biliaries par les récepteurs nucléaires LXR et FXR." Médecine / Sciences **16**(12): 1456-1458.
- Clarke, L. L. and M. C. Harline (1996). "CFTR is required for cAMP inhibition of intestinal Na⁺ absorption in a cystic fibrosis mouse model." Am J Physiol **270**(2 Pt 1): G259-67.

- Clayton, R. J., F. L. Iber, B. H. Ruebner and V. A. McKusick (1969). "Byler disease. Fatal familial intrahepatic cholestasis in an Amish kindred." Am J Dis Child **117**(1): 112-24.
- Cohran, V. C. and J. E. Heubi (2003). "Treatment of Pediatric Cholestatic Liver Disease." Curr Treat Options Gastroenterol **6**(5): 403-415.
- Colombo, C., A. Crosignani and P. M. Battezzati (1999). "Liver involvement in cystic fibrosis." J Hepatol **31**(5): 946-54.
- Colombo, C., M. C. Russo, L. Zazzeron and G. Romano (2006). "Liver disease in cystic fibrosis." J Pediatr Gastroenterol Nutr **43 Suppl 1**: S49-55.
- Cormet-Boyaka, E., A. Di, S. Y. Chang, A. P. Naren, A. Tousson, D. J. Nelson and K. L. Kirk (2002). "CFTR chloride channels are regulated by a SNAP-23/syntaxin 1A complex." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12477-82.
- Davenport, S. E., M. Mergey, G. Cherqui, R. C. Boucher, C. Gespach and S. E. Gabriel (1996). "Deregulated expression and function of CFTR and Cl⁻ secretion after activation of the Ras and Src/PyMT pathways in Caco-2 cells." Biochem Biophys Res Commun **229**(2): 663-72.
- Davis, P. B. (1991). "Molecular and cell biology of cystic fibrosis." J Appl Physiol **70**(5): 2331-3.
- Davis, P. B. (2006). "Cystic fibrosis since 1938." Am J Respir Crit Care Med **173**(5): 475-82.
- Dean, M. and T. Annilo (2005). "Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates." Annu Rev Genomics Hum Genet **6**: 123-42.
- Deleuze, J. F., E. Jacquemin, C. Dubuisson, D. Cresteil, M. Dumont, S. Erlinger, O. Bernard and M. Hadchouel (1996). "Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis." Hepatology **23**(4): 904-8.
- Demeilliers, C., E. Jacquemin, V. Barbu, M. Mergey, F. Paye, L. Fouassier, N. Chignard, C. Housset and N. E. Lomri (2006). "Altered hepatobiliary gene expressions in PFIC1: ATP8B1 gene defect is associated with CFTR downregulation." Hepatology **43**(5): 1125-34.
- Dharmasathaphorn, K., P. A. Huott, P. Vongkovit, G. Beuerlein, S. J. Pandol and H. V. Ammon (1989). "Cl⁻ secretion induced by bile salts. A study of the mechanism of action based on a cultured colonic epithelial cell line." J Clin Invest **84**(3): 945-53.
- Diella, F., S. Cameron, C. Gemund, R. Linding, A. Via, B. Kuster, T. Sicheritz-Ponten, N. Blom and T. J. Gibson (2004). "Phospho.ELM: a database of experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins." BMC Bioinformatics **5**: 79.
- Egan, M. E., E. M. Schwiebert and W. B. Guggino (1995). "Differential expression of ORCC and CFTR induced by low temperature in CF airway epithelial cells." Am J Physiol **268**(1 Pt 1): C243-51.
- Eidelman, O., S. BarNoy, M. Razin, J. Zhang, P. McPhie, G. Lee, Z. Huang, E. J. Sorscher and H. B. Pollard (2002). "Role for phospholipid interactions in the trafficking defect of Delta F508-CFTR." Biochemistry **41**(37): 11161-70.

- Eppens, E. F., S. W. van Mil, J. M. de Vree, K. S. Mok, J. A. Juijn, R. P. Oude Elferink, R. Berger, R. H. Houwen and L. W. Klomp (2001). "FIC1, the protein affected in two forms of hereditary cholestasis, is localized in the cholangiocyte and the canalicular membrane of the hepatocyte." J Hepatol **35**(4): 436-43.
- Feranchak, A. P. (2004). "Hepatobiliary complications of cystic fibrosis." Curr Gastroenterol Rep **6**(3): 231-9.
- Ferenci, P., G. Zollner and M. Trauner (2002). "Hepatic transport systems." J Gastroenterol Hepatol **17 Suppl**: S105-12.
- Finn, R. D., J. Mistry, B. Schuster-Bockler, S. Griffiths-Jones, V. Hollich, T. Lassmann, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, R. Durbin, S. R. Eddy, E. L. Sonnhammer and A. Bateman (2006). "Pfam: clans, web tools and services." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D247-51.
- Fujii, K., G. Zhu, Y. Liu, J. Hallam, L. Chen, J. Herrero and S. Shaw (2004). "Kinase peptide specificity: improved determination and relevance to protein phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13744-9.
- Fuller, C. M., H. L. Ji, A. Tousson, R. C. Elble, B. U. Pauli and D. J. Benos (2001). "Ca(2+)-activated Cl(-) channels: a newly emerging anion transport family." Pflugers Arch **443 Suppl 1**: S107-10.
- Gabriel, S. E., L. L. Clarke, R. C. Boucher and M. J. Stutts (1993). "CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship." Nature **363**(6426): 263-8.
- Gattiker, A., E. Gasteiger and A. Bairoch (2002). "ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool." Appl Bioinformatics **1**(2): 107-8.
- Graham, T. R. (2004). "Flippases and vesicle-mediated protein transport." Trends Cell Biol **14**(12): 670-7.
- Guggino, W. B. (2004). "The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins." Proc Am Thorac Soc **1**(1): 28-32.
- Hanrahan, J. W. and M. A. Wioland (2004). "Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function." Proc Am Thorac Soc **1**(1): 17-21.
- Harris, M. J. and I. M. Arias (2003). "FIC1, a P-type ATPase linked to cholestatic liver disease, has homologues (ATP8B2 and ATP8B3) expressed throughout the body." Biochim Biophys Acta **1633**(2): 127-31.
- Hirtz, S., T. Gonska, H. H. Seydewitz, J. Thomas, P. Greiner, J. Kuehr, M. Brandis, I. Eichler, H. Rocha, A. I. Lopes, C. Barreto, A. Ramalho, M. D. Amaral, K. Kunzelmann and M. Mall (2004). "CFTR Cl- channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis." Gastroenterology **127**(4): 1085-95.
- Hofmann, A. F. (2007). "Biliary secretion and excretion in health and disease: current concepts." Ann Hepatol **6**(1): 15-27.

- Hulo, N., A. Bairoch, V. Bulliard, L. Cerutti, B. A. Cuche, E. de Castro, C. Lachaize, P. S. Langendijk-Genevaux and C. J. Sigrist (2008). "The 20 years of PROSITE." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D245-9.
- Hung, A. Y. and M. Sheng (2002). "PDZ domains: structural modules for protein complex assembly." J Biol Chem **277**(8): 5699-702.
- Imundo, L., J. Barasch, A. Prince and Q. Al-Awqati (1995). "Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(7): 3019-23.
- Jacquemin, E., D. Hermans, A. Myara, D. Habes, D. Debray, M. Hadchouel, E. M. Sokal and O. Bernard (1997). "Ursodeoxycholic acid therapy in pediatric patients with progressive familial intrahepatic cholestasis." Hepatology **25**(3): 519-23.
- Jansen, P. L. and M. Muller (2000). "Genetic cholestasis: lessons from the molecular physiology of bile formation." Can J Gastroenterol **14**(3): 233-8.
- Jelen, F., A. Oleksy, K. Smietana and J. Otlewski (2003). "PDZ domains - common players in the cell signaling." Acta Biochim Pol **50**(4): 985-1017.
- Johansson, L., A. Bavner, J. S. Thomsen, M. Farnegardh, J. A. Gustafsson and E. Treuter (2000). "The orphan nuclear receptor SHP utilizes conserved LXXLL-related motifs for interactions with ligand-activated estrogen receptors." Mol Cell Biol **20**(4): 1124-33.
- Kalin, N., A. Claass, M. Sommer, E. Puchelle and B. Tummler (1999). "DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis." J Clin Invest **103**(10): 1379-89.
- Kay, B. K. and J. W. Kehoe (2004). "PDZ domains and their ligands." Chem Biol **11**(4): 423-5.
- Khan, T. Z., J. S. Wagener, T. Bost, J. Martinez, F. J. Accurso and D. W. Riches (1995). "Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis." Am J Respir Crit Care Med **151**(4): 1075-82.
- Klomp, L. W., J. C. Vargas, S. W. van Mil, L. Pawlikowska, S. S. Strautnieks, M. J. van Eijk, J. A. Juijn, C. Pabon-Pena, L. B. Smith, J. A. DeYoung, J. A. Byrne, J. Gombert, G. van der Brugge, R. Berger, I. Jankowska, J. Pawlowska, E. Villa, A. S. Knisely, R. J. Thompson, N. B. Freimer, R. H. Houwen and L. N. Bull (2004). "Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis." Hepatology **40**(1): 27-38.
- Knisely, A. S. (2000). "Progressive familial intrahepatic cholestasis: a personal perspective." Pediatr Dev Pathol **3**(2): 113-25.
- Knisely, A. S. (2004). "Progressive familial intrahepatic cholestasis: an update." Pediatr Dev Pathol **7**(4): 309-14.
- Knowles, M., J. Gatzky and R. Boucher (1981). "Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis." N Engl J Med **305**(25): 1489-95.
- Knowles, M. R., M. J. Stutts, J. R. Yankaskas, J. T. Gatzky and R. C. Boucher, Jr. (1986). "Abnormal respiratory epithelial ion transport in cystic fibrosis." Clin Chest Med **7**(2): 285-97.

- Kozak, M. (1986). "Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(9): 2850-4.
- Kozak, M. (1990). "Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8301-5.
- Kreda, S. M., M. Mall, A. Mengos, L. Rochelle, J. Yankaskas, J. R. Riordan and R. C. Boucher (2005). "Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia." Mol Biol Cell **16**(5): 2154-67.
- Kullak-Ublick, G. A. and P. J. Meier (2000). "Mechanisms of cholestasis." Clin Liver Dis **4**(2): 357-85.
- Kunzelmann, K., G. L. Kiser, R. Schreiber and J. R. Riordan (1997). "Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." FEBS Lett **400**(3): 341-4.
- Kunzelmann, K. and M. Mall (2001). "Pharmacotherapy of the ion transport defect in cystic fibrosis." Clin Exp Pharmacol Physiol **28**(11): 857-67.
- Kunzelmann, K. and M. Mall (2002). "Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease." Physiol Rev **82**(1): 245-89.
- Kunzelmann, K., R. Schreiber and A. Boucherot (2001). "Mechanisms of the inhibition of epithelial Na⁽⁺⁾ channels by CFTR and purinergic stimulation." Kidney Int **60**(2): 455-61.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." J Mol Biol **157**(1): 105-32.
- Lamprecht, G. and U. Seidler (2006). "The emerging role of PDZ adapter proteins for regulation of intestinal ion transport." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **291**(5): G766-77.
- Lazaridis, K. N., G. J. Gores and K. D. Lindor (2001). "Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'." J Hepatol **35**(1): 134-46.
- Liedtke, C. M. (1992). "Electrolyte transport in the epithelium of pulmonary segments of normal and cystic fibrosis lung." Faseb J **6**(12): 3076-84.
- Lomri, N., J. G. Fitz and B. F. Scharschmidt (1996). "Hepatocellular transport: role of ATP-binding cassette proteins." Semin Liver Dis **16**(2): 201-10.
- Loo, M. A., T. J. Jensen, L. Cui, Y. Hou, X. B. Chang and J. R. Riordan (1998). "Perturbation of Hsp90 interaction with nascent CFTR prevents its maturation and accelerates its degradation by the proteasome." Embo J **17**(23): 6879-87.
- Lykavieris, P., S. van Mil, D. Cresteil, M. Fabre, M. Hadchouel, L. Klomp, O. Bernard and E. Jacquemin (2003). "Progressive familial intrahepatic cholestasis type 1 and extrahepatic features: no catch-up of stature growth, exacerbation of diarrhea, and appearance of liver steatosis after liver transplantation." J Hepatol **39**(3): 447-52.

- Ma, H. P., Z. H. Zhou, Y. Y. Liang, S. Saxena and D. G. Warnock (2004). "Acidic ATP activates lymphocyte outwardly rectifying chloride channels via a novel pathway." Pflugers Arch **449**(1): 96-105.
- MacLennan, D. H. and N. M. Green (2000). "Structural biology. Pumping ions." Nature **405**(6787): 633-4.
- Mall, M., B. R. Grubb, J. R. Harkema, W. K. O'Neal and R. C. Boucher (2004). "Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice." Nat Med **10**(5): 487-93.
- Mall, M., S. M. Kreda, A. Mengos, T. J. Jensen, S. Hirtz, H. H. Seydewitz, J. Yankaskas, K. Kunzelmann, J. R. Riordan and R. C. Boucher (2004). "The DeltaF508 mutation results in loss of CFTR function and mature protein in native human colon." Gastroenterology **126**(1): 32-41.
- Mauricio, A. C., M. Slawik, D. Heitzmann, T. von Hahn, R. Warth, M. Bleich and R. Greger (2000). "Deoxycholic acid (DOC) affects the transport properties of distal colon." Pflugers Arch **439**(5): 532-40.
- McCarthy, V. A. and A. Harris (2005). "The CFTR gene and regulation of its expression." Pediatr Pulmonol **40**(1): 1-8.
- McNicholas, C. M., W. B. Guggino, E. M. Schwiebert, S. C. Hebert, G. Giebisch and M. E. Egan (1996). "Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 8083-8.
- Melter, M., B. Rodeck, R. Kardorff, P. F. Hoyer, C. Petersen, A. Ballauff and J. Brodehl (2000). "Progressive familial intrahepatic cholestasis: partial biliary diversion normalizes serum lipids and improves growth in noncirrhotic patients." Am J Gastroenterol **95**(12): 3522-8.
- Mogayzel, P. J., Jr., M. Esmail, T. L. Wagner, P. L. Zeitlin and M. Ashlock (2002). "cis-Acting elements within CFTR 5'-flanking DNA are not sufficient to decrease gene expression in response to phorbol ester." Biochim Biophys Acta **1576**(3): 306-15.
- Mulder, N. J., R. Apweiler, T. K. Attwood, A. Bairoch, A. Bateman, D. Binns, P. Bork, V. Buillard, L. Cerutti, R. Copley, E. Courcelle, U. Das, L. Daugherty, M. Dibley, R. Finn, W. Fleischmann, J. Gough, D. Haft, N. Hulo, S. Hunter, D. Kahn, A. Kanapin, A. Kejariwal, A. Labarga, P. S. Langendijk-Genevaux, D. Lonsdale, R. Lopez, I. Letunic, M. Madera, J. Maslen, C. McAnulla, J. McDowall, J. Mistry, A. Mitchell, A. N. Nikolskaya, S. Orchard, C. Orengo, R. Petryszak, J. D. Selengut, C. J. Sigrist, P. D. Thomas, F. Valentin, D. Wilson, C. H. Wu and C. Yeats (2007). "New developments in the InterPro database." Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D224-8.
- Nagase, T., R. Kikuno and O. Ohara (2001). "Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XXII. The complete sequences of 50 new cDNA clones which code for large proteins." DNA Res **8**(6): 319-27.
- Nilius, B. and G. Droogmans (2003). "Amazing chloride channels: an overview." Acta Physiol Scand **177**(2): 119-47.

- Oswald, C., I. B. Holland and L. Schmitt (2006). "The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us?" Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **372**(6): 385-99.
- Oude Elferink, R. P. and A. K. Groen (1999). "The mechanism of biliary lipid secretion and its defects." Gastroenterol Clin North Am **28**(1): 59-74, vi.
- Pagni, M., V. Ioannidis, L. Cerutti, M. Zahn-Zabal, C. V. Jongeneel and L. Falquet (2004). "MyHits: a new interactive resource for protein annotation and domain identification." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W332-5.
- Painter, J. N., M. Savander, A. Ropponen, N. Nupponen, S. Riikonen, O. Ylikorkala, A. E. Lehesjoki and K. Aittomaki (2005). "Sequence variation in the ATP8B1 gene and intrahepatic cholestasis of pregnancy." Eur J Hum Genet **13**(4): 435-9.
- Patel, P., N. Weerasekera, M. Hitchins, C. A. Boyd, D. G. Johnston and C. Williamson (2003). "Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta." Placenta **24**(1): 39-44.
- Paumgartner, G. and U. Beuers (2002). "Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited." Hepatology **36**(3): 525-31.
- Pedersen, P. L. (2005). "Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview." J Bioenerg Biomembr **37**(6): 349-57.
- Pedersen, P. L. (2007). "Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease." J Bioenerg Biomembr **39**(5-6): 349-55.
- Perez, A., A. C. Issler, C. U. Cotton, T. J. Kelley, A. S. Verkman and P. B. Davis (2007). "CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(2): L383-95.
- Peters, K. W., J. Qi, J. P. Johnson, S. C. Watkins and R. A. Frizzell (2001). "Role of snare proteins in CFTR and ENaC trafficking." Pflugers Arch **443** Suppl 1: S65-9.
- Pier, G. B., M. Grout, T. S. Zaidi, J. C. Olsen, L. G. Johnson, J. R. Yankaskas and J. B. Goldberg (1996). "Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections." Science **271**(5245): 64-7.
- Poupon, R., O. Chazouilleres and R. E. Poupon (2000). "Chronic cholestatic diseases." J Hepatol **32**(1 Suppl): 129-40.
- Puntervoll, P., R. Linding, C. Gemund, S. Chabanis-Davidson, M. Mattingsdal, S. Cameron, D. M. Martin, G. Ausiello, B. Brannetti, A. Costantini, F. Ferre, V. Maselli, A. Via, G. Cesareni, F. Diella, G. Superti-Furga, L. Wyrwicz, C. Ramu, C. McGuigan, R. Gudavalli, I. Letunic, P. Bork, L. Rychlewski, B. Kuster, M. Helmer-Citterich, W. N. Hunter, R. Aasland and T. J. Gibson (2003). "ELM server: A new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins." Nucleic Acids Res **31**(13): 3625-30.
- Quinton, P. M. (1999). "Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S3-S22.

- Randell, S. H. and R. C. Boucher (2006). "Effective mucus clearance is essential for respiratory health." Am J Respir Cell Mol Biol **35**(1): 20-8.
- Ratjen, F. and G. Doring (2003). "Cystic fibrosis." Lancet **361**(9358): 681-9.
- Rebhandl, W., F. X. Felberbauer, W. D. Huber, S. Puig, K. Paya, U. Rauhofer, S. Saadi, J. Aberle and E. Horcher (2000). "[Progressive familial intrahepatic cholestasis (Byler disease): current genetics and therapy]." Klin Padiatr **212**(2): 64-70.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou and et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science **245**(4922): 1066-73.
- Robert, R., C. Norez and F. Becq (2005). "Disruption of CFTR chloride channel alters mechanical properties and cAMP-dependent Cl⁻ transport of mouse aortic smooth muscle cells." J Physiol **568**(Pt 2): 483-95.
- Romey, M. C. (2006). "[Functional characterization of naturally occurring CFTR mutants: interest for cystic fibrosis]." Ann Biol Clin (Paris) **64**(5): 429-37.
- Schwede, T., J. Kopp, N. Guex and M. C. Peitsch (2003). "SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server." Nucleic Acids Res **31**(13): 3381-5.
- Schwiebert, E. M., M. M. Morales, S. Devidas, M. E. Egan and W. B. Guggino (1998). "Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2674-9.
- Seigneuret, M. and P. F. Devaux (1984). "ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(12): 3751-5.
- Shen, B. Q., R. A. Barthelson, W. Skach, D. C. Gruenert, E. Sigal, R. J. Mrsny and J. H. Widdicombe (1993). "Mechanism of inhibition of cAMP-dependent epithelial chloride secretion by phorbol esters." J Biol Chem **268**(25): 19070-5.
- Sheppard, D. N. and M. J. Welsh (1999). "Structure and function of the CFTR chloride channel." Physiol Rev **79**(1 Suppl): S23-45.
- Shneider, B. L. (1999). "Genetic cholestasis syndromes." J Pediatr Gastroenterol Nutr **28**(2): 124-31.
- Smith, J. J., P. H. Karp and M. J. Welsh (1994). "Defective fluid transport by cystic fibrosis airway epithelia." J Clin Invest **93**(3): 1307-11.
- Smith, J. J., S. M. Travis, E. P. Greenberg and M. J. Welsh (1996). "Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid." Cell **85**(2): 229-36.
- Snel, B., G. Lehmann, P. Bork and M. A. Huynen (2000). "STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene." Nucleic Acids Res **28**(18): 3442-4.

- Stieger, B. (2001). "FIC1: another bile salt carrier within the enterohepatic circulation?" J Hepatol **35**(4): 522-4.
- Stoffel, K. H. W. (1993). "TMbase - A database of membrane spanning proteins segments." Biol. Chem. Hoppe-Seyler **374**(166).
- Strautnieks, S. S., L. N. Bull, A. S. Knisely, S. A. Kocoshis, N. Dahl, H. Arnell, E. Sokal, K. Dahan, S. Childs, V. Ling, M. S. Tanner, A. F. Kagalwalla, A. Nemeth, J. Pawlowska, A. Baker, G. Mieli-Vergani, N. B. Freimer, R. M. Gardiner and R. J. Thompson (1998). "A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis." Nat Genet **20**(3): 233-8.
- Strautnieks, S. S., A. F. Kagalwalla, M. S. Tanner, A. S. Knisely, L. Bull, N. Freimer, S. A. Kocoshis, R. M. Gardiner and R. J. Thompson (1997). "Identification of a locus for progressive familial intrahepatic cholestasis PFIC2 on chromosome 2q24." Am J Hum Genet **61**(3): 630-3.
- Suchy, F. J. and M. Ananthanarayanan (2006). "Bile salt excretory pump: biology and pathobiology." J Pediatr Gastroenterol Nutr **43 Suppl 1**: S10-6.
- Tabcharani, J. A., P. Linsdell and J. W. Hanrahan (1997). "Halide permeation in wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels." J Gen Physiol **110**(4): 341-54.
- Tang, X., M. S. Halleck, R. A. Schlegel and P. Williamson (1996). "A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity." Science **272**(5267): 1495-7.
- Tatusov, R. L., N. D. Fedorova, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, B. Kiryutin, E. V. Koonin, D. M. Krylov, R. Mazumder, S. L. Mekhedov, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, S. Smirnov, A. V. Sverdlov, S. Vasudevan, Y. I. Wolf, J. J. Yin and D. A. Natale (2003). "The COG database: an updated version includes eukaryotes." BMC Bioinformatics **4**: 41.
- Taylor, K. A. K., AS; Bull, L (2003). "Progressive Familial intrahepatic Cholestasis 1 and 2." Gene Reviews Online.
- Thompson, R. and S. Strautnieks (2001). "BSEP: function and role in progressive familial intrahepatic cholestasis." Semin Liver Dis **21**(4): 545-50.
- Trauner, M., P. J. Meier and J. L. Boyer (1998). "Molecular pathogenesis of cholestasis." N Engl J Med **339**(17): 1217-27.
- Turcios, N. L. (2005). "Cystic fibrosis: an overview." J Clin Gastroenterol **39**(4): 307-17.
- Ujhazy, P., D. Ortiz, S. Misra, S. Li, J. Moseley, H. Jones and I. M. Arias (2001). "Familial intrahepatic cholestasis 1: studies of localization and function." Hepatology **34**(4 Pt 1): 768-75.
- van Mil, S. W., L. W. Klomp, L. N. Bull and R. H. Houwen (2001). "FIC1 disease: a spectrum of intrahepatic cholestatic disorders." Semin Liver Dis **21**(4): 535-44.

- van Mil, S. W., W. L. van der Woerd, G. van der Brugge, E. Sturm, P. L. Jansen, L. N. Bull, I. E. van den Berg, R. Berger, R. H. Houwen and L. W. Klomp (2004). "Benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 is caused by mutations in ABCB11." Gastroenterology **127**(2): 379-84.
- van Mil, S. W., M. M. van Oort, I. E. van den Berg, R. Berger, R. H. Houwen and L. W. Klomp (2004). "Fic1 is expressed at apical membranes of different epithelial cells in the digestive tract and is induced in the small intestine during postnatal development of mice." Pediatr Res **56**(6): 981-7.
- Vankeerberghen, A., H. Cuppens and J. J. Cassiman (2002). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions." J Cyst Fibros **1**(1): 13-29.
- von Mering, C., M. Huynen, D. Jaeggi, S. Schmidt, P. Bork and B. Snel (2003). "STRING: a database of predicted functional associations between proteins." Nucleic Acids Res **31**(1): 258-61.
- von Mering, C., L. J. Jensen, M. Kuhn, S. Chaffron, T. Doerks, B. Kruger, B. Snel and P. Bork (2007). "STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions." Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D358-62.
- von Mering, C., L. J. Jensen, B. Snel, S. D. Hooper, M. Krupp, M. Foglierini, N. Jouffre, M. A. Huynen and P. Bork (2005). "STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms." Nucleic Acids Res **33**(Database issue): D433-7.
- Wang, S., H. Yue, R. B. Derin, W. B. Guggino and M. Li (2000). "Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity." Cell **103**(1): 169-79.
- Wang, X. F., M. M. Reddy and P. M. Quinton (2004). "Effects of a new cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibitor on Cl⁻ conductance in human sweat ducts." Exp Physiol **89**(4): 417-25.
- Wei, L., A. Vankeerberghen, H. Cuppens, J. J. Cassiman, G. Droogmans and B. Nilius (2001). "The C-terminal part of the R-domain, but not the PDZ binding motif, of CFTR is involved in interaction with Ca(2+)-activated Cl⁻ channels." Pflugers Arch **442**(2): 280-5.
- Welsh, M. J. (1987). "Electrolyte transport by airway epithelia." Physiol Rev **67**(4): 1143-84.
- Whittington, P. F., D. K. Freese, E. M. Alonso, S. J. Schwarzenberg and H. L. Sharp (1994). "Clinical and biochemical findings in progressive familial intrahepatic cholestasis." J Pediatr Gastroenterol Nutr **18**(2): 134-41.
- Wilschanski, M., J. Rivlin, S. Cohen, A. Augarten, H. Blau, M. Aviram, L. Bentur, C. Springer, Y. Vila, D. Branski, B. Kerem and E. Kerem (1999). "Clinical and genetic risk factors for cystic fibrosis-related liver disease." Pediatrics **103**(1): 52-7.
- Zollner, G. and M. Trauner (2006). "Molecular mechanisms of cholestasis." Wien Med Wochenschr **156**(13-14): 380-5.

Cette thèse a donné lieu :

A publications :

- JA Sergent, C Hulen, C Dunois-Lardé, Y Berthiaume and N-E Lomri

ATP8B1, a P type ATPase involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 1: in silico approach (Soumis BMC Bioinformatics)

- JA Sergent, C Hulen, C Housset, Y Berthiaume and N-E Lomri

Evidence of ATP8B1 role in CFTR activity (en cours de rédaction)

A communications orales:

Analyse in silico d'ATP8B1

J-A Sergent

Conférencier invité : IUT d'Évreux 2008

Evreux France

ATP8B1 : a P-Type ATPase as a CFTR modifier gene ?

J-A Sergent, C Lardé, C Housset, C Hulen, Y Berthiaume, N-E Lomri

1st European CF Young Investigator Meeting 2007

Lille France

A communications écrites :

An interactomic study toward a general function of ATP8B1

J-A Sergent, Y Berthiaume, C Hulen and N-E Lomri

9ème Journées Ouvertes Biologie, Informatique et Mathématiques 2008

Lille France

ATP8B1, une ATPase de Type P : Un candidat modulateur dans l'expression de la fibrose kystique ?

J-A Sergent, C Lardé, C Housset, C Hulen, N-E Lomri et Y Berthiaume

Club de Recherche Clinique du Québec 2007

Mont Tremblant, Québec Canada

ATP8B1 : a P-Type ATPase as a CFTR modifier gene ?

J-A Sergent, C Lardé, C Housset, C Hulen, Y Berthiaume, N-E Lomri

1st European CF Young Investigator Meeting 2007

Lille France

Structure and function of ATP8B1, a P type ATPase involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 1.

J-A Sergent, C Dunois-Lardé, C Housset, C Hulen, Y Berthiaume and N Lomri

8ème Journées Ouvertes Biologie, Informatique et Mathématiques 2007

Euromed-Marseille, Marseille France

Curriculum Vitae

FORMATION :

- ❖ 2005-2008 : **Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé** :
Co-Dir. : Pr Nour-Eddine Lomri – **Université de Cergy-Pontoise**
Cotutelle de thèse avec : Ph D Sciences Biomédicales
Co-Dir. : Pr Yves Berthiaume – **Univ de Montréal**
- ❖ 2003-2004 : **DEA d'éthique médicale et biologique** : Thérapie Génique et Décisions d'arrêt
Mention Très Bien et Major de Promotion - Dir: Christian Hervé et Josué Feingold
à la Faculté de Médecine Necker-Université René Descartes-Paris5
- ❖ 2002-2003 : **Maîtrise de Biochimie Cellulaire et Biologie Moléculaire**
à **Concordia University**, Montréal Canada (Echange CREPUQ avec l'UCP)
- ❖ 2001-2002 : **Licence de Biochimie Option Modélisation appliquée à la Biologie (UCP)**
- ❖ 1999-2001 : **DEUG SV option Biochimie-Chimie et Biologie des Populations**
à l'**Université de Cergy-Pontoise (UCP)** Pôle St Martin, France
- ❖ 1999 : **Baccalauréat Scientifique Européen** Mention Assez Bien Spé. Physique-Chimie

BOURSES :

- ❖ 2006-2008 : Bourse de cotutelle du Consulat de France au Québec
- ❖ 2004 : Bourse de l'IIREB pour 2 mois : Analyse des premières observations à Montréal
sur les demandes de consentement
- ❖ 2003-2004 : Bourse de DEA (sur critères universitaires) pour l'année 2003-2004
de l'Université René Descartes-Paris5
- ❖ 2003 : Bourse de l'Institut International de Recherche en Ethique Biomédicale (IIREB)
de 2 mois : Méthodologie de la recherche en éthique pour les biologistes

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE :

- ❖ 2005-2008 : Stage de Doctorat : Groupe de Recherche sur les Physiopathologies Cellulaires
Univ. de Cergy Pontoise, INSERM U680 et Hôpital Hôtel Dieu de Montréal
Thème : Caractérisation fonctionnelle du gène FIC1 responsable de la cholestase
familiale intra-hépatique progressive de type 1
- ❖ 2003-2007 : Assistant de Recherche à temps partiel de la **Faculté de Médecine**
de l'**Université de Montréal**, Canada – Dir. : Danielle Laudy
04-07 : Etude France-Québec sur le suivi éthique des protocoles de recherche
03-04 : Etude France-Québec sur la demande de consentement (soins et recherche)
- ❖ 2003-2004 : Assistant de recherche du Pr. Christian Hervé, Laboratoire d'Ethique Médicale
- ❖ 2003 : Stage de 4 mois : Thérapie génique et ressenti des professionnels
à l'**Université de Montréal**-Prog. de Bioéthique, Canada-Dir. : Hubert Doucet
- ❖ 2001 : Stage de 2 mois au laboratoire de recherche biomédicale de Dale Leitman
à l'**University of California à San Francisco (UCSF)**, Etats-Unis

ENSEIGNEMENTS :

- ❖ 2004-2007 : Vacataire du département de Biologie –Université de Cergy-Pontoise
- ❖ 2007-2008 : Assistant Temporaire d’enseignement et de Recherche au Dépt de Biologie-UCP
- ❖ 2006-2008 : Vacataire et Membre fondateur du Mastère Spécialisé en Bioinformatique - EISTI

PUBLICATIONS :

- ❖ How should the stopping of a clinical research protocol for somatic gene therapy be regulated? The views of European clinicians and researchers.

Sergent J-A., Moutel G., Feingold J., Hervé C. (*CREUM*, Eté 2007)

ARTICLES NUMERIQUES AVEC COMITE DE LECTURE:

Une logique de principe de précaution poussée à l'extrême ou une régulation ouverte et scientifique en thérapie génique ?

Sergent J-A., Réseau Rodin-INSERM, 2004

La thérapie génique : généralités, moratoire et régulation

Sergent J-A., Réseau Rodin-INSERM, 2004

Thérapie génique: historique et législation

Sergent J-A., Réseau Rodin-INSERM, 2004

Le principe de responsabilité et la thérapie génique : confrontation entre les pratiques et les points de vue philosophiques

Sergent J-A., Réseau Rodin-INSERM, 2004

Dossier d'actualité sur les 25 recommandations concernant les tests génétiques

Sergent J-A., Réseau Rodin-INSERM, 2004

CHAPITRE DE LIVRE:

Sergent J-A., Moutel G., Feingold J., de Milleville H., Racine E., Doucet H., Hervé C.

European analysis of the various procedures existing to interrupt a clinical research protocol thanks to a French example of gene therapy in *Gene therapy - prospective technology assessment in its societal context* .(P223-228) J. Niewohner and C. Tannert Eds. Elsevier 2006 (ISBN : 0444528067)

POSTERS DE RECHERCHE:

2008 :

Screening of plant extracts for antimicrobial and anticancer activities

S Laouirem, H Mathouet, J-A Sergent, G Ngouala, A Lomri, P Lameiras, C Hulen, N Lomri and A Elomri

7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF

Athènes, Grèce

Convergence of computer sciences text mining techniques and genomic processing
J-A Sergent et V. Fremaux

9ème Journées Ouvertes Biologie, Informatique et Mathématiques

Lille France

BIOEclipse, a new environment for biologists

C. Richard, Y. Arnulf, R. Menegon, F. Miccoli, A. Aissat, J-P Forest, V Fremaux and **J-A Sergent**

8ème Journées Ouvertes Biologie, Informatique et Mathématiques

Lille France

An interactomic study toward a general function of ATP8B1

J-A Sergent, Y Berthiaume, C Hulen and N-E Lomri

8ème Journées Ouvertes Biologie, Informatique et Mathématiques

Lille France

2007 :

ATP8B1, une ATPase de Type P : Un candidat modulateur dans l'expression de la fibrose kystique ?

J-A Sergent, C Lardé, C Housset, C Hulen, N-E Lomri et Y Berthiaume

Club de Recherche Clinique du Québec

Mont Tremblant, Québec Canada

ATP8B1 : a P-Type ATPase as a CFTR modifier gene ?

J-A Sergent, C Lardé, C Housset, C Hulen, Y Berthiaume, N-E Lomri

1st European CF Young Investigator Meeting

Lille France

Structure and function of ATP8B1, a P type ATPase involved in progressive familial intrahepatic cholestasis type 1.

J-A Sergent, C Dunois-Lardé, C Housset, C Hulen, Y Berthiaume and N Lomri

8ème Journées Ouvertes Biologie, Informatique et Mathématiques

Euromed-Marseille, Marseille France

2006 :

Historique du cas Vioxx : Perspectives Ethiques

Aissat A. , Bardou O., Cargnello M., Berdougou B. et **Sergent J-A.**

Congrès Annuel de la Société Française et Francophone d'Ethique Médicale

Université Paris 5, Rue de l'École de Médecine, Paris, France

2005 :

Thérapie Génique et décision d'interruption de protocole de recherche : L'avis des chercheurs européens

Sergent J-A., Moutel G., Feingold J., de Milleville H., Racine E., Doucet H. , Hervé C.

Congrès Annuel de la Société Française et Francophone d'Ethique Médicale

Université Paris 5, Rue de l'École de Médecine, Paris, France

PRESENTATIONS ORALES:

2008 :

Analyse in silico d'ATP8B1

J-A Sergent

Conférencier invité : IUT d'Évreux Mai 2008

Evreux France

2007 :

ATP8B1 : a P-Type ATPase as a CFTR modifier gene ?

J-A Sergent, C Lardé, C Housset, C Hulen, Y Berthiaume, N-E Lomri

1st European CF Young Investigator Meeting

Lille France

2006 :

Développement de nouvelles approches pour l'information des patients

J-A Sergent, D. Laudy

Congrès Annuel du CNERH

Ottawa, Canada

2005 :

Biomedical Research in the Third World: Ethical Perspectives from Third World People

Laudy D., **Sergent J-A.**, Kedote M.

XXIXth International Congress on Law and Mental Health

Université René Descartes, 45 Rue des Saints Pères Paris, France

Protecting the Mentally Incompetent in Research: The Quebec Law and Experience

Sergent J-A., Laudy D.

XXIXth International Congress on Law and Mental Health

Université René Descartes, 45 Rue des Saints Pères Paris, France

Dignité et détresse en contexte d'urgences

Sergent J-A., Berdougo B., Laudy D.

1st International Interdisciplinary Conference on Emergencies

Palais des Congrès de Montréal, Montréal, (QC) Canada

Somatic Gene Therapy and decision to interrupt a clinical research protocol

Sergent J-A.

« Gene Therapy : Quo Vadis ? »

Max-Delbrueck-Center for Molecular Medicine, Berlin, Allemagne