

# Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC)

Michaël Mourez  
Muguette Jéhanno  
Maurice Hofnung  
Elie Dassa

La famille des transporteurs à *ATP binding cassette* (ABC) est l'une des familles de protéines les plus importantes, tant par sa taille que par l'implication dans diverses maladies des membres qui la composent. Ces transporteurs ont été découverts et étudiés dans les bactéries dès les années 1950 mais ce n'est qu'en 1990 que leur présence a été établie dans tout le règne vivant. Ces molécules présentent une remarquable conservation dans leur séquence et dans leur organisation structurale, caractérisée par une structure en quatre domaines : deux domaines hydrophobes, formant le site de reconnaissance du substrat, et deux domaines hydrophiles conservés, impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP, source d'énergie du transport. Aujourd'hui, avec l'apport massif de données fournies par le séquençage de génomes entiers, on saisit mieux encore l'importance de cette famille dont la taille ne cesse de grandir. Cependant, probablement à cause de leur complexité, la structure et le fonctionnement de ces transporteurs restent encore très peu connus.

**L**es systèmes de transport à *ATP binding cassette* (ABC) constituent une famille extrêmement vaste de protéines, que l'on retrouve dans tout le règne vivant [1]. Ces transporteurs utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour l'import ou l'export unidirectionnels d'une variété considérable de substrats, des ions aux macromolécules. Ils sont organisés en quatre domaines (*figure 1*): deux domaines transmembranaires (DTM ou TMD pour *transmembrane domains*) et deux domaines cytoplasmiques qui lient les nucléotides (DLN ou NBD pour *nucleotide binding domains*). Les DLN partagent trois motifs caracté-

sant la « cassette » de fixation de l'ATP: les motifs de Walker A et B [2] communs à toutes les protéines fixant des nucléosides triphosphates, et un motif LSGGQ, qui constitue la « signature » spécifique des transporteurs ABC. Ces transporteurs peuvent être constitués d'une, deux, trois ou quatre chaînes polypeptidiques. Les eucaryotes ne possèdent que des systèmes d'export, alors que les procaryotes possèdent à la fois des systèmes d'export et d'import [3]. Ces derniers forment la sous-famille des transporteurs dépendants d'une protéine affine, et nécessitent la présence d'une protéine soluble extracytoplasmique dont la fonction est de

## ADRESSES

M. Mourez, M. Jéhanno, M. Hofnung, E. Dassa: Unité de programmation moléculaire et toxicologie génétique, Cnrs URA 1444, Département des biotechnologies, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

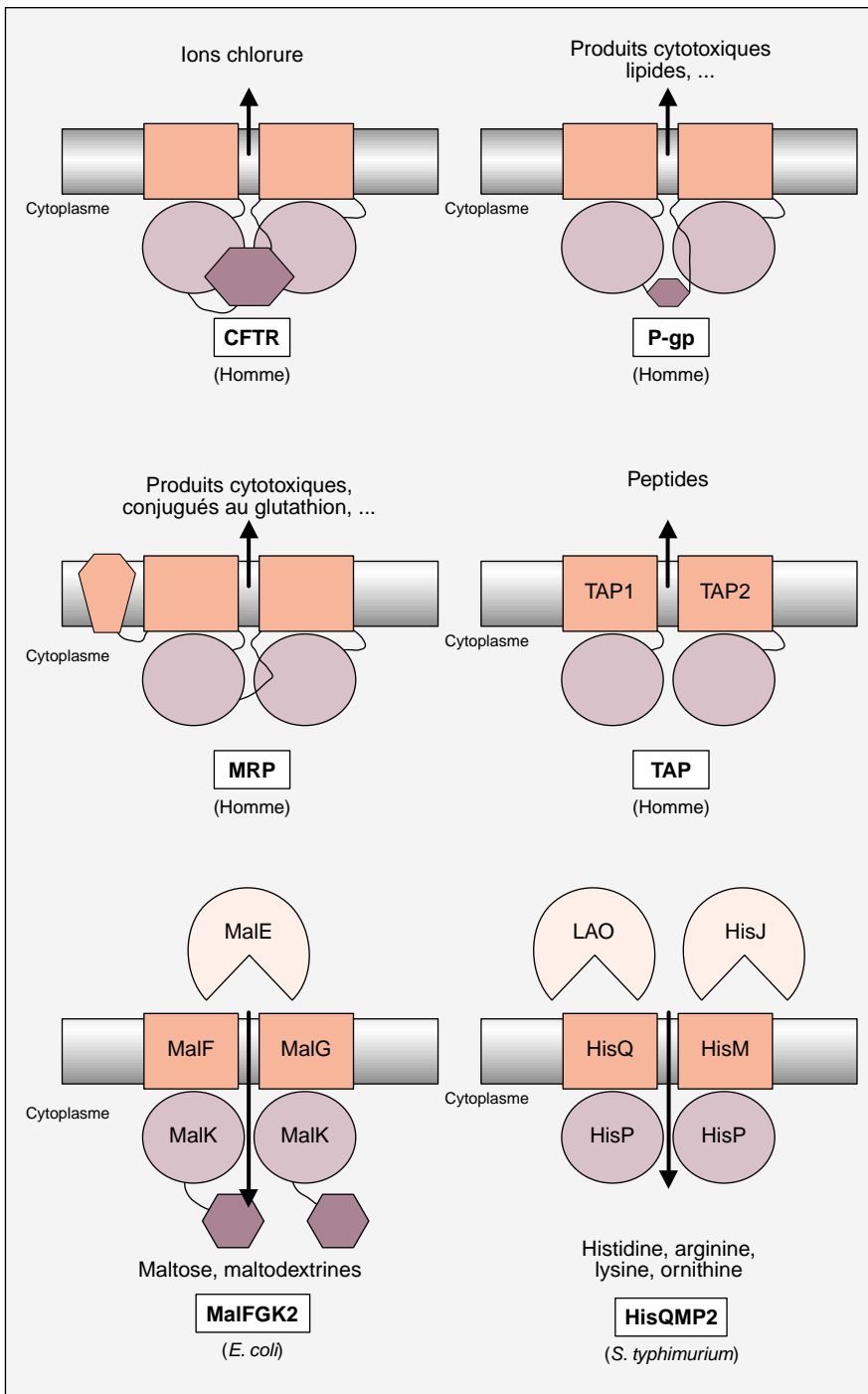


Figure 1. **Organisation schématique des transporteurs ABC.** Ce schéma illustre la conservation de l'organisation des transporteurs ABC. La membrane est représentée par un rectangle horizontal, le cytoplasme étant représenté sous la membrane. Les carrés représentent les domaines transmembranaires, les cercles les domaines liant les nucléotides et les losanges les domaines impliqués dans des phénomènes de régulation. Chaque transporteur est identifié par son nom (encadré), et par l'organisme dans lequel il est communément trouvé. Le sens du transport est indiqué par des flèches. Les substrats sont indiqués à l'extrémité de la pointe de ces flèches. Les transporteurs MalFGK2 et HisQMP2 possèdent des protéines périplasmiques essentielles au transport, MalE et HisJ-LAO, respectivement.

fixer le substrat avec une grande affinité et de le présenter au complexe ABC. Les systèmes ABC peuvent être classés en 38 familles phylogénétiques [3] dont certaines sont représentées dans le *Tableau I*.

### Rôle des transporteurs ABC dans les maladies

Les transporteurs ABC sont importants par leur nombre et du fait de leur implication dans des manifestations pathologiques, soit parce qu'ils sont inactivés par une mutation qui provoque une maladie génétique, soit au contraire parce qu'ils sont suractivés, l'exacerbation de leur fonction provoquant alors la maladie. Nous décrirons ici ces transporteurs en respectant cette distinction, en les regroupant par famille phylogénétique et en explicitant les notations abrégées de leurs noms (*Tableau I*). De plus, de nombreux organismes pathogènes utilisent des transporteurs ABC pour exporter des facteurs de virulence ou pour résister aux antibiotiques.

#### Inactivation d'un transporteur ABC : les maladies génétiques

##### • Mucoviscidose (CFTR)

La mucoviscidose est une anomalie génétique récessive affectant approximativement 1 enfant sur 2500 aux États-Unis au sein des populations originaires d'Europe du Nord. Cette maladie se traduit par une obstruction pulmonaire chronique due à une absence de fluidité du mucus sécrété par l'épithélium bronchique. Il en résulte une colonisation bactérienne accrue des voies aériennes qui entraîne une insuffisance respiratoire puis la mort. La maladie provoque également une insuffisance pancréatique, intestinale, une production de sueur anormalement salée, et une stérilité chez les hommes. Toutes ces anomalies sont en partie liées à un défaut de conduction d'eau et de sel au travers des épithéliums, notamment d'ions chlorure. Le gène CFTR responsable de la maladie a été identifié en 1989 [4]. Soixante-dix pour cent des mutations trouvées chez les patients correspondent à la délétion d'une phénylalanine en position 508 de la protéine CFTR [4bis]. Cette mutation empêche la protéine

Tableau I  
TRANSPORTEURS ABC IMPLIQUÉS DANS DES PROBLÈMES DE SANTÉ HUMAINE

Transporteur ABC*	Famille phylogénétique**	Maladie associée
<i>Transporteurs dont l'inactivation cause une maladie génétique</i>		
CFTR***	18	Mucoviscidose
SUR	18	Hyperinsulinisme familial
cMOAT (MRP2)	18	Syndrome de Dubin-Johnson
ALD	4	Adrénoleucodystrophie
PMP70	4	Syndrome de Zellweger
ABCR	11	Maladie de Stargardt/Dégénérescence maculaire liée à l'âge
ABC1	11	Maladie de Tangier
MDR3	12	Cholestase familiale de type 3
TAP	12	Immunodéficiences
SPGP	12	Cholestase familiale de type 2
<i>Transporteurs dont la surexpression provoque résistance ou virulence</i>		
MRP	18	Résistance de cellules cancéreuses aux drogues cytotoxiques
MDR1 (P-gp)	12	Résistance de cellules cancéreuses aux drogues cytotoxiques
Pfmdr	12	Résistance de parasites aux drogues antiparasitaires
HlyB	12	Virulence de bactéries pathogènes
CDR1	21	Résistance de levures aux drogues antifongiques
OleB, MsrA	28	Résistance de bactéries aux antibiotiques

\* Les transporteurs sont désignés par leur nom le plus courant. Une liste exhaustive de synonymes ainsi qu'une nomenclature homogène des transporteurs ABC humains peut être consultée sur les sites « <http://www.gene.ucl.ac.uk/users/hester/abc.html> » et « <http://medmail.med.rug.nl/mdl/humanabc.htm> ».

\*\* Cette classification repose sur nos travaux [3].

\*\*\* Les abréviations des transporteurs ABC sont les suivantes. CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; SUR: sulfonyleurea receptor; cMOAT: canalicular multispecific organic anion transporter; MRP: multidrug resistance-associated protein; ALD: adréno-leucodystrophie protein; ALD-R: adréno-leucodystrophie-related protein; PMP70: 70-kDa peroxisomal membrane protein; ABCR: ABC retina; TAP: transporter associated with antigen presentation; BSEP: bile salt export protein; MDR: multidrug resistance; P-gp: P-glycoprotein; Pfmdr: Plasmodium falciparum multidrug resistance.

d'accéder à la surface des cellules épithéliales, ce qui provoque les défauts de conductance observés. La protéine CFTR représente elle-même un canal pour les ions chlorure, mais son rôle dans la maladie est plus complexe que ne le suggère sa fonction, car CFTR possède de nombreuses activités régulatrices encore mal connues.

#### • **Hyperinsulinisme familial (SUR)**

L'hypoglycémie hyperinsulinique persistante infantile (1 enfant sur 40 000) est due à un défaut de l'activité de canaux à ions potassium dépendants de l'ATP dans les cellules  $\beta$  du pancréas. Ces canaux régulent la sécrétion d'insuline qui est permanente dans cette maladie, conduisant à une hypoglycémie profonde qui entraîne convulsions, coma, et en l'absence de traitement, la mort ou des séquelles neurologiques graves. Dans certains cas, les patients ont des mutations portant sur les deux allèles du gène SUR codant pour le récepteur à la sulfony-

lurée [5], une protéine semblable à CFTR qui s'associe aux canaux à ions potassium et qui règle leur activité [6].

#### • **Syndrome de Dubin-Johnson (cMOAT)**

Le syndrome de Dubin-Johnson est une maladie autosomique récessive (1 personne sur 1300) caractérisée par une hyperbilirubinémie associée au dépôt de pigment dans les cellules hépatiques. L'hyperbilirubinémie est due à un défaut d'excrétion de divers anions organiques parmi lesquels la bilirubine, tandis que la sécrétion de sels biliaires est normale. Chez les patients, le gène codant pour l'un des transporteurs ABC, appelé cMOAT ou MRP2, et localisé dans la membrane canaliculaire des hépatocytes, porte une mutation [7]. cMOAT appartient à la même famille phylogénétique que CFTR et SUR et il permet aux hépatocytes de sécréter et d'éliminer dans la bile ces anions toxiques qui sont conjugués au glutathion, au glucuronide ou à des dérivés du sulfate. Les rats chez lesquels

ce gène est inactivé présentent également une hyperbilirubinémie.

#### • **Adrénoleucodystrophie (ALD)**

L'adrénoleucodystrophie est une maladie génétique neurodégénérative liée au chromosome X et associée à un défaut de peroxydation des acides gras à très longue chaîne. La maladie affecte des adultes ou des enfants avec une fréquence de 1/20 000. Le gène impliqué dans cette maladie code pour un demi-transporteur ABC appelé ALD [8]. Cliniquement, la gravité des phénotypes est diverse et non corrélée avec les génotypes, ce qui suggère que la protéine ALD pourrait interagir avec un autre demi-transporteur peroxisomal (ALD-R, PMP70 ou PMP70-R). Il a été récemment montré que la surproduction d'ALD-R pouvait compenser la déficience en ALD [9].

#### • **Syndrome de Zellweger (PMP70)**

Le syndrome de Zellweger est une maladie génétique affectant la matu-

ration des peroxisomes. Dans cette maladie, on observe une absence totale d'activité des enzymes peroxisomales et les conséquences physiologiques sont variées au niveau du rein, du foie et du système nerveux central. Dans certains cas, des mutations dans le gène codant pour le demi-transporteur PMP70 ont été associées à ce syndrome [10].

- **Dégénérescences maculaires (ABCR)**

Les dégénérescences maculaires sont des altérations de la vision très répandues, parmi lesquelles la maladie de Stargardt est l'une des formes les plus communes (1 personne sur 10 000). Cette dernière se caractérise par une perte de la vision centrale et une dégénérescence de l'épithélium rétinien au niveau de la macula. Il s'agit d'une maladie génétique récessive liée à des mutations du gène ABCR, codant pour un transporteur ABC [11]. Des mutations de ce gène sont également responsables de la dégénérescence maculaire due au vieillissement.

- **Syndrome de Tangier (ABC1)**

Cette maladie autosomique récessive a été détectée parmi les habitants de l'île de Tangier. Elle se manifeste par une coloration orange des amygdales, un foie et une rate hypertrophiés et une réduction importante de la concentration du plasma en lipoprotéines de haute densité (HDL). Des travaux récents [12] montrent que la maladie est causée par des mutations dans le gène ABC1 [13], qui code pour un transporteur ABC phylogénétiquement relié à ABCR. Une forme plus commune de la maladie, appelée hypoalphalipoprotéïnémie familiale, est également due à des mutations de ce gène [14].

- **Anémie sidérolastique et ataxie liées au chromosome X (ABC7)**

Cette maladie récessive est caractérisée par une ataxie cerebelleuse non progressive accompagnée d'une légère anémie, d'une hypochromie et d'une microcytose. Très récemment, il a été montré que le gène responsable de cette maladie est le gène ABC7, un orthologue du gène ATM1 de levure qui code pour une protéine mitochondriale impliquée dans l'homéostasie du fer [15].

- **Déficits immunitaires (TAP)**

Les déficits affectant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (HLA) de classe I (syndrome des « lymphocytes nus » de type I) sont des déficits immunitaires sévères qui se manifestent par des infections des voies respiratoires et des insuffisances dont l'issue est généralement fatale chez les enfants. Des mutations dans les gènes codant pour les transporteurs TAP1 et TAP2 sont associées avec ces maladies [16, 17]. Le transporteur associé à la présentation de l'antigène TAP, constitué de deux demi-transporteurs TAP1 et TAP2 [18], permet le passage dans le réticulum endoplasmique de peptides endogènes qui sont ensuite présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.

- **Cholestases intra-hépatiques progressives familiales (BSEP et MDR3)**

Les cholestases intra-hépatiques familiales sont des maladies récessives infantiles qui se caractérisent par des jaunisses intermittentes, une cholestase sévère et une cirrhose dont l'issue est fatale au cours des dix premières années de vie. Ces maladies se manifestent sous plusieurs formes cliniques, dont deux sont déterminées par des mutations présentes sur des gènes codant pour des transporteurs ABC. La maladie de Byler ou cholestase familiale de type 1, qui se caractérise par une cholestérolémie et une activité  $\gamma$ -glutamyl transférase sérique normales, a été la première décrite dans une famille Amish. Elle est causée par la mutation du gène *FIC1*, une ATPase de type V. La cholestase familiale de type 2 présente les mêmes manifestations cliniques que la maladie de Byler mais elle est causée par des mutations dans le gène *PFIC2*, qui code pour le transporteur ABC BSEP [19]. Ce gène est l'orthologue du gène murin SPGP dont le produit, exprimé exclusivement dans les hépatocytes, est impliqué dans le transport des sels biliaires [20]. Les malades atteints de cholestase progressive intra-hépatique familiale de type 3 (PFIC-3) se distinguent par une activité gamma-glutamyl transférase sérique élevée. La famille MDR de transporteurs ABC est une famille multigénique de protéines homo-

logues dont certaines (MDR1) sont responsables de la résistance des cellules cancéreuses à de nombreuses drogues cytotoxiques (*voir plus loin*). D'autres (MDR3) n'interviennent pas dans la résistance aux drogues et seraient des transporteurs de phosphatidylcholine [21]. Les souris chez lesquelles le gène équivalent à *MDR3* a été inactivé présentent un défaut de sécrétion de lipides dans la bile, qui provoque des altérations physiologiques proches de celles de patients atteints de cholestase progressive intra-hépatique familiale de type 3 [22]. Deux patients atteints de cette maladie et portant des mutations sur les deux allèles de *MDR3* ont été récemment décrits [23].

- **Syndrome de Scott (protéines MDR)**

Le syndrome de Scott, un syndrome hémorragique lié à l'absence de migration transmembranaire d'un lipide procoagulant, la phosphatidylsérine, pourrait être causé par une mutation d'un gène contrôlant l'expression des protéines MDR [24].

### Activation d'un transporteur : la résistance et la virulence

- **Résistance des cellules cancéreuses**

La majorité des échecs thérapeutiques de chimiothérapie anticancéreuse est probablement due à la résistance aux molécules cytotoxiques utilisées dans les traitements anticancéreux. Cette résistance est en général due à l'amplification de la production du transporteur P-gp ou MDR1. MDR1 est capable d'exporter des molécules cytotoxiques et de conférer à la cellule une résistance à de très nombreux agents anticancéreux (doxorubicine, vinblastine, etoposide, taxol). En revanche, le vérapamil, la ciclosporine, la quinidine, la réserpine et les hormones stéroïdes se fixent sur la P-gp et annulent la résistance. Chez la souris, il existe deux gènes équivalents à *MDR1*, dont l'inactivation provoque une sensibilité plus élevée à certains produits toxiques [25].

MRP1 est un autre transporteur impliqué dans la résistance des cellules de cancer du poumon à de nombreuses molécules cytotoxiques [26]. Il est différent de la P-gp sur le plan structural et fonctionnel

puisqu'il possède un DTM additionnel en position amino-terminale. Il fonctionnerait en excréant les produits sous forme conjuguée au glutathion [27], et appartient à une famille multigénique dont six membres (y compris c-MOAT) sont décrits chez l'homme.

#### • **Résistance des agents infectieux**

La résistance des parasites aux médicaments antiparasitaires pose de graves problèmes de santé publique [28]. Ainsi, l'agent responsable du paludisme, *Plasmodium falciparum*, résiste aux dérivés de la quinine par l'activation du transporteur Pfmdr. La résistance des levures pathogènes opportunistes aux dérivés azoles, telles que *Candida albicans*, est souvent due à des transporteurs ABC [29]. Enfin, les bactéries pathogènes résistent à certains antibiotiques grâce à des transporteurs ABC, ceux-ci leur ayant probablement été transmis par les bactéries productrices d'antibiotiques, comme par exemple le déterminant MsrA de la résistance à l'érythromycine chez *Staphylococcus aureus*.

#### • **Virulence des bactéries pathogènes**

Des transporteurs ABC permettent l'export de facteurs de virulence de bactéries pathogènes, comme les hémolysines d'*Escherichia coli* ou de *Proteus vulgaris*, la leucotoxine de *Pasteurella haemolytica*, la cyclolysine de *Bordetella pertussis* ou des lipases et des protéases qui jouent un rôle dans la pathogénie [30]. Enfin, chez leurs hôtes, qui constituent un environnement où les nutriments sont rares et la colonisation difficile, les bactéries pathogènes dépendent souvent de systèmes ABC d'import à haute affinité, pour capturer des nutriments comme le fer [31], et d'export de constituants de leur enveloppe, comme les polysaccharides constituant la capsule, KpsMT [32].

## **Mécanisme fonctionnel des transporteurs ABC**

### **Reconnaissance des substrats**

Dans le cas de CFTR, des mutations ponctuelles affectant le transport des ions chlorure ont été mises en évidence dans les DTM [33]. En ce qui concerne P-gp, les mutations affectant

son profil de résistance vis-à-vis de certains produits sont situées dans les DTM [34]. L'utilisation de dérivés radioactifs et photoactivables de molécules exportées par P-gp a permis de préciser que les produits se fixent de façon équivalente sur des régions précises des deux DTM de P-gp. Chez la drosophile, l'assemblage deux à deux des trois demi-transporteurs ABC *white*, *scarlet* ou *brown*, forme des transporteurs ayant des spécificités différentes vis-à-vis des précurseurs des pigments oculaires [35]. Ces résultats montrent que les deux DTM participent à la définition des sites de reconnaissance du substrat. La P-gp possède en fait deux sites distincts de fixation des substrats intervenant à des étapes différentes du transport [36]. Les DLN ne semblent pas intervenir dans la reconnaissance des substrats et des DLN de systèmes différents peuvent être interchangeables.

### **Hydrolyse de l'ATP**

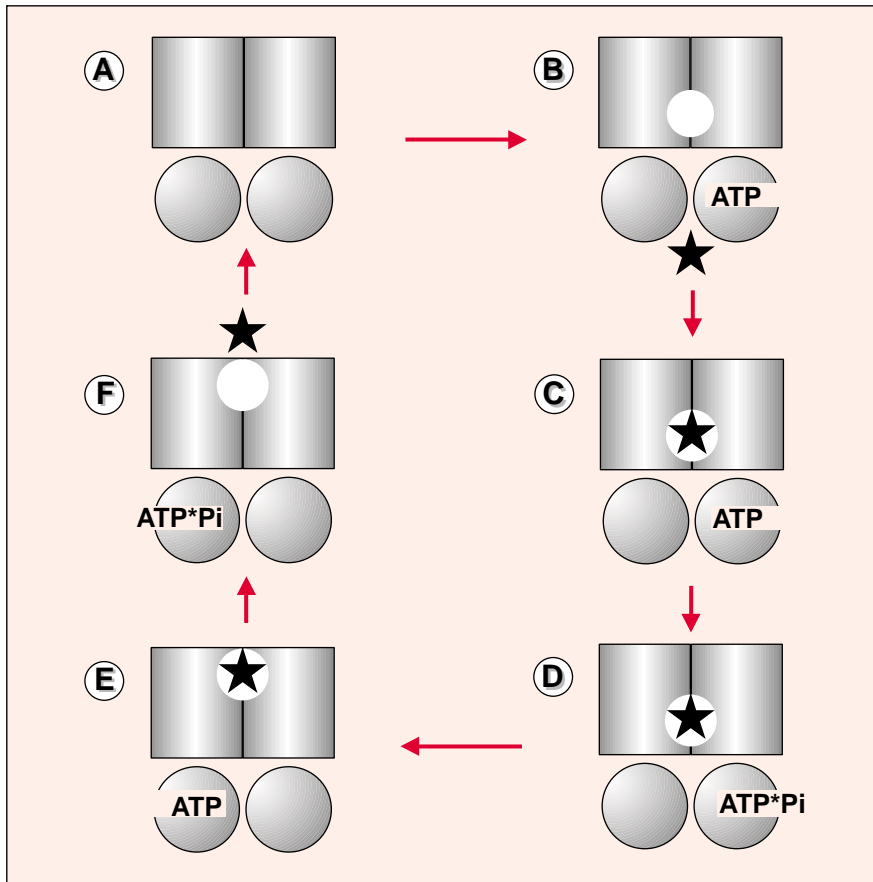
La preuve que l'hydrolyse de l'ATP était nécessaire et suffisante au transport a été apportée pour la première fois dans les systèmes bactériens d'import du maltose et de l'histidine en utilisant des vésicules membranaires [37, 38]. La purification à homogénéité des systèmes et leur reconstitution dans des liposomes ont ensuite parachevé la démonstration [39, 40]. Ces expériences ont été réalisées ultérieurement avec CFTR, P-gp, ou MRP. Ces études montrent que deux molécules d'ATP sont fixées par molécule de transporteur. L'hydrolyse de l'ATP est stimulée par le substrat et s'effectue alternativement par les deux DLN qui coopèrent sur le plan fonctionnel [41]. L'hydrolyse de l'ATP est coopérative dans le cas de CFTR et dans les systèmes de transport du maltose et de l'histidine. L'inhibition des DLN est également coopérative car l'inactivation d'un DLN affecte l'activité ATPasique de l'autre [42]. Seule l'hydrolyse de l'ATP permet le transport, mais la fixation de l'ATP joue probablement un rôle particulier. Ainsi la fixation sans hydrolyse de l'ATP à TAP est suffisante pour libérer les peptides fixés en absence d'ATP [43]. L'affinité et la spécificité des trans-

porteurs vis-à-vis des nucléotides sont faibles. Le GTP et le CTP peuvent servir de source d'énergie. Le transport est inhibé par des analogues non hydrolysables de nucléosides triphosphates qui entrent en compétition avec l'ATP, par le N-éthyl maléimide qui se fixe sur un résidu cystéine souvent trouvé dans le motif A de Walker et qui modifie la poche de liaison de l'ATP, et par le vanadate ou la bafilomycine qui agissent par des mécanismes inconnus. Dans de nombreux cas, les DLN de transporteurs ABC ont été isolés et purifiés. Les deux DLN sont capables de fixer et d'hydrolyser l'ATP avec une activité comparable à celle du transporteur intact. Cependant, à l'inverse de ce qui a été observé pour ce dernier, l'hydrolyse de l'ATP par le DLN isolé n'est pas affectée par les substrats et n'est pas coopérative. Enfin, les inhibiteurs compétitifs de l'activité ATPasique des DLN isolés sont les mêmes que pour les transporteurs entiers, à l'exception du vanadate et de la bafilomycine qui n'ont pas d'effet.

### **Interaction entre domaines**

Étant donné les différences existant entre l'activité ATPasique du transporteur entier et celle du DLN isolé, il est probable que les DTM interagissent indirectement avec la poche de liaison de l'ATP grâce à un mécanisme de couplage, et modifient ainsi les caractéristiques de l'activité ATPasique des DLN. Le contrôle par les DTM s'effectuerait en couplant leurs changements de conformation, modulés par la présence des substrats, avec la conformation des DLN. En effet, l'utilisation d'une sonde fluorescente greffée sur les DLN de P-gp montre que l'interaction avec des substrats modifie la conformation des DLN [44].

Inversement, des études montrent que la fixation des nucléotides par les DLN modifie le(s) site(s) d'interaction avec les substrats dans les DTM. Ainsi, pour TAP, il a été montré que les peptides transportés sont fixés par le transporteur en l'absence d'ATP, et que la liaison de l'ATP les libère [43]. De même, il a été montré qu'au cours de l'hydrolyse de l'ATP, P-gp est stabilisée par le vanadate dans un état de transition avec une



**Figure 2. Modèle de fonctionnement des transporteurs ABC.** Ce modèle postule l'existence de 3 conformations différentes pour les DLN (A sans nucléotide, B et C avant hydrolyse, D et F après hydrolyse) couplées à 4 conformations pour les DTM (A B, C et E avec un site de reconnaissance du substrat actif, D avec deux sites actifs, et A et F sans site actif). La fixation de l'ATP dans l'un des DLN rendrait actif l'un des sites de reconnaissance des substrats dans les DTM (B), la fixation de l'ATP à l'autre DLN l'inactiverait (E). Cette inactivation réversible d'un site correspondrait à la fermeture transitoire du canal que l'on observe avec CFTR. L'hydrolyse de l'ATP au premier DLN activerait le second site de reconnaissance (D) et l'hydrolyse de l'ATP à l'autre DLN l'inactiverait (F). Le schéma illustre le déroulement d'un cycle d'export tel que l'excrétion d'une drogue par la P-gp. Il s'applique aussi à l'import (MalFGK2) ou au fonctionnement du canal CFTR. Plus particulièrement, l'hydrolyse de l'ATP serait déclenchée par la présence de substrats pour P-gp et MalFGK2 et par la phosphorylation du domaine R pour CFTR. Dans le cas de MalFGK2, le cycle est parcouru en sens inverse.

affinité réduite pour les substrats [45].

Quelle est l'image globale qui résulte de ces caractéristiques? Plusieurs modèles de fonctionnement ont été proposés, qui concernent les systèmes d'import, la P-gp ou encore CFTR [46, 47]. Il est possible de synthétiser ces différents modèles (figure 2). Les DTM collaborent et forment deux sites distincts de reconnaissance pour les substrats (figure 2C

et E). Ces deux sites sont en étroite communication et leur occupation est probablement ordonnée. Par ailleurs, les DLN forment deux sites distincts de fixation et d'hydrolyse de l'ATP (figure 2D et F) qui sont également en étroite collaboration et l'hydrolyse à ces sites est probablement ordonnée. La fixation de l'ATP et son hydrolyse dans les DLN provoquent des changements de conformation aux sites de liaison des sub-

strats. Réciproquement, l'hydrolyse de l'ATP n'est possible que par un changement de conformation induit par la fixation d'un substrat.

## Structure des transporteurs ABC

### Structure des DLN

L'alignement des séquences des DLN [3, 48] permet de mettre en évidence des motifs dont les plus conservés sont les motifs de Walker et le motif signature LSGGQ (figure 3). D'autres régions présentent moins d'homologie mais contiennent néanmoins des résidus quasiment invariants. Entre les motifs Walker A et Walker B, une région baptisée Centre contient une glutamine et une arginine très conservées. A la suite du motif Walker B, se trouve une région Switch dans laquelle une histidine est conservée à 90%. A l'inverse, certaines régions ne présentent aucune similitude et pourrait ainsi définir des régions variables: la première se situe entre la région Centre et le motif Walker B, la seconde entre le motif Walker B et la région Switch.

La structure d'un DLN isolé en solution a récemment été résolue [49]. Il s'agit du DLN du système de transport de l'histidine de *S. typhimurium*, HisP (figure 4). Grâce à cette structure et à la caractérisation de nombreuses mutations dans les DLN de transporteurs ABC, il est désormais possible de proposer des fonctions pour les différentes régions conservées. Le DLN comprend deux domaines: une poche de fixation de l'ATP et un domaine d'interaction avec les DTM.

La poche de fixation de l'ATP possède une structure tout à fait unique: il s'agit d'une boîte constituée de deux feuilletts bêta situés en vis-à-vis, et dont l'un est coudé. Le feuillet non coudé contient un brin  $\beta 3$  qui précède la boucle portant le motif Walker A et un brin  $\beta 9$  qui porte le motif Walker B. Ces deux motifs permettent la fixation des résidus phosphates de l'ATP. Les feuilletts se rejoignent et ferment un côté de la poche de fixation de l'ATP. L'hélice  $\alpha 3$  ferme l'autre côté de la poche et l'hélice  $\alpha 1$  en forme le fond. La glutamine conservée de la région Centre se trouve à l'extrémité du brin  $\beta 8$ ,

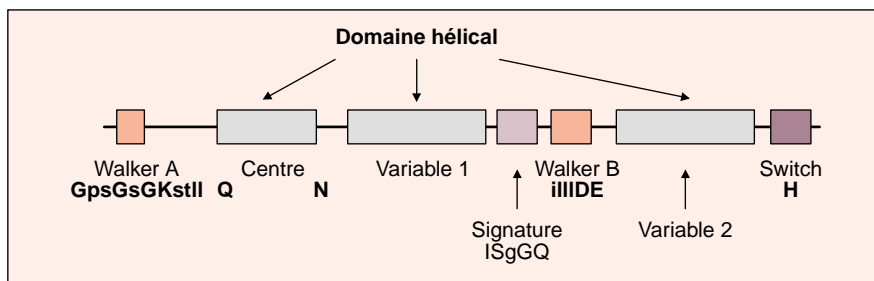


Figure 3. **Alignement des séquences protéiques de DLN de transporteurs ABC : régions et résidus conservés.** Cette figure schématise les résultats d'un alignement de séquences de DLN de transporteurs ABC effectué lors d'une prédiction de structure secondaire réalisée sur la séquence de MalK. Les régions remarquables des ATPases et dont le rôle est discuté dans le texte sont nommées et représentées par des rectangles bistre clair et bistre foncé. Le domaine hélical responsable de l'interaction avec les domaines transmembranaires est formé des régions Centre, Variable 1 et Variable 2 représentées par des rectangles gris. Les séquences consensus trouvées pour ces régions sont indiquées sous leur nom et représentées par le code à une lettre des acides aminés. Une lettre majuscule indique que le résidu est invariant tandis qu'une lettre minuscule indique que le résidu est conservé.

proche de la molécule d'ATP. Ce résidu pourrait donc avoir un rôle catalytique, probablement en collaboration avec le glutamate conservé

dans le motif B de Walker. Enfin, l'histidine conservée se trouve au sommet du brin  $\beta_{10}$ . Elle est située à distance de la molécule d'ATP et son

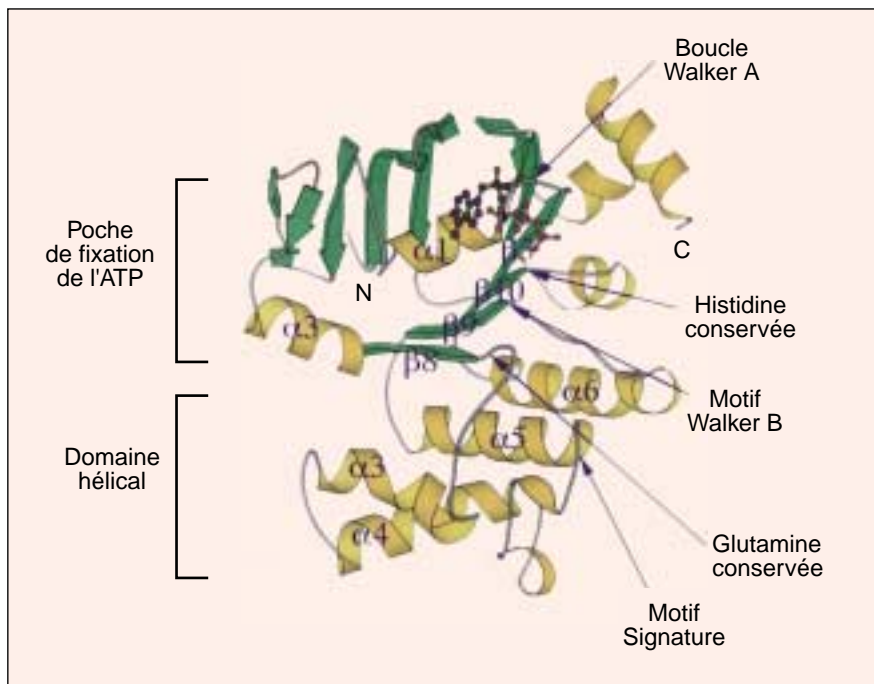


Figure 4. **Structure du DLN du transporteur ABC de l'histidine.** Vue du monomère de HisP montrant la poche de fixation de l'ATP (essentiellement composée de feuillettes  $\beta$ ) et le domaine hélical d'interaction avec les domaines transmembranaires (constitué d'hélices  $\alpha$ ). La localisation d'éléments structuraux discutés dans le texte est indiquée. (Adapté, avec la permission des auteurs, de la figure Ac de la référence [49]).

rôle est encore obscur. Juste après la région Centre commence le domaine hélical constitué d'hélices alpha, en accord avec des prédictions antérieures de structure secondaire. Le début du domaine hélical n'est pas conservé et son implication dans les interactions avec les DTM avait été proposée. Nous avons apporté des arguments expérimentaux en faveur de cette hypothèse. De plus, nous avons montré que ce domaine change de conformation sous l'influence de l'ATP et qu'il s'associe étroitement avec les DTM [50, 51]. Ce domaine contient le motif LSGGQ dont le rôle n'est pas clairement défini. Selon un modèle antérieur, ce motif aurait pu soit servir de « linker » flexible permettant la transmission d'un changement de conformation entre DTM et DLN, soit contenir des résidus catalysant l'hydrolyse de l'ATP. Cependant, ces deux interprétations sont infirmées par la structure de HisP. Il semble plutôt que le rôle de ce motif soit propre à l'interaction avec les DTM. Le domaine se connecte à la poche de fixation de l'ATP par les brins  $\beta_8$  et  $\beta_9$  portant respectivement le motif Walker B et la glutamine conservée. Un changement de conformation des DTM transmis au domaine hélical pourrait donc provoquer l'hydrolyse de l'ATP en changeant la position de ces brins bêta. A la suite du brin  $\beta_9$  portant le motif Walker B, se trouvent une boucle puis une hélice  $\alpha_6$  très variable. Des données génétiques suggèrent que cette hélice pourrait également participer à l'interaction avec les DTM [50, 52].

### Structure des DTM

Aucune structure à haute résolution de DTM ou de transporteur ABC entier n'a pu être établie expérimentalement. Une image tridimensionnelle reconstituée à partir de clichés obtenus par microscopie électronique de cristaux bidimensionnels [53] a permis de proposer une structure de la P-gp à 2,5 nm de résolution. Vue de dessus, la protéine ressemblerait à un tore avec un pore central d'un diamètre de 50 Å bouché du côté cytoplasmique de la membrane par deux lobes qui correspondraient aux DLN. Cette architecture formerait une « coupe » aqueuse

au sein de la membrane qui pourrait communiquer avec les lipides. Ces données expérimentales sont précieuses mais imprécises et il faut donc recourir à des modèles basés sur des prédictions topologiques et sur l'étude des relations séquence-fonction. La topologie d'un grand nombre de transporteurs ABC a été étudiée. Il apparaît que dans la majorité des systèmes étudiés, chacun des DTM est constitué de 6 segments transmembranaires. Les segments transmembranaires définissent probablement les sites de reconnaissance des substrats transportés. Le rôle prépondérant des segments transmembranaires a été récemment confirmé par des études biochimiques montrant que les segments transmembranaires 6 et 12 de P-gp sont à proximité l'un de l'autre, proches des drogues, et changent de conformation lors de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP [54]. En plus de ces segments transmembranaires, les boucles extracytoplasmiques pourraient participer à la constitution des sites de reconnaissance des substrats, en interagissant directement avec les substrats ou bien en modifiant le diamètre du pore. Le rôle des boucles intracytoplasmiques dans la reconnaissance des substrats n'est pas clairement établi. Par des approches biochimiques et génétiques, nous avons montré que certaines boucles intracytoplasmiques jouent un rôle important dans les interactions avec les DLN [50] et que les résidus de ces boucles sont proches de résidus du domaine hélicale des DLN.

## Conclusions

Dotés d'une organisation commune, les transporteurs ABC sont capables de fonctions extraordinairement diverses qui vont de la régulation génétique au transport de substances variées. La résolution de la structure moléculaire de HisP permettra probablement de mieux comprendre les fondements de l'inactivation des transporteurs par des mutations. Cependant, malgré cette avancée, la mécanique intime du transport reste largement spéculative. Comment l'énergie d'hydrolyse de l'ATP est-elle convertie en changements de conformations et comment ces changements influent-ils sur le mouvement

des molécules transportées? Quelle est la raison de l'existence de deux DLN, jouent-ils des rôles identiques et agissent-ils séquentiellement ou simultanément? Comment l'interaction avec les substrats est-elle transduite aux DLN? La réponse à ces questions passe par la mise en œuvre conjuguée d'approches génétiques, biochimiques et structurales ■

## RÉFÉRENCES

- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, *et al.* Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 1990; 346: 362-5.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1982; 1: 945-51.
- Saurin W, Hofnung M, Dassa E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* 1999; 48: 22-41.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, *et al.* Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-72.
- Des Georges M, Guittard C, Claustres M, *et al.* Les bases moléculaires de la mucoviscidose en France: plus de 300 mutations et 506 génotypes différents sont en cause. *Med Sci* 1998; 14: 1413-21.
- Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, *et al.* Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 1995; 268: 426-9.
- Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, *et al.* Cloning of the beta cell high-affinity sulfonyleurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 1995; 268: 423-6.
- Wada M, Toh S, Taniguchi K, *et al.* Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 203-7.
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, *et al.* Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 1993; 361: 726-30.
- Netik A, Forss-Petter S, Holzinger A, Molzer B, Unterrainer G, Berger J. Adrenoleukodystrophy-related protein can compensate functionally for adrenoleukodystrophy protein deficiency (X-ALD): implications for therapy. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 907-13.
- Gärtner J, Moser H, Valle D. Mutations in the 70K peroxisomal membrane protein gene in Zellweger syndrome. *Nat Genet* 1992; 1: 16-23.
- Allikmets R, Singh N, Sun H, *et al.* A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABC8) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 1997; 15: 236-46.
- Bodzioch M, Orso E, Klucken J, *et al.* The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 1999; 22: 347-51.
- Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* 1994; 21: 150-9.
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, *et al.* Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22: 336-45.
- Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM. Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Hum Mol Genet* 1999; 8: 743-9.
- de la Salle H, Hanau D, Fricker D, *et al.* Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 1994; 265: 237-41.
- de la Salle H, Zimmer J, Fricker D, *et al.* HLA class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP1. *J Clin Invest* 1999; 103: R9-13.
- Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 1990; 348: 741-4.
- Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, *et al.* A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 1998; 20: 233-8.
- Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, *et al.* The sister of p-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 1998; 273: 10046-50.
- van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, *et al.* MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 1996; 87: 507-17.
- Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, *et al.* Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993; 75: 451-62.
- De Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, *et al.* Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 282-7.



## RÉFÉRENCES

24. Toti F, Schindler V, Riou JF, *et al.* Another-link between phospholipid transmembrane migration and ABC transporter gene family, inferred from a rare inherited disorder of phosphatidylserine externalization. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 548-52.
25. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, *et al.* Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4028-33.
26. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach J, *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650-4.
27. Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J Biol Chem* 1996; 271: 9675-82.
28. Borst P, Ouellette M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 427-60.
29. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2378-86.
30. Fath MJ, Kolter R. ABC transporters – bacterial exporters. *Microbiol Rev* 1993; 57: 995-1017.
31. Braun V, Hantke K, Köster W. Bacterial iron transport: mechanisms, genetics and regulation. In: Sigel A, Sigel H, eds. *Iron transport and storage in microorganisms, plants and animals*. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker Inc, 1998: 67-145.
32. Bliss JM, Silver RP. Coating the surface: a model for expression of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1. *Mol Microbiol* 1996; 21: 221-31.
33. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, *et al.* Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991; 253: 202-5.
34. Taguchi Y, Kino K, Morishima M, Komano T, Kane SE, Ueda K. Alteration of substrate specificity by mutations at the His(61) position in predicted transmembrane domain 1 of human MDRI/p-Glycoprotein. *Biochemistry* 1997; 36: 8883-9.
35. Ewart GD, Cannell D, Cox GB, Howells AJ. Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*: implications for structure-function relationships. *J Biol Chem* 1994; 269: 10370-7.
36. Dey S, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM, Ambudkar SV. Evidence for two nonidentical drug-interaction sites in the human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10594-9.
37. Ames G, Nikaido K, Groarke J, Petithory J. Reconstitution of periplasmic transport in inside-out membrane vesicles: Energization by ATP. *J Biol Chem* 1989; 264: 3998-4002.
38. Dean DA, Davidson AL, Nikaido H. Maltose transport in membrane vesicles of *Escherichia coli* is linked to ATP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9134-8.
39. Bishop L, Agbayani R, Ambudkar S, Maloney P, Ames G. Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6953-7.
40. Davidson AL, Nikaido H. Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1991; 266: 8946-51.
41. Senior AE, Bhagat S. P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites. *Biochemistry* 1998; 37: 831-6.
42. Azzaria M, Schurr E, Gros P. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 5289-97.
43. Androlewicz MJ, Cresswell P. Human transporters associated with antigen processing possess a promiscuous peptide-binding site. *Immunity* 1994; 1: 7-14.
44. Liu RH, Sharom FJ. Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in the nucleotide binding domains. *Biochemistry* 1996; 35: 11865-73.
45. Ramachandra M, Ambudkar SV, Chen D, *et al.* Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry* 1998; 37: 5010-9.
46. Shilton BH, Mowbray SL. Simple models for the analysis of binding protein-dependent transport systems. *Protein Sci* 1995; 4: 1346-55.
47. Senior AE, Gadsby DC. ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Semin Cancer Biol* 1997; 8: 143-50.
48. Decottignies A, Goffeau A. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* 1997; 15: 137-45.
49. Hung LW, Wang IXY, Nikaido K, Liu PQ, Ames GFL, Kim SH. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 1998; 396: 703-7.
50. Mourez M, Hofnung M, Dassa E. Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO J* 1997; 16: 2066-77.
51. Mourez M, Jehanno M, Schneider E, Dassa E. In vitro interaction between components of the inner membrane complex of the maltose ABC transporter of *Escherichia coli*: modulation by ATP. *Mol Microbiol* 1998; 30: 353-63.
52. Beaudet L, Urbatsch IL, Gros P. Mutations in the nucleotide-binding sites of P-glycoprotein that affect substrate specificity modulate substrate-induced adenosine triphosphatase activity. *Biochemistry* 1998; 37: 9073-82.
53. Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J Biol Chem* 1997; 272: 10685-94.
54. Loo TW, Clarke DM. Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein requires movement between transmembrane segments 6 and 12. *J Biol Chem* 1997; 272: 20986-9.

## Summary

### Role, functional mechanism and structure of ABC (ATP-binding cassette) transporters

ATP binding cassette (ABC) transporters constitute one of the largest families of proteins. These transporters are involved not only in the import or export of a wide variety of substrates, but also in the regulation of many cellular processes. ABC transporters were first discovered and studied in bacteria, but have now been reported in eukaryotes and humans, with a remarkable conservation in sequence and structural organization. They share the same structure in four domains: two hydrophobic domains comprising the substrate recognition site, and two conserved hydrophilic domains which bind and hydrolyze ATP, thus energizing transport. Several members of this growing family are involved in various human disorders. Here, we review the most prominent ABC transporters with a special focus on those involved in diseases.

## TIRÉS À PART

E. Dassa.