THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

Ecole Doctorale BioSanté Secteur de Recherche Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée par

Ayman Salah Ahmed EL-SEEDY

Etudes moléculaire et cellulaire des mutations du gène CFTR :

de la génétique à la fonctionnalité de la protéine

Directeur de Thèse: Dr. Véronique LADEVEZE

Soutenue le 17 Février 2011

Devant la Commission d'Examen

JURY

Mme. le Professeur Isabelle CREVEAUX	Rapporteur
Mme. le Docteur Michèle MAURICE	Rapporteur
Mr. le Professeur Fréderic BECQ	Examinateur
Mr. le Professeur Alain KITZIS	Examinateur
Mme le Docteur Pascale FANEN	Examinateur
Mme le Docteur Véronique LADEVEZE	Examinateur

A la mémoire de mon père Salah El-SEEDY

Son souvenir est toujours vivace

Ses conseils ont toujours éclairé mon chemin, et je tacherai de ne pas les oublier.

REMERCIEMENTS

Que de plaisir j'ai eu à découvrir la belle province, le Poitou-Charentes, sous toutes ses coutures ! Tout au long de mon séjour, plusieurs personnes ont croisé mon chemin ou l'ont suivi avec moi. Je me permets donc d'en remercier un grand nombre, pour qu'elles sachent que je les apprécie. Je souhaite tout d'abord remercier le Pr. Guy Raymond, l'ancien directeur de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS UMR 6187, Université de Poitiers, ainsi que le Pr. Frédéric Becq, qui lui a succédé à la direction de l'unité pour m'avoir accueilli au sein de leurs unités de recherche afin de me permettre d'y réaliser ma thèse.

Je tiens d' abord à exprimer toute ma gratitude envers Monsieur le Professeur Alain Kitzis pour m'avoir accueilli dans son équipe Pathologies Moléculaires de l'Adressage et de la Signalisation. J'ai pu ainsi bénéficier de son esprit scientifique rigoureux, et de son aide continuelle, ce qui m'a donné le désir de mieux faire et le courage de continuer.

J'aimerais exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à mon directeur de recherche, le Dr Véronique Ladevèze, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et son équipe de recherche. Grâce à son appui moral, ses qualités humaines et scientifiques, j'ai pu acquérir les connaissances indispensables pour réaliser des recherches avec rigueur dans les années à venir. Ma reconnaissance va également à toutes les personnes qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet, à commencer par notre assistante de recherche, Mme Marie-Claude Pasquet pour le soutien moral et technique durant les périodes plus difficiles de ce travail. Je remercie particulièrement le Professeur Isabelle Creveaux et le Docteur Michèle Maurice qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ce manuscrit et de toute l'attention qu'elles ont portée à sa lecture.

J'adresse tous mes remerciements au Pr. Alain Kitzis, pour avoir accepté de présider mon jury de soutenance de thèse, ainsi qu'au Pr. Frédéric Becq pour tout l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour avoir accepté de le juger, et enfin au Dr. Pascale Fanen pour avoir accepté de participer à ce jury.

Mes remerciements vont aussi au Pr. Pascale Fanen et au Dr. Emmanuelle Girodon pour les discussions fructueuses touchant à ce projet. Je remercie le Dr. Caroline Norez, pour son aide technique, ses conseils tant au niveau professionnel que personnel, sa bonne humeur et sa précieuse collaboration et aussi, le Dr. Anne Cantereau pour son "oeil expert" en microscopie confocale et pour les diverses discussions que nous avons pu avoir.

Mes remerciements vont également au gouvernement Egyptien et à son Ministère de l'Enseignement Supérieur, pour l'octroi d'une bourse qui m'a permis de poursuivre mes études supérieures au France. J'aimerais aussi remercier du fond du cœur tous les membres de la mission universitaire d'Egypte à Paris, qui m'ont toujours porté conseil et aide quand j'en avais besoin.

Je remercie toutes les personnes du laboratoire pour les conseils, techniques, leur soutien et leur bonne humeur. Merci de mettre une bonne ambiance dans le laboratoire. Je tiens également à remercier toute ma famille pour son soutien constant tout au long de mes études et de mon doctorat.

LISTE DES ABBREVIATIONS

Α	Absorbance
ABC	ATP Binding Cassette
ABC	Adenosine triphosphate binding cassette
ABCD	Absence bilatérale congénitale des canaux déférents
АМРс	Adenosine Monophosphate cyclique
АТР	Adenosine triphosphate
АТР	Adénosine triphosphate
BCA	Bicinchoninic acid
BET	Bromure d'éthidium
Вр	base pair(s)
BSA	Bovine serum albumin
САМР	Cyclic adenosine monophosphate
CAVD	Congenital absence of vas deferens
CBAV	Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CF	Cystic fibrosis
CF-PI	Pancreatic-insufficient cystic fibrosis
CF-PS	Pancreatic-sufficient cystic fibrosis
CFTR	Cystic fibrosis trammembrane conductance regulator
CFTR-RD	Cystic fibrosis trammembrane conductance regulator-
	related diseases
СНИ	Centre Hospitalo-Universitaire
CUAVD	Congenital unilateral absence of vas deferens
DGGE	Denaturing Gel Gradient Electrophoresis
D-HPLC	Denaturing High Performance liquid Chromatography

DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Diméthyl Sulfoxide
dNTP	Désoxyribonucléotide
DTT	Dithiothréitol
DOC	Deoxycholate
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
ENAC	<i>Epithèlial</i> NA ⁺ <i>channel</i> , (canal sodique épithélial)
ER	Endoplasmic reticulum
GFP	Green fluorescent protein
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactoside
Kb	Kilo base
LB	Luria-Bertani
mRNA	messenger ribonucleic acid
NBD	Nucleotide Binding Domain
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
pdb	paire de bases
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
РКА	Protein Kinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PP2A	Protéine phosphatase2A
RE	Réticulum endoplasmique
ROMK	Renal Outer Medullary K+ channel
rpm	révolution par minute
RT	Reverse transcriptase
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression
TAE	Tris-acetate, EDTA buffer
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
TBS	Tris-buffered saline
тмр	Trans-Membrane Domain (domaine transmembranaire)
UNP	Unique Number Patient (numéro unique de patient)

Liste des publications et communications résultant de ce travail

Le présent travail a fait l'objet de publication parues, soumises ou en cours de rédaction:

1. <u>Ayman EL-Seedy</u>, Tony Dudognon, Frédéric Bilan, Marie-Claude Pasquet, Marie-Pierre Reboul, Albert Iron, Alain Kitzis, and Véronique Ladeveze. Influence of the Duplication of CFTR Exon 9 and Its Flanking Sequences on Diagnosis of Cystic Fibrosis Mutations. *J. Mol. Diagn.* 2009, 11: 488-493.

2. <u>Ayman EL-Seedy</u>, Marie-Claude Pasquet, Thiery Bienvenu, Eric Bieth, Marie-Pierre Audrezet, Emanuele Buratti, Alain Kitzis, and Véronique Ladeveze. Presence or Absence of Mutations in *CFTR*: Re-evaluation of Mutations in *CFTR* Exon 9. *Manuscrit soumis à BMC Medical Genetics*.

3. <u>Ayman EL-Seedy</u>, Emmanuelle Girodon, Caroline Norez, Julie Pajaud, Marie-Claude Pasquet, Thierry Bienvenu, Marie des Georges, Faïza Cabet, Guy Lalau, Eric Bieth, Martine Blayau, Frédéric Becq, Alain Kitzis, Pascale Fanen, and Véronique Ladeveze. Functional characterization of complex *CFTR* mutants: understanding of genotype-phenotype and structure-function correlations. *Manuscrit en préparation*.

4. <u>Ayman EL-Seedy</u>, Marie-Claude Pasquet, Emanuele Buratti, Alain Kitzis, and Véronique Ladeveze. Study of the impact of the c.734+40G>T on CFTR mRNA splicing. *Manuscrit en préparation*.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

• Bilan F, Nacfer M, Fresquet F, <u>EL-Seedy A</u>, Norez C, Kitzis A and Thoreau V "Endosomal SNARE proteins and CFTR apical targeting in polarized LLC-C PK1". European CF Young Investigator Meeting, 29- 31 August 2007, Lille (France).

• <u>Ayman EL-Seedy</u>, Tony Dudognon, Frédéric Bilan, Marie-Claude Pasquet, Marie-Pierre Reboul, Albert Iron, Alain Kitzis, and Véronique Ladeveze "Incidence of the CFTR exon 9 and its flanking sequence duplication on the mutation diagnosis in CF patients". 32nd European Cystic Fibrosis conference, 10-13 June 2009, Brest (France).

• <u>Ayman EL-Seedy</u>, Julie Pajaud, Marie-Claude Pasquet, Caroline Norez, Frédéric Becq, Emmanuelle Girodon, Pascale Fanen, Alain Kitzis, and Véronique Ladeveze "Molecular and Functional characterization of frequent associated CFTR mutants in French families". 11^{ème} Colloque des jeunes chercheurs sur la mucoviscidose, 8 Mars 2010, Institut Pasteur, Paris (France).

• <u>Ayman EL-Seedy</u>, Marie-Claude Pasquet, Alain Kitzis, and Véronique Ladeveze "Study of the impact of c.734+40G>T on CFTR mRNA splicing". 4th European CF Young Investigator Meeting, 24 -27 August 2010, Lille (France).

COMMUNICATIONS ORALES

• <u>Ayman EL-Seedy</u>, Marie-Claude Pasquet, Alain Kitzis, and Véronique Ladeveze "Study of the impact of c.734+40G>T on CFTR mRNA splicing". 4th European CF Young Investigator Meeting, 24-27 August 2010, Lille (France).

Table des matières

Table des matières

Page

REMERCIEMENTS

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE

I- La mucoviscidose	.1
II- Le gène <i>CFTR</i>	.2
II-1 Structure du gène CFTR	.2
II-2 Séquence polymorphe du gène <i>CFTR</i> : poly-T, poly-TG	.3
II-3 Duplication des séquences de l'exon 9 dans le génome humain	.5
III- La protéine CFTR	.7
III-1 Structure de la protéine	.7
III-2 Les différents domaines de CFTR	.8
III-2.1 Les domaines transmembranaires	.8
III-2.2 Les domaines de liaison des nucléotides (NBD)	.8
III-2.3 le domaine régulateur cytoplasmique (R)	.9
III-3 Fonctions de la protéine CFTR	.9
III-3.1. canal chlorure	.10
III-3.2 CFTR est plus qu'un canal chlorure	.11
IV- Biosynthèse, adressage, recyclage et dégradation de CFTR	.11
V- Mutations du gène CFTR	.13

VII- OBJECTIFS DU TRAVAIL	23
VI- Corrélations génotype- phénotype dans la mucoviscidose	21
V-4-2 les différents modes d'épissage alternatif	19
V-4-1 les mutations d'épissage	17
V-4 Les mutations d'épissage et les différents modes d'épissage alternatif	17
V-3 Les allèles complexes	16
V-2 La mutation F508del	15
V-1 Les différentes classes	13

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

I- Techniques de Biologie Moléculaire	
I-1 Extraction d'ADN génomique	26
I-2 Dosage des acides nucléiques	26
I-3 Choix des amorces de PCR	27
I-4 Amplification de l'ADN génomique par PCR	27
I-5 Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	
I-6 Séquençage	29
I-7 Clonage des produits amplifiés dans le vecteur pGEMT-easy	
I-7-1 Ligature	
I-7-2 Transformation d' <i>Escherichia coli</i> DH5α par choc thermique	
A- Préparation des cellules d' <i>E. coli</i> compétentes	31
B- Transformation Bactérienne	31
C- Stock glycérol de bactéries	
I-8 Extraction des plasmides	

I-8-1 Extraction classique d'ADN plasmidique	33
I-8-2 Mini-extraction de l'ADN plasmidique	34
I-8-3 Mega-extraction de l'ADN plasmidique	34
I-9 Digestion enzymatique	35
I-10 Comblement des extrémités cohésives	36
I-11 Création d'un minigène hybride	37
I-11-1 Composition du minigène	37
I-11-2 Ligature	37
I-11-3 Analyse informatique	
I-12 Manipulation de l'ARN	
I-12-1 Extraction des ARN totaux	
I-12-2 Préparation de l'ADN complémentaire (ADNc)	40
I-12-3 Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)	41
I-13 La mutagenèse dirigée	42
I-13-1 Plasmides utilisés pour la mutagenèse	43
A- PS65T/EGFP-C1/WT-CFTR	43
B - pTCF-wt	44
I-13-2 Les différentes étapes de la mutagénèse dirigée	45
A- Réaction de méthylation	45
B- Réaction de mutagenèse dirigée	46
I-14 Séquençage .	49
II- Techniques de Biologie Cellulaire	51
II-1 Culture cellulaire	51
II-1-1 Présentation des lignées cellulaires	51
II-1-2 Entretien des lignées cellulaires	53

II-2 Transfection de cellules transitoires	56
II-3 Immunolocalisation cellulaire	56
II-3-1 Immobilisation des cellules : fixation au paraformaldéhyde (PFA)	57
II-3-2 Coloration des noyaux	57
II-3-3 Marquage immunologique	58
A- Fixation et perméabilisation des cellules	58
B- Incubation avec les anticorps primaire et secondaire	58
III- Techniques de Biochimie	61
III-1 Western Blotting	61
III-1-1 Extraction des protéines	61
III-1-2 Dosage protéique	61
III-1-3 Western Blot	62
A- Préparation des gels de polyacrylamide.	62
B- Electrophorèse sur gel	63
C- Electrotransfert de SDS-PAGE	64
D- Détection immunologique des protéines	65
IV- Technique de physiologie cellulaire	67
IV-1 Mesure de l'activité de CFTR par microscopie confocale	67
IV-1-1 Principe de la sonde oxonol	67
IV-1-2 Protocole de charge	68
IV-1-3 Analyse des résultats	68

CHAPITRE 3 : **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

I- Etude de l'impact des duplications de l'exon 9 et des régions adjacentes sur le	
diagnostic des mutations du gène CFTR	71
I-1- Contexte de travail	71
I-2- Contexte bibliographique	72
I-3- Articles & Communications	72
I-4- Annexes	96
II- Etude de l'impact des allèles complexes sur la localisation, la maturation	
& la fonctionnalité de la protéine	
II -1 Contexte de travail	108
II -2 Contexte bibliographique	110
II -3 Articles & Communications	110
II-4- Annexes	151
III- Etude de l'impact d'une mutation sur l'épissage de l'ARN de CFTR	
III -1 Contexte de travail	161
III -2 Contexte bibliographique	162
III -3 Articles & Communications	162
III-4- Annexes	

CHAPITRE 4 : CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

I- Conclusions générales	187
I-1 Nouveau diagnostic des mutations de la région exon 9 du gène CFTR	188
I-2 L'impact des différentes substitutions dans le gène CFTR (associées ou non)	189
I-3 Influence de mutations sur l'épissage des pre-ARNm chez les patients atteints de	
mucoviscidose ou de CFTR – RD	191
II- Perspectives	192
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	194
CURRICULUM VITAE	212
RESUME en Français	215
RESUME en Anglais	216

INTRODUCTION

I- LA MUCOVISCIDOSE

La mucoviscidose (ou fibrose cystique du pancréas) est la maladie génétique grave, à transmission autosomique récessive, la plus fréquente en France avec un individu atteint sur 4000 naissances. En moyenne, une personne sur 30 possède un allèle de ce gène muté. Cette pathologie se caractérise par des anomalies de sécrétion d'eau et d'électrolytes. Elle atteint les organes exocrines, tels que les poumons, le foie et le pancréas, avec une diminution de la fluidité des sécrétions. De plus, les personnes atteintes de mucoviscidose ont des taux anormaux de sel dans la sueur (>60 mmol/L). La principale cause de décès est la colonisation des poumons par différents germes, tels que *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui provoque une diminution de la capacité respiratoire. Les patients atteints par cette maladie ont une espérance de vie diminuée (entre 30 et 35 ans) et aucun traitement curatif n'est encore disponible pour les soigner. Seuls des traitements symptomatiques permettent d'améliorer la qualité de vie de ces personnes : traitements antibiotiques et kinésithérapie, permettant d'évacuer les sécrétions épaisses des poumons. Ces différents traitements ont permis d'augmenter fortement l'espérance de vie de ces personnes (de 5 ans en 1960 à 39 ans en 2010).

La mucoviscidose est due au dysfonctionnement de la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), qui est un canal ionique de la famille des transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) et qui permet le transport des ions chlorures dans les cellules épithéliales, de façon AMPc dépendante (Adénosine Monophosphate cyclique). Ce transport influence la qualité du mucus : chez un sujet sain, le mucus est fluide, alors que chez un malade atteint de la mucoviscidose, celui-ci est visqueux et épais.

La protéine CFTR est codée par le gène *CFTR*, identifié en 1989 (Riordan *et al.*, 1989). La gravité de la pathologie dépend de la ou des mutations présentes : les symptômes allant d'une infertilité masculine (Mercier *et al.*, 1995) à une forme grave de mucoviscidose (Des Georges *et al.*, 1998), en passant par des pancréatites chroniques et des problèmes respiratoires (Ziedalsky *et al.*, 2006). Les formes moins sévères sont appelées des CFTR-RD (*CFTR-related desease*).

II - LE GENE CFTR

II-1 Structure du gène CFTR

Le gène CFTR est localisé en 7q31.2 (Fig. 1A) (Riordan et al., 1989). Depuis la découverte du gène CFTR, de nombreux laboratoires étudient les diverses mutations responsables de la mucoviscidose. Ils se sont regroupés au sein d'un réseau d'échange d'informations, créé à l'initiative des découvreurs du gène, le "Consortium International d'Analyse Génétique de la mucoviscidose" (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/). Cette structure a permis d'établir rapidement le spectre des mutations rencontrées dans les différentes populations étudiées dans le monde (figure 1). En 1989, le gène impliqué dans la mucoviscidose a été isolé (Kerem et al., 1989 ; Riordan et al., 1989 ; Rommens et al., 1989). Ce gène, dont l'analyse génétique a démontré la responsabilité dans la pathologie, contient 27 exons s'étendant sur 250 kb du bras long du chromosome 7. Depuis l'identification du gène, 1800 mutations plus de et 250 polymorphismes ont été décrits (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/2010). En France, la mutation la plus fréquente est F508del qui représente 70% des mutations.



Figure 1 : Schéma du gène *CFTR*. (A) La localisation chromosomique. (B) Le gène *CFTR* (250 kb d'ADN génomique) (C) Distribution des mutations du gène *CFTR*. (http://www.genet.sickkids.on.ca/Picture).

II-2 Séquence polymorphe du gène CFTR: poly-T, poly-TG

La séquence polymorphe [poly-T (Tn), et poly-TG (TG)m], située dans la région du site accepteur d'épissage de l'intron 8 (figure 2) existe en trois versions avec 5, 7 ou 9 thymidines (T5, T7 et T9, respectivement) (Kiesewetter *et al.*, 1993). Les allèles T7 et T9 génèrent un épissage normal, tandis que le variant T5 induit la synthèse de deux messagers, un normal avec l'exon 9 intact et l'autre avec une délétion en phase de l'exon 9 (Chillon *et al.*, 1995). Le produit obtenu est apparemment dépourvu de conductance chlorure activée par l'AMPc.



Figure 2 : Effets du site polymorphe (Tn) sur l'épissage du transcrit de *CFTR* (d'après Chillon *et al.*, 1995).

Le nombre de TG influe aussi sur l'épissage de l'exon 9, et quand sur le même allèle le polymorphisme (T)5 (TG)13 est présent, la proportion de messagers *CFTR* anormaux (sans exon 9) est augmentée (figure 3).



Figure 3 : Effet d'un allèle spécifique sur l'activité CFTR. L'effet de chaque allèle sur l'activité du canal CFTR est indiqué. La diminution des quantités de protéines CFTR fonctionnelles est présentée de haut en bas. La zone grisée indique la forme sévère de la maladie (Selon Radpour *et al.*, 2008).

De nombreuses études indépendantes ont montré que la fréquence de l'allèle T5 des patients ABCD (absence bilatérale congénitale des canaux déférents) est significativement (4 fois) plus élevée que celle de la population générale (4-5%) (Chillon *et al.*, 1995 ; Costes *et al.*, 1995 ; Cuppens *et al.*, 1998 ; Groman *et al.*, 2004). Cette mutation à pénétrance variable (Rave-Harel *et al.*, 1997 ; Teng *et al.*, 1997) induit un épissage qui diffère d'un individu à un autre et chez un même individu d'un organe à un autre.

Environ 10% des individus à travers le monde portent le variant T5 (Kiesewetter *et al.*, 1993), qui est associé à une absence bilatérale congénitale des canaux déférents (ABCD), une forme de stérilité masculine (Kiesewetter *et al.*, 1993 ; Osborne *et al.*, 1994 ; Chillón *et al.*, 1995 ; Jarvi *et al.*, 1995 ; Zielenski *et al.*, 1995). De plus, de rares homozygotes T5 ont été décrits comme patients atteints de mucoviscidose (Noone *et al.*, 2000), ce qui suggère que l'allèle T5 est un allèle partiellement pathogène pour les CF.

II-3 Duplication des séquences de l'exon 9 dans le génome humain

Le gène *CFTR* peut faire l'objet de grands réarrangements chromosomiques (Taulan *et al.*, 2007), en particulier au niveau de l'exon 9 et de ses régions adjacentes qui se retrouvent sur plusieurs autres chromosomes, parfois en plusieurs exemplaires (Rozmahel *et al.*, 1997). L'étude de ces duplications a révélé que cette région fait partie d'un ensemble appelé LCR7-20. Des expériences de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) ont révélé que les signaux, correspondant à la détection de ces régions amplifiées (figure 4a), sont observés sur plusieurs chromosomes (Liu *et al.*, 2004) : chromosome 20 (20p11.1, 20q11.1), 12 (12q11.1), 17 (17p.11.1), 9 (région centromérique), 14 (14q11.1), 13 (13q1) et 15 (15q15). Les signaux les plus importants sont présents sur le chromosome 7 (gène CFTR) et 20. Ces résultats ont été

confirmés par une seconde technique (Comet FISH des lymphocytes humains normaux, figure 4B).



Figure 4 : (A) FISH des chromosomes en métaphase de l'homme avec le cosmide Icos 41B10 Les flèches montrent les signaux d'hybridation sur des chromosomes différents. (B) Analyse en Comet FISH des lymphocytes humains normaux avec le cosmide Icos41B10. Les flèches indiquent les signaux d'hybridation (rouge). Le cosmide Icos 41B10 contient l'extrémité 5' de la région LCR7-20 dupliquée contenant l'exon 9 et ses régions adjacentes. (Liu *et al.*, 2004)

III- PROTEINE CFTR

III- 1- structure de la protéine CFTR

Chez l'homme, le gène *CFTR* code pour un messager de 6,5kb, qui est traduit en une protéine membranaire de 1480 acides aminés. Cette protéine est composée de plusieurs domaines (figure 5) : deux domaines hydrophobes, transmembranaires (TMD = *Trans-Membrane Domain*), deux domaines cytoplasmiques (NBD = *Nucleotide Binding Domain*) qui fixent l'ATP (Adénosine Triphosphate) et permettent ainsi de l'hydrolyser, et un domaine hydrophile R possédant un grand nombre de sites de phosphorylation, cibles de la protéine kinase A (PKA).



Figure 5 : Structure de CFTR (Serohijos *et al.*, 2008). (A) modèle schématisé (http://www.unc.edu/~awrs/images/Fig2.jpg). (B) modèle représentant la structure tertiaire.

L'énergie nécessaire pour transporter les molécules est fournie par l'hydrolyse de l'ATP : il est admis que cette hydrolyse par NBD1 ouvre CFTR, alors que l'hydrolyse de l'ATP par NBD2 ferme le canal (pour revue Becq, 2003). En effet, le domaine NBD1 permet une liaison stable avec l'ATP, tandis que NBD2 entraîne une dégradation rapide de l'ATP (Aleksandrov *et al.*, 2002). L'ouverture du canal est donc permise grâce à l'hydrolyse de l'ATP et son activité est contrôlée par la phosphorylation du domaine R (pour revue Becq, 2003). Il existe plusieurs isoformes de la protéine en fonction de son état de glycosylation, ces isoformes correspondent à des niveaux de maturation différents de la protéine.

III.2 Les différents domaines de CFTR

III.2.1 Les domaines transmembranaires

Les domaines transmembranaires (TMD) contiennent des hélices transmembranaires qui forment le pore du canal. Les domaines transmembranaires interagissent avec les domaines cytoplasmiques. Cette hypothèse a été soutenue par des études de mutagenèse qui ont indiqué que les différentes boucles cytoplasmiques, qui relient les hélices transmembranaires dans TMD1 et TMD2, interagissent avec les domaines de liaison aux nucléotides (Xie *et al.*, 1995 ; Seibert *et al.*, 1996 ; Seibert *et al.*, 1997 ; Cotton *et al.*, 1996). Des études complémentaires sont toutefois nécessaires pour élucider la nature des interactions entre ces domaines.

II.2.2 Les domaines de liaison des nucléotides (NBD)

Les deux domaines de liaison aux nucléotides montrent seulement 29% d'homologie globale d'acides aminés, mais contiennent des motifs nécessaires à la liaison de l'ATP et son hydrolyse : le motif Walker A (GXXGXGKT / S), le motif Walker B (R/KX₇₋₈h₄D) et la région de liaison (LSGGQ) (où X désigne un acide aminé quelconque et h un résidu hydrophobe) (Vankeerberghen *et al.*, 2002). Après l'activation du canal chlorure par la protéine kinase AMPc dépendante (PKA), la liaison à l'ATP et l'hydrolyse peut se produire au niveau de NBD1 et, par conséquent, le canal est ouvert. La liaison de l'ATP à NBD2 augmente l'état d'activation, puis l'hydrolyse de l'ATP par NBD2 ferme le canal. Une interaction entre les deux domaines de fixation des nucléotides semble être nécessaire pour l'activité du canal (Baukrowitz *et al.*, 1994).

III-2.3 le domaine régulateur cytoplasmique (R)

Les limites exactes de ce domaine demeurent un sujet de discussion. Initialement, le domaine R a été défini comme la partie de la protéine CFTR codée par l'exon 13. La comparaison des domaines R provenant de différentes espèces a indiqué que la partie N-terminale, jusqu'à l'acide aminé 650, est très conservée et des mutations situées dans cette région induisent un défaut de maturation de la protéine (Vankeerberghen *et al.*, 1998). Toutefois, selon Annereau *et al.*, (1997a,b), cette partie 5' de l'exon 13 code pour le domaine NBD1, et non pas pour le domaine R.

III-3- Fonctions de la protéine CFTR:

III-3.1. canal chlorure

CFTR est une ATPase / ABC-transporteur qui fonctionne comme un canal chlorure qui se caractérise par une faible conductance (7-10 pS) et une relation linéaire couranttension. Il est sélectif pour les anions sur les cations, et la perméabilité des anions présente la séquence suivante: $Br^> CI^> I^> F^-$. La régulation du canal chlorure est très complexe. Des

kinases multiples peuvent activer le canal CFTR mais seulement la protéine kinase Aactivation dépendante de la protéine CFTR a été décrite en détail.

Dès 1994, un modèle simplifié du canal a été établi par Gadsby et Nairn et la figure 6 représente de façon schématique les fixations de l'ATP et son hydrolyse (Davidson et Dorin, 2001). Le domaine R est phosphorylé par la PKA. Cette première étape permet la liaison de l'ATP à NBD1. Quand l'ATP est hydrolysé par NBD1, le canal s'ouvre et les anions peuvent s'écouler, selon le gradient électrochimique, à travers le pore formé par les domaines transmembranaires. Lorsque le domaine R est totalement phosphorylé, l'ATP peut se lier à NBD2. Cet événement stabilise l'état ouvert du canal chlore.



Figure 6 : Modèle simplifié des fixations et hydrolyse de l'ATP sur la protéine CFTR au niveau de la membrane cellulaire, Davidson et Dorin (2001).

Lorsque, par la suite, l'ATP est hydrolysé au niveau de NBD2 en libérant de l'ADP et du Pi des deux NBD, le canal se referme (Carson *et al.*, 1995). Tant que le domaine R est phosphorylé, la fixation et l'hydrolyse de l'ATP peuvent se poursuivre et, par conséquent, l'ouverture et la fermeture du canal. Toutefois, lorsque le domaine R est déphosphorylé par des phosphatases comme PP2A et PP2C (Travis *et al.*, 1997 et Luo *et al.*, 1998), les NBD ne sont plus en mesure de lier l'ATP et le canal restera fermé jusqu'à ce que le domaine R soit phosphorylé à nouveau par la PKA.

III.3.2 CFTR est plus qu'un canal chlorure

En plus de sa fonction en tant que canal Cl⁻, CFTR est reconnu comme un régulateur d'autres canaux et de transporteurs (Schwibert *et al.*, 1999). Ainsi, CFTR joue un rôle dans la régulation des canaux Na⁺ Épithéliaux (ENaCs) (Knowles *et al.*, 1983 ; Boucher *et al.*, 1986 ; Stutts *et al.*, 1995), des canaux apicaux K⁺ des cellules épithéliales rénales (ROMK) (McNicholas *et al.*, 1996 ; Cahill *et al.*, 2000),....

IV - Biosynthèse, adressage, recyclage et dégradation de CFTR

La synthèse de la protéine et son adressage jusqu'à la membrane plasmique, puis son recyclage et sa dégradation sont représentés dans la figure 7. Les molécules CFTR de type sauvage, comme les autres glycoprotéines de la membrane plasmique, traversent le RE, puis l'appareil de Golgi, où elles acquièrent des chaînes d'oligosaccharides complexes avant le transit vers la membrane plasmique par transport vésiculaire. Une fois à la membrane, ces molécules ont une demi-vie plus longue que leurs précurseurs (T1/2 ~ 16h contre T1/2 ~ 1/2h), mais elles subissent un cycle d'endocytose-exocytose (Prince *et al.*, 1994) et finissent par atteindre le lysosome, où elles sont dégradées.



Figure 7 : Biosynthèse et trafic de CFTR (Riordan, 1999). Flèche pleine et petite flèche en pointillée à partir des endosomes : trafic de CFTR WT. Grande flèche en pointillée à partir du RE : trafic de CFTR F508del.

Certaines mutations faux-sens de CFTR peuvent affecter la voie de sécrétion ou d'endocytose et de recyclage. L'étape de transit du RE au Golgi est le plus souvent détectée par SDS-PAGE, en suivant l'ajout de chaînes d'oligosaccharides complexes à la protéine CFTR. La cinétique de la conversion peut également être étudiée par microscopie à fluorescence en temps réel par l'utilisation des fusions GFP-CFTR. Bien que la majorité des résultats indique que la protéine mutée F508del reste dans le RE, Gilbert *et al.*, (1998) ont signalé qu'elle peut atteindre le compartiment intermédiaire (ERGIC) entre le RE et le Golgi. Lorsque sa protéolyse est inhibée, des formes hautement agrégées sont accumulées et ont été appelées «aggresomes» (Johnston *et al.*, 1998).

V - Mutations du gène CFTR

V-1 les différentes classes

L'étude des mutations du gène *CFTR* a fourni des renseignements importants dans le régulation de presque tous les aspects de la biologie de CFTR. En effet, les anomalies moléculaires ont des conséquences variables sur la protéine CFTR et sa fonction. Une classification de ces anomalies par rapport à la fonction canal Cl⁻ a été proposée dès 1993 et quatre classes ont été décrites (Welsh et Smith, 1993).

Classe 1 : mutations altérant la production de la protéine. Ces mutations résultent en une absence totale ou partielle de la protéine. Cette classe inclut les mutations non-sens et celles qui induisent l'apparition d'un codon stop prématuré (anomalies d'épissage et mutations décalant la phase de lecture). Dans certains cas, l'ARNm muté est instable et dégradé et ne produit pas de protéine. Dans les autres cas, la protéine anormale produite sera probablement instable et rapidement dégradée, et aura peu ou pas de fonction. En conséquence, les mutations de classe I peuvent entraîner une perte d'activité du canal chlorure CFTR.

Classe 2 : mutations perturbant le processus de maturation cellulaire de la protéine. De nombreuses mutations altèrent la maturation de la protéine et son ciblage vers la membrane apicale. Ainsi, la protéine est soit absente, soit présente en quantité réduite dans la membrane apicale. Les mutations de cette classe représentent la majorité des allèles CF (avec comme modèle F508del).

Classe 3 : mutations perturbant la régulation du canal Cl⁻. Ces mutations sont le plus souvent situées dans les domaines de liaison à l'ATP (NBD).

Classe 4 : mutations altérant la conduction du canal Cl⁻. Certains segments des domaines transmembranaires participent à la formation du pore ionique. Les mutations faux-sens situées dans ces régions produisent une protéine correctement positionnée qui présente une activité canal Cl⁻-AMPc dépendante. Mais les caractéristiques de ces canaux sont différentes de celles du canal CFTR endogène avec une diminution du flux d'ions et une sélectivité modifiée. C'est le cas des mutations R117H, R334W et R234P. Cette classe de mutations dans la plupart des cas est associée à un phénotype clinique peu sévère (Koch *et al.*, 2001).

Deux autres classes ont été ensuite décrites (Fulmer et al., 1995 ; Estivill, 1996).

Classe 5 : mutations altérant la stabilité de l'ARNm *CFTR*. La synthèse est réduite, il y a donc une diminution de la quantité de protéine CFTR fonctionnelle à la membrane apicale. Ces mutations affectent souvent les sites d'épissage; c'est le cas du polymorphisme (TG)13T5 dans l'intron 8 (Cuppens *et al.*, 1998).

Classe 6 : mutations altérant la stabilité de la protéine mature. La protéine CFTR est fonctionnelle mais instable à la membrane apicale (Zielenski, 2000). Vankeerberghen *et al.*, (2002) présente dans la classe VI des altérations nucléotidiques qui affectent les propriétés régulatrices de CFTR. De plus, la classe VI serait renommée V selon la re-classification de Welsh (2001).

La figure 8 regroupe les 6 classes de mutations possibles de CFTR (Meredith et al., 2009).



Figure 8 : Classification des mutations de CFTR. (Meredith et al., 2009)

Les stratégies thérapeutiques actuelles visent à réparer les défauts des protéines CFTR mutantes dans le but de les corriger *in vivo* (Pedemonte, *et al.*, 2005a ; Van Goor *et al.*, 2006).

V-2 La mutation F508del

La mutation la plus commune de *CFTR* entraînant une mucoviscidose (70% des allèles CF, Tsui, 1995) est la suppression de 3 nucléotides, qui induit la suppression d'une seule phénylalanine (F) en position 508 (F508del) (Kerem *et al.*, 1989 ; Davis *et al.*, 1996). Le mutant F508del-CFTR est associé à une forme sévère de la maladie. Plus de 90% des patients atteints de mucoviscidose ont au moins un allèle F508del. On estime de plus qu'environ la moitié des patients atteints de mucoviscidose sont homozygotes pour cette mutation. Cet allèle code pour une protéine instable et inefficace, la conséquence majeure étant

l'accumulation de la protéine mutante dans le réticulum endoplasmique (RE) et son absence au niveau de la membrane plasmique (Cheng *et al.*, 1990 ; Thomas *et al.*, 1992 ; Welsh et Smith, 1993). En conséquence, la protéine mutante retenue dans le RE est rapidement dégradée (Cheng *et al.*, 1990 ; Ward *et al.*, 1995).

La réversion du phénotype apparaît lorsque les protéines mutantes sont incubées à faible température (Denning *et al.*, 1992), ou en présence de molécules de faible poids moléculaires comme le glycérol (Sato *et al.*, 1996 ; Brown *et al.*, 1996), suite à un repliement correct de la protéine.

V-3 Les allèles complexes

L'existence d'au moins deux mutations ou variations de séquence sur le même allèle dans le gène *CFTR* a été nommé allèles complexes (Savov *et al.*, 1995 ; Fanen *et al.*, 1999 ; Romey *et al.*, 1999 ; Clain *et al.*, 2001 ; Rohlf *et al.*, 2002 ; Clain *et al.*, 2005). La plupart des allèles complexes peuvent représenter l'association d'une variation de séquence bénigne avec une mutation pathogène dans le même gène (Rowntree et Harris, 2003). La combinaison de deux mutations sévères pourrait aussi entraîner un phénotype moins sévère alors que des mutations modérées une fois associées en cis peuvent induire un phénotype plus sévère (Clain *et al.*, 2001). Plusieurs exemples où la mutation du deuxième site peut moduler l'effet de la mutation principale ont été décrits (Dork *et al.*, 1991 ; Hung *et al.*, 1998 ; Romey *et al.*, 2000).

Les résultats concernant les allèles complexes ont montré l'importance des implications pour les patients atteints de mucoviscidose. En effet, des mutations faux-sens « neutres » peuvent considérablement altérer la fonction de CFTR lorsqu'elles sont héritées en cis avec une mutation sévère. Cela peut expliquer en partie les difficultés à établir des corrélations génotype-phénotype et souligne clairement la nécessité du dépistage de mutations supplémentaires quand une discordance entre génotype et phénotype est observée.

L'analyse des mutations du gène *CFTR* par le Laboratoire de Poitiers, a conduit à la détection de certaines personnes ou certains patients porteurs de deux ou trois mutations sur le même allèle : un polymorphisme R668C et une mutation G576A, associés en cis soit à D443Y, soit à G149R. Chacune de ces mutations avait précédemment été observée indépendamment chez des patients atteints de mucoviscidose et chez ceux qui souffrent de ABCD. L'allèle complexe G576A-R668C a été signalé chez une personne avec un test à la sueur normal, alors que certains membres de la famille présentaient un phénotype atténué CF (Rowntree et Harris, 2003). Les études récemment publiées par Castellani *et al.*, (2008) indiquent que la mutation G576A seule provoque la mucoviscidose ou des troubles liés à CFTR, alors que l'allèle complexe R668C-G576A-D443Y a été classifié comme induisant un CFTR-RD (Abramowicz *et al.*, 2000).

V-4- les mutations d'épissage et les différents modes d'épissage alternatif

V-4-1 les mutations d'épissage

L'épissage exige des séquences conservées de site consensus d'épissage aux frontières exon-intron ainsi que divers éléments agissants en cis dans les exons et les introns (Fu, 2004 ; Matlin *et al.*, 2005). Les mutations pathogènes dans les sites d'épissage ou éléments exoniques perturbent souvent l'épissage, entraînant une perte de fonction de l'allèle affecté (Cartegni *et al.*, 2002 ; Faustino et Cooper, 2003). De plus, des Single-Nucleotide Polymorphisms (SNP) ont le potentiel d'affecter l'efficacité de l'épissage et de modifier la gravité de la maladie (Steiner *et al.*, 2004 ; Nielson *et al.*, 2007).

Une erreur d'épissage avec une insertion ou une délétion d'un seul nucléotide perturbera le cadre de lecture d'un ARNm. La précision remarquable de l'épissage est due en partie, au mécanisme de retrait d'intron car une fois que le spliceosome est assemblé, les bases appariées d'ARNsn ciblent spécifiquement des liaisons phosphodiesters pour le clivage. Le spliceosome reconnaît les sites d'épissage corrects avant les réactions de "couper-coller". Les sites d'épissage courts et dégénérés ne contiennent que la moitié des informations nécessaires à la reconnaissance de site d'épissage (Lim et Burge 2001) et même si ils ressemblent à des sites d'épissage classique, ils ne seront jamais utilisés. Les pseudos sites d'épissage peuvent être plus nombreux que les sites d'épissage corrects dans un pré-ARNm (Sun et Chasin 2000).

Dans la littérature sont décrits des défauts d'épissage de *CFTR* concernant des éléments cis auxiliaires soit des enhancers d'épissage exonique (ESE) et intronique (ISE), soit des silencers d'épissage exonique (ESS) et intronique (ISS). Des mutations sur ces sites peuvent induire des épissages alternatifs (Pagani *et al.*, 2000 et 2003 ; Zucatto *et al.*, 2004 ; Buratti *et al.*, 2007). De plus, des mutations ponctuelles silencieuses peuvent aussi modifier les ESE et ESS induisant un épissage incorrect (Nissim-Rafinia et Karem 2002). L'usage des minigènes a permis de mettre en évidence les relations entre le site polymorphe de l'intron 8 [(TG)m Tn] et le saut d'exon 9 (Pagani *et al.*, 2000). De plus, des nouveaux éléments composites des exons régulateurs de l'épissage (CERES pour *Composite Exonic Regulatory Elements of Splicing*) ont été identifiés. L'utilisation de minigènes a de nouveau permis de détecter la diminution des transcrits normaux suite à un saut d'exon 12, diminution induite par les mutations G576A ou D565G présentes dans les CERES (Pagani *et al.*, 2003).

V-4-2 Différents modes d'épissage alternatif

Il existe plusieurs types différents de l'épissage alternatif (AS), qui peuvent être classés en quatre sous-groupes principaux (selon Keren et al., 2010). La figure 9 représente les séquences nécessaires à l'épissage (figure 9A), et les différents épissages possibles (figure 9B), dont l'épissage constitutif normal (figure 9B1). Le premier type d'AS est le saut d'exon, dans lequel un exon n'est plus reconnu en tant que tel et est éliminé avec ses introns d'accompagnement (figure 9B2). Ainsi, l'ARNm de CFTR sans exon 9 code pour une protéine anormalement repliée et non fonctionnelle (Delaney et al., 1993 ; Strong et al., 1993). Près de 40% des AS correspondent à des sauts d'exon chez les eucaryotes supérieurs (Sugnet et al., 2004 ; Alekseyenko et al., 2007) mais ces événements sont extrêmement rares chez les eucaryotes inférieurs. Le second type est la rétention d'intron (figure 9B3) : un intron est conservé dans l'ARNm mature. Il s'agit du plus rare mécanisme d'AS chez les vertébrés comme chez les invertébrés (moins de 5% des événements) (Sugnet et al., 2004 ; Alekseyenko et al., 2007 ; Sakabe et De Souza, 2007 ; Kim et al., 2008). Par contre, la rétention d'intron est le mécanisme le plus répandu chez les plantes, les champignons et les protozoaires (Kim et al., 2008). Les deux processus suivants font intervenir les séquences du site d'épissage 3' SS ou 5'SS (figure 9B4-5). 18,4% des cas d'AS sont dus à l'élimination des séquences 3'SS et 7,9% à celle des séquences en 5'SS. Moins fréquents, d'autres événements complexes donnent lieu à une transcription alternative avec l'utilisation d'exons mutuellement exclusifs (figure 9B6). Une autre forme rare de l'AS implique des réactions entre deux transcrits primaires (Labrador et Corces, 2003).

De façon générale, l'épissage alternatif pourrait avoir une incidence sur la traduction et la stabilité des ARNm. (Ghigna *et al.*, 2008) et accroît la diversité des ARNm et des protéines exprimées dans la cellule (Black, 2003 ; Graveley, 2001).

19



Figure 9 : Mécanismes d'épissage alternatif. (A) séquences consensus d'épissage d'un gène eucaryote typique (exon / intron, signaux des sites d'épissage, site de branchement). (B) 1 épissage normal. 2-6 épissage alternatif des ARNm : saut d'exon (2), rétention d'intron (3), utilisation de séquences alternatives 3'-(accepteur) (4) ou 5'-(donneur) (5) et sélection des exons mutuellement exclusifs (6). (d'après Ghigna *et al.*, 2008).
VI- Corrélations génotype- phénotype dans la mucoviscidose

Le fait que l'environnement et d'autres facteurs génétiques peuvent influencer le phénotype (Vankeerberghen *et al.*, 2002) explique qu'il n'y a pas de corrélation stricte entre les mutations du gène *CFTR* spécifique et le phénotype des patients. Des mutations du gène *CFTR* ont un large spectre de manifestations phénotypiques (Kerem et Kerem 1996 ; Stern 1997). La mucoviscidose ne représente que la forme la plus sévère du spectre clinique. Des CFTR-RD existent, caractérisées soit par un développement moins rapide de la maladie (Strong *et al.*, 1991), soit par la limitation des manifestations sur un organe unique. L'absence congénitale bilatérale des canaux déférents (ABCD) est un exemple de cette dernière catégorie. Dans ce cas, le phénotype clinique est une azoospermie obstructive chez des hommes en bonne santé, tandis que le génotype présente des mutations du gène *CFTR* dans 70% -80% des individus testés (De Braekeleer et Férec, 1996). Les hommes atteints d'ABCD et de mucoviscidose ont généralement des anomalies diverses des vésicules séminales, comme une aplasie, hypoplasie (Olson et Weaver, 1969 ; Holsclaw *et al.*, 1971 ; Honig *et al.*, 1991).

En outre, des études ont montré que les hommes atteints de mucoviscidose peuvent ne pas avoir de conduits éjaculatoires visibles. Compte tenu de l'origine embryonnaire commune de ces structures avec les canaux mésonéphriques (Larsen, 1993), il n'est pas surprenant de trouver des anomalies combinées des canaux déférents, des épididymes, des vésicules séminales et des canaux éjaculateurs.



Figure 10 : Spectre des phénotypes associés aux génotypes de *CFTR*. La sévérité de la maladie est représentée en fonction des génotypes associés. wt = Wild-type ; other = very mild (mutation très légère), mild (légère) ou severe (sévère). Les haplotypes polyvariants (Larriba, *et al.*, 1998) sont des variants polymorphes fréquents qui peuvent contribuer à des phénotypes monosymptomatiques. (d'après Zielenski *et al.*, 2000)

Les analyses de la corrélation entre génotype et phénotype ont montré que les mutations du gène *CFTR* pouvaient être regroupées en deux catégories, légères ou graves, à l'égard de la fonction pancréatique (Kristidis *et al.*, 1992). Les mutations sévères sont associées à l'insuffisance pancréatique alors que les mutations légères, conduisent à une activité CFTR résiduelle, et confèrent la suffisance pancréatique (Kristidis *et al.*, 1992). Un patient CF est susceptible d'être suffisant pancréatique s'il présente une ou deux mutations légères. De nombreuses études ont montré que certains génotypes sont associés à un phénotype sévère (De Braekeleer *et al.*, 1995 ; Zielenski et Tsui, 1995 ; Patrizio et Zielenski, 1996). Toutefois, une forte variabilité, surtout au niveau de la fonction pulmonaire, a été

observée pour chaque génotype ou entre frères et soeurs, ce qui suggère que d'autres facteurs, génétiques ou environnementaux, peuvent influer sur la gravité et / ou la progression de la maladie (Tizzano et Buchwald, 1995). Dès le début des années 1970, il a été suggéré qu'ABCD est une forme bénigne de la fibrose cystique (Holsclaw *et al.*, 1971). Toutefois, seul un petit nombre de cas présentant des antécédents familiaux de CF et un test de la sueur positif a été documenté (Stem *et al.*, 1982 ; Kaufman *et al.*, 1986). Le développement des techniques moléculaires pour identifier les mutations du gène *CFTR* permet maintenant d'identifier l'ensemble des mutations et d'étudier la corrélation génotype-phénotype, en particulier l'impact des mutations sur la localisation, la maturation et la fonctionnalité de la protéine.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif mais seulement des traitements symptomatiques : la kinésithérapie et l'antibiothérapie permettent de diminuer les symptômes mais pas la cause de la maladie. Lorsque la protéine mutée existe, nous pouvons imaginer q'un médicament dans le futur soit disponible. Dans le cas de mutation d'épissage, l'absence de transcrit et donc de protéine impliquera soit une thérapie génique, soit une thérapie cellulaire.

VII - OBJECTIFS DU TRAVAIL

A l'heure actuelle, il existe encore de très nombreuses incertitudes concernant:

- L'impact des régions dupliquées sur la détection des mutations
- Les allèles complexes et leurs implications physiopathologiques
- Les mutations faux sens ou introniques affectant l'épissage.

1- Le point de départ de la première étude a été les résultats discordants obtenus entre deux individus testés de la même famille en fonction du CHU où se déroulait la recherche de mutations. Les mutations impliquées se trouvaient dans une région difficile à amplifier correctement d'une part à cause de la présence d'un site polymorphe en 3'de l'intron 8 (TG)mTn, et d'autre part à cause de la présence de duplications de cette région. Notre objectif a été de déterminer si les mutations étaient réellement présentes sur le gène, et non sur des copies extragéniques. Pour cela nous avons réalisé de nombreuses amplifications avec des couples d'amorces différents pour mettre en évidence l'existence de pseudoexons. Nous avons ensuite réexaminé les échantillons porteurs des mutations présentes dans les régions dupliquées afin de restreindre le nombre de mutations spécifiques du gène *CFTR*.

2- La seconde partie concerne l'étude des allèles complexes et leur impact physiopathologique. L'étude de l'ensemble des dossiers analysés au CHU de Poitiers nous a permis d'établir trois allèles complexes, dont l'un porte une mutation détectée dans l'exon 9 au cours de l'analyse précédente. Une collaboration a pu être réalisée entre le CHU de Poitiers et le CHU de Créteil et nous a permis de collecter l'ensemble des données génétiques et cliniques de ces allèles complexes sur un plus grand nombre de CHU. Après mise en évidence des relations « Génotype - Phénotype », nous avons tenté de mieux comprendre l'impact des différentes mutations, seules ou associées. Pour cela, nous avons réalisé des mutagenèses dirigées, puis transfecté des cellules eucaryotes avec les plasmides obtenus (porteurs des mutations simple, ou des allèles complexes). L'étude de la localisation membranaire de CFTR a été effectuée par microscopie confocale, la maturation par Western-blot et la fonctionnalité de la protéine par l'étude physiologique du canal CI[°].

3- La dernière partie du travail concerne l'impact de mutations (faux sens ou introniques) sur l'épissage en utilisant la technique de minigènes hybrides décrite par Pagani *et al.* (2000). Le choix des mutations testées a été déterminé par les indications cliniques : une mutation faux sens décrite dans la première partie et appartenant à l'exon 9 et une mutation présente dans l'intron 6a .Ces deux mutations ont été choisies suite à l'étude clinique des patients. Nous avons dans un premier temps amplifié un minigène contenant la région qui nous intéressait, puis nous l'avons cloné dans un plasmide adéquat. Après transfection dans des cellules eucaryotes, et extraction des ARN, nous avons analysé les produits amplifiés obtenus après RT-PCR afin de déterminer la présence ou non d'un ARN epissé correctement.

Au vu de l'ensemble de ces approches, l'objectif final de notre démarche est de définir les conditions optimales pour étudier les mutations et leur impact physiopathologique chez des patients susceptibles de présenter une forme de CFTR-RD ou la mucoviscidose. Cette étude nous permet d'établir un diagnostic plus fiable, ceci afin d'émettre un conseil génétique avisé lors d'un diagnostic prénatal.

Matériels & Méthodes

MATERIELS & METHODES

I- MATERIELS ET METHODES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

I-1 EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

Le sang est prélevé sur anticoagulant (EDTA). Tous les échantillons d'ADN génomique ont été extraits à partir de cellules du sang périphérique en utilisant le QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) selon le protocole du fournisseur. Dans un microtube, 200µL de sang sont mélangés avec 20µL de protéase et 200µL de tampon AL. Apres 10min d'incubation au bainmarie à 56°C, 200µL d'éthanol sont ajoutés et mélangés (à l'aide d'un vortex) 15 secondes. La solution est versée sur une colonne et centrifugée 1min à 8000g. Le surnageant est éliminé et le colonne est lavée avec 500µL de AW1 et centrifugée 1min à 8000g. Une fois le surnageant éliminé, la colonne est lavée avec 500µL de AW2 et centrifugée 3min à 14000g. L'ADN est récupéré en ajoutant 200µL de AE (tampon d'élution) dans la colonne. Après au moins 5 min d'attente, on centrifuge 1min à 8000g. L'ADN génomique obtenu est conservé à 4°C.

I-2 DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

L'estimation de la concentration est réalisée par spectrophotométrie : les bases puriques et pyrimidiques absorbent dans l'ultraviolet (UV) à 260nm. Une unité d'absorbance à 260nm correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50µg/mL. La concentration (C) en µg/mL est déterminée à l'aide de la formule :

1 unité de A260nm = 50μ g/mL, soit C = (A x facteur de dilution x 50). Comme ces valeurs s'appliquent à des acides nucléiques purs et en solution homogène, certains contrôles doivent être effectués. Il convient donc de rechercher : • Une éventuelle contamination protéique (les protéines absorbant non seulement à 280nm mais aussi à 260nm). Pour cela, une mesure de l'absorbance à 280nm est réalisée. Un ADN correctement purifié présente un rapport A260nm/A280nm compris entre 1,6 et 1,8.

• Une éventuelle contamination par du phénol peut également être recherchée en mesurant l'absorption à 270nm. Ces contaminations entraînent une surestimation de la concentration réelle de l'ADN, elles risquent d'inactiver les enzymes qui seront ultérieurement utilisées.

I-3 CHOIX DES AMORCES DE PCR:

Afin de déterminer la séquence complète du gène CFTR, il est nécessaire d'amplifier la séquence d'intérêt à l'aide d'amorces judicieusement choisies puis de la séquencer. Plusieurs couples d'amorces ont été choisis à partir de la séquence humaine afin d'amplifier l'ADN de patients. Les amorces nécessaires pour l'amplification ont été sélectionnées en fonction de la région qui nous intéresse.

I-4 AMPLIFICATION DE L'ADN GENOMIQUE PAR PCR

La PCR est un moyen rapide et facile d'amplifier un fragment spécifique d'ADN. Plus particulièrement, la PCR est une méthode d'amplification *in vitro* de séquences d'ADN d'extrémités connues. Dans ce protocole, un échantillon d'ADN est d'abord dénaturé.

Les échantillons utilisés pour le dépistage de mutations ont été amplifiés en volume de 50µL de réaction contenant 100 ng d'ADN, 1,5 mM MgCl₂, 0.25 mM de chaque dNTP, 1 U de Taq polymérase-2 (Amersham) et 20 pmoles de chaque amorce (cf tableau 1). Les conditions utilisées pour l'amplification par PCR ont été les suivantes: 5 min à 94 ° C, 30 cycles de 30 s à 94 ° C, 30 s à la température d'hybridation, et 30 s à 72 ° C. Après amplification, une étape d'extension prolongée à 72°C a été réalisée pendant 5 min.

Réactifs	Volumes	Molarité finale
H ₂ O stérile	5,25µL	
Tampon 10X	5,0 μL	
MgCl ₂ 25mM	3,0 μL	1,5mM
dNTP 25 mM	0,5 μL	0,25mM
Amorce sens 20µM	0,5 µL	0,25mM
Amorce reverse 20µM	0,5 μL	0,25mM
Taq DNA Polymerase	0,5 μL	0,5U
Matrice ADN Total	5,0 μL 50 μL	

Tableau 1. Conditions pour générer des fragments de PCR

I-5 ELECTROPHORESE D'ADN SUR GEL D'AGAROSE

Pour vérifier la taille des fragments obtenus par PCR, les échantillons sont soumis à un champ électrique de 100 Volts dans un gel d'agarose à 1,5 % dans du tampon TAE 0,5X. Cette technique est basée sur le fait que l'ADN est chargé de façon négative. Les fragments migrent en fonction de leur poids moléculaire vers l'anode. L'ADN est visualisé par le Bromure d'Ethydium incorporé dans la double hélice. Le volume d'échantillon de PCR déposé est de 6μ L et 3μ L de bleu de bromophénol 3X. La taille des fragments obtenus sera déterminée en comparant leur mobilité électrophorétique à celle du marqueur de taille Φ X174DNA digéré par *HaeIII* (Marker, 9 MBI Fermentas). Selon la taille du fragment d'ADN amplifié, nous utilisons des gels d'agarose à 1% ou 1,5%. Les électrophorèses sont réalisées dans du tampon TAE 1X à 100 volts pendant 15-20 minutes.

<u>TAE 50X :</u>		DNA gel loading buffer 6X (bleu de charge)	
Tris-HCl, pH 8	242g	bleu de bromophénol	0,25% (p/v)
Acide acétique	57,1mL	Xylène-cyanol	0,25% (p/v)
EDTA 0,5M	100mL	Ficoll Type 400	15% (v/v)

Bromure d'éthidium :

Bromure d'éthidium 0,5mg H2O 1mL Tampon Protéger de la lumière, conserver à 4°C

I-6 SEQUENÇAGE

Le séquençage est réalisé sur le produit PCR en utilisant le kit ABI PRISM Big Dye Terminator TM cycle sequencing Reading Reaction (Applied Biosystem). Chaque nucléotide porte un fluorochrome différent ; les amorces utilisées sont les mêmes que précédemment. Chaque amorce est utilisée indépendamment de l'autre.

La PCR est réalisée de la façon suivante :

Pour un tube :

ADN	2μL
Big Dye	2μL
Amorce (3,2pmole)	1µL

25 cycles comprenant :

Dénaturation	10 s à 96°C
Hybridation	30 s à 44°C
Elongation	4 min à 60°C

Après PCR, une étape de précipitation est réalisée afin de pouvoir séquencer l'ADN. Pour cela : 35μ L d'eau et 60 μ L d'isopropanol (60%) sont ajoutés aux échantillons, l'isopropanol présente deux avantages par rapport à l'éthanol utilisé conventionnellement. En effet il peut être utilisé à température ambiante et ne nécessite pas d'ajout de sel. Les échantillons sont incubés pendant 15 min à température ambiante, puis centrifugés pendant 15 minutes à 14000g. Le surnageant est ensuite éliminé et le culot repris dans 60 μ L d'éthanol 75%. Une deuxième centrifugation est réalisée pendant 5 minutes, le surnageant est enlevé et le culot

séché en laissant les tubes ouverts. Le culot est resuspendu dans 24μ L d'eau et chaque échantillon est dilué au 1/4, puis séquencé. Les séquences sont alignées entre elles et comparées à partir de la banque de données *CFTR* (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr).

I-7 CLONAGE DES PRODUITS AMPLIFIES DANS LE VECTEUR

pGEMT-EASY

Les produits obtenus lors des différentes PCR sont insérés dans un vecteur pGEM®-T Easy (Promega), spécialement adapté au clonage de produit de PCR.

I-7-1 ligature

Les quantités respectives de vecteur linéaire et d'insert sont ajustées pour être dans un rapport molaire de 1 pour 3.

Les réactions de ligature s'effectuent dans le milieu réactionnel suivant.

2X rapid ligation buffer : $5\mu L$				
PCR product	:1µL	ou	3µL	
pGEM-vector	:1µL			
T4 DNA ligase	:1µL			
H2O qsp	:10µL			

Les réactions sont incubées 2h à 20°C et une nuit à 4°C.

I-7-2 transformation d'Escherichia coli DH5a par choc thermique

Nous utilisons la souche Escherichia coli DH5 α . Dans la première partie de notre travail, le vecteur pGEMT-Easy (figure 11) est utilisé, il code pour la résistance à l'ampicilline.



Figure 11. Carte de restriction de pGEM®-T Easy (http://www.promega.com/paguide/images/1473VA05_6A.jpg).

A - Préparation des cellules d'*E. coli* compétentes:

Une culture bactérienne est reprise au 1/100 puis incubée 2 heures à 37° C. Pendant l'incubation, une solution de Tris CaCl₂ 50mM est préparée et filtrée (0,22µ). Ensuite l'absorbance à 600 nm est mesurée. Quand elle est comprise entre 0,3 et 0,6, la culture bactérienne est centrifugée 10 min à 3000g et à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par 12,5 mL de Tris CaCl₂. Puis le mélange est incubé à 4°C de 40 min à 3 heures. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 2000g pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire est repris par 2,5 mL de Tris CaCl₂ et les cellules sont conservées à 4°C.

B-Transformation Bactérienne

Le plasmide d'intérêt est ajouté à 100-150µL de cellules compétentes. Après une incubation de 20 à 45 min dans la glace, un choc thermique est réalisé pendant 2 min à 42°C pendant lequel l'entrée du plasmide dans la cellule est facilitée par le CaCl₂, et le mélange est aussitôt

remis sur la glace pendant 2 min. Ensuite du milieu LB est ajouté (volume final de 1 mL). Cette étape est suivie d'une incubation de 1 heure à 37°C sous agitation puis d'une centrifugation courte dans le but d'obtenir un culot cellulaire. Une partie du surnageant est éliminée et le reste est resuspendu afin d'être étalé sur boite de culture et incubé toute la nuit à 37°C. Après croissance, les clones sont mis en culture dans du milieu LB additionné d'antibiotique et incubé une nuit à 37°C. Selon les plasmides, la sélection des clones est réalisée en utilisant l'antibiotique adapté (soit l'ampicilline, soit la kanamycine).

Milieu LB (Luria Bertani) :

Bacto-tryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	10g
NaOH 10N	400µL
Agar	15g (pour milieu solide)
H ₂ O	1L
Autoclaver pendant	20min. à 120°C et 1 bar.

C - Stock glycérol de bactéries

Une colonie au moins pour chaque type de bactéries transformées est reprise dans 3mL de LB supplémenté des antibiotiques appropriés et, est mise en culture à 37°C toute la nuit sous agitation à 300rpm. Le lendemain, 1mL de bactéries transformées est prélevé de la culture bactérienne auquel 150µL de glycérol 100% sont ajoutés. L'ensemble est conservé et stocké à -80°C. Le reste de la culture est utilisé afin d'extraire les plasmides par Mini- ou Mega-préparation.

I-8 EXTRACTION DES PLASMIDES

I-8-1 Extraction « manuelle » d'ADN plasmidique

Les clones sont récupérés et placés dans des tubes contenant 3mL de milieu LB et 300µL d'ampicilline à 10mg/mL. Les tubes sont agités à 37°C toute la nuit afin que les bactéries puissent se développer. Le lendemain, 1,5 mL de ces cultures sont déposés dans des microtubes. Ceux-ci sont centrifugés à 6000g pendant 3 min. Les plasmides sont ensuite extraits manuellement ou à l'aide d'un kit.

Pour l'extraction manuelle, le surnageant est éliminé et le culot repris dans 100µL de solution I, laquelle induira un choc osmotique chez les bactéries.

Réactifs:

Solution I: (GET) 50 mM glucose, 10 mM EDTA pH 8,25 mM Tris-HCl pH 8.0. Cette solution peut être autoclavée ou filtrée et stockée à 4°C.

Solution II: 0.2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS. La solution II doit être preparée extemporanément à partir des solutions de 2 M NaOH et 10 % (w/v) SDS.

Solution III :

Acétate de potassium 5M60 mLAcide acétique11,5 mL

H₂O 28,5 mL

Pour la suite, 200µL de solution II préparé extemporanément sont ensuite ajoutés, puis après avoir mélangé 5 fois par inversion, les tubes sont placés pendant 5 min sur glace. Cette solution permettra la dégradation des protéines membranaires et donc l'expulsion du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire, favorisées par la solution I. Un volume de 50µL de solution III est ensuite ajouté, ce qui permettra la précipitation du chromosome bactérien. Après avoir mélangé 5 s les tubes et les avoir déposés 5 min sur glace, ceux-ci sont

centrifugés à 16500g pendant 5 min. Le surnageant, contenant les ARN et le plasmide, est soigneusement récupéré en veillant à ne pas prendre le précipité blanc, qui contient lui les protéines et le chromosome bactérien. Le surnageant est placé dans un nouveau microtube auquel est ajouté 1 mL d'éthanol froid 100% permettant ainsi la précipitation des petits acides nucléiques (ARN et plasmide). Aucun sel n'est ici ajouté à l'éthanol, dans la mesure où le surnageant contient des restes d'acétate de potassium contenu dans la solution III. Après mélange des tubes par inversion, ces derniers sont placés à -20°C pendant 1 h 30, le froid agissant comme catalyseur et augmentant la vitesse de précipitation de l'ADN. Les tubes sont centrifugés à 16500g pendant 15min et, après élimination du surnageant, 100µL d'éthanol à 75% sont ajoutés au culot afin de nettoyer celui-ci. Après une nouvelle centrifugation à 16500g pendant 5min, le surnageant est éliminé et le culot séché sur bloc chauffant à 37°C pendant 20 min. Les culots sont ensuite repris dans 50 µL d'eau stérile.

I-8-2- Mini-extraction de l'ADN plasmidique

Trois colonies de chaque transformation sont ensuite prélevées pour extraire leur ADN plasmidique. Pour réaliser cette étape, le kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) est utilisé. Les cellules des colonies sont mises en culture toute la nuit à 37°C sous agitation pour permettre d'obtenir un grand nombre de cellules et donc beaucoup de copies de plasmides. Le protocole suivi est celui fourni par le fournisseur.

I-8-3- Mega-extraction de l'ADN plasmidique

Si les mutations souhaitées sont présentes, une extraction massive est réalisée grâce au kit QIAGEN Plasmid Mega.

Pour cela, une pré-culture des cellules transformées est réalisée en inoculant 3 mL de milieu LB/kanamycine avec 300 µL de culture, puis cette culture primaire est incubée environ 8h à

37°C sous agitation. 1mL de cette culture est ensuite dilué dans 500 mL de milieu LB, puis le mélange est incubé toute la nuit à 37°C sous agitation. Les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation à 6000g pendant 15 min à 4°C, puis resuspendues dans 50 mL de tampon P1 (tampon de remise en suspension), dans lequel l'ARNase A a été ajoutée. 50 mL de tampon P2 (tampon de lyse) sont ajoutés et le mélange est homogénéisé en retournant 4 à 6 fois les tubes. Les tubes sont incubés 5 min à température ambiante. Ensuite, 50 mL de tampon P3 refroidi (tampon de neutralisation) sont ajoutés et le tout est mélangé immédiatement en retournant les tubes 4 à 6 fois. Les tubes sont ensuite placés dans la glace pendant 30 min, puis le lysat est nettoyé par filtration. Les colonnes (Qiagen-tip) sont équilibrées en ajoutant 35 mL de tampon QBT, puis le filtrat est appliqué sur la colonne. La colonne est lavée avec 200 mL de tampon QC après que le filtrat soit entré totalement dans la résine. L'ADN est enfin élué avec 35 mL de tampon QF, précipité dans 24,5 mL d'isopropanol et centrifugé à 15000g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est éliminé, puis le culot d'ADN est lavé avec 7 mL d'éthanol 70% et le mélange est centrifugé 10 min à 15000g. Le surnageant est éliminé, puis le culot est séché à l'air pendant 10-20 min. Enfin, l'ADN est dissout dans 500 µL d'eau distillée stérile et stocké à -20°C. Cet ADN plasmidique est prêt à être utilisé pour effectuer les transfections dans les cellules HeLa.

I-9 DIGESTION ENZYMATIQUE

Les enzymes de restriction utilisées sont répertoriées dans le tableau 2. La digestion dure 1h à 37°C avec le tampon adéquat. Le plasmide est digéré par *Nde*I et les inserts soit par *Nde*I , soit par *Bam*HI. Ces deux enzymes de restriction créent des « bouts cohésifs ou collants ».

L'enzyme	Séquence palindromique avec le site restriction
NdeI	CA▼TATG
	GTAT▼AC
BamHI	G▼GATCC
	CCTAG▼G

Tableau 2. Enzymes de restriction utilisées dans la digestion des ADNs

Pour la détection de la présence d'insert dans le minigène, nous avons utilisé des enzymes de restriction qui sont capables de reconnaître spécifiquement un seul site de coupure.

I-10 COMBLEMENT DES EXTREMITES COHESIVES

L'enzyme Klenow de chez SIGMA est utilisée.

1) Préparation de la solution d(AT) contenant les désoxyribonucléotides A et T.

- Dans un tube identifié mettre :

 $\left\{ \begin{array}{l} 10 \mu L \mbox{ de dTTP 100mM} \\ 10 \mu L \mbox{ de dATP100mM} \\ 20 \ \mu L \mbox{ d'eau distillée} \end{array} \right.$

-La concentration finale obtenue est de 25mM pour chaque nucléotide.

2) Action de la Klenow

-Dans un tube identifié mettre : $\begin{cases}
1\mu L de d(AT) \\
0,5 \mu L enzyme Klenow \\
2 \mu L de tampon 10X \\
18 \mu L plasmide pTB clivé
\end{cases}$

-Mettre 1 heure à 37°C

I-11 CREATION D'UN MINIGENE HYBRIDE

I-11-1 Composition du minigène

Comme exemple nous présentons ici le minigène hybride utilisé pour l'analyse de l'épissage alternatif de l'exon 6a et 6b de CFTR (figure 12). Sur le plasmide est présent une partie des séquences des gènes codant pour la globine et la fibronectine. A l'intérieur du troisième intron de ce minigène, un site unique *Nde*l permet le clonage des différentes constructions (dans ce cas l'exon 6a, l'intron 6a et l'exon 6b, cf Figure 12). L' α -globine, la fibronectine, et les exons de CFTR sont présentés comme des boîtes noires et grises. Les flèches superposées indiquent les amorces utilisées dans les expériences de RT-PCR. La transcription est réalisée à partir du promoteur de la α -globine (petite flèche à l'extrémité 5'). Le minigène contient à l'extrémité 3' un site de polyadénylation fonctionnel. Le minigène entier est cloné dans le vecteur pdbS KS (digestions par *Nde*l, puis action de la Klenow pour obtenir des extrémités franches qui permettront une ligature avec l'insert).

I-11-2- Ligature

Afin de réaliser la ligature dans les meilleures conditions possibles, l'insert et le plasmide doivent être présents dans des proportions adéquates. Les quantités respectives de vecteur et d'insert digérés et purifiés sont ajustées pour être dans un rapport moléculaire théorique de 1 pour 3 à 5. Trois rapports de ligation sont réalisés avec les volumes nécessaires de chaque acide nucléique. Les réactions de ligation étaient effectuées comme décrit dans le protocole du fournisseur, dans le milieu réactionnel suivant:

Vecteur digéré	3µL	T4 DNA ligase	1µL
Tampon de ligation 2X	1µL	Eau stérile qsp	$10 \mu L$
Fragment PCR digéré	4µL		

Le mélange réactionnel était incubé 2h à 20°C puis à 4°C toute la nuit.



Figure 12. Représentation schématique du minigène hybride (EDB) utilisé pour l'analyse de l'épissage alternatif de l'exon 6a CFTR et 6b et de ses introns d'accompagnement. L'emplacement de la mutation 876+40A>G est indiquée par une flèche verticale. Les amorces 2,3- α et Bra Rev utilisées dans l'analyse RT-PCR sont indiquées par des flèches horizontales.

Dans cet exemple, la longueur (pdb) des séquences introniques et exoniques est de 1666pdb, et la mutation 875 +40 A>G est présente ou pas en fonction de l'insert utilisé.

1-11-3 Analyse informatique

Les séquences obtenues ont été alignées entre elles à l'aide du programme ClustalW (http://www.ebi.ac.uk). Elles ont ensuite été comparées par le programme Blast (http://www.ebi.ac.uk) afin d'identifier les différentes régions homologues. Le site des enzymes de restriction a été réalisé à l'aide du programme NEB cutter V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php).

I-12 MANIPULATION DE L'ARN

I-12-1 Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du Mini kit QIAGEN RNeasy en suivant les recommandations du fabricant et permet une extraction simple et efficace à partir de cellules isolées. Afin de minimiser la contamination par l'ADN génomique, la préparation est digérée sur colonne par la DNase RNase-free (*QIAGEN*).

L'extraction est réalisée sur des cellules HeLa cultivées dans le milieu de culture DMEM. Les cellules sont lavées directement sur les boites de Pétri en ajoutant 2mL de PBS afin d'enlever les débris cellulaires. Les cellules sont ensuite lysées par la trypsine et transférées dans un tube à centrifuger de polypropylène. Elles sont ensuite centrifugées 5 min à 300 g, puis le surnageant est éliminé par aspiration. Les cellules sont solubilisées en ajoutant du tampon RLT par pipetages successifs. Le lysat est déposé directement dans une colonne placée dans un tube de collection de 2 mL et centrifugé 5 min à 300g. Après cela, un volume d'éthanol 70% est ajouté. 700 μ L de l'échantillon est transvasé dans une colonne placée dans un tube de collection de 2 mL et centrifugé 15 s à 8000 g. Le surnageant est éliminé et 700 μ L de RW1 est ajouté au mélange. Les colonnes sont centrifugées à 8000g pendant 20s pour laver la membrane de la colonne. 500 μ L de RPE sont ajoutés et les colonnes sont centrifugées à 8000g pendant 1min. L'ARN est récupéré après 3min de contact avec 50 μ L d'eau RNase free et centrifugation 1 min à 8000g. L'ARN est ensuite conservé à -20°C pour conservation, une partie est dosée immédiatement après dilution au 1/50 (cf 1-2). Pour déterminer la concentration de l'ARN, la formule suivante est utilisée :

 $[ARN] = A_{260nm} * Facteur de dilution * 40$

I-12-2 Préparation de l'ADN complémentaire (ADNc)

A la suite de l'extraction des ARN totaux, la préparation de l'ADN complémentaire est aussitôt réalisée. En effet, la synthèse d'ADN complémentaire est réalisée immédiatement, pour éviter toute dégradation des ARN totaux, selon la méthode des amorces hexanucléotidiques. Cette synthèse dépend d'une enzyme particulière : la transcriptase inverse. Cette enzyme, produite ici par le virus de la leucémie murine de Moloney (M_MLV), utilise une matrice d'ARN. Le produit ainsi obtenu est une molécule bicaténaire, formée d'une chaîne d'ADN appariée avec l'ARNm, à partir de laquelle une double chaîne d'ADNc sera synthétisée. Tout d'abord, un pré-mélange de tous les réactifs, à l'exception de la transcriptase inverse et de l'inhibiteur de ribonucléase (RNAguard), est préparé à l'avance comme suit :

 Tampon 5X
 5,0μL

 DTT 100mM
 2,5μL

 dNTP 25mM
 1μL

 Hexanucléotides
 1600ng/μL 1,5μL

 H₂O stérile
 2μL

Ce pré-mélange est agité vigoureusement puis 10 μ L d'ARN total fraîchement préparé sont ajoutés aux 12 μ L de cette solution. L'ensemble est incubé 10 minutes à 65°C puis refroidi quelques instants. Sont ensuite ajoutés : RNA guard 40U/ μ L (*Pharmacia*) 1 μ L ; Transcriptase inverse M_MLV 200U/ μ L (*Gibco-BRL*) 2 μ L. Le mélange est incubé pendant 1 heure à 37°C. La réaction se termine par l'addition de 75 μ L d'eau dans le milieu suivie d'une incubation de 2 min à 100°C. Les ADNc ainsi préparés sont stockés à –20°C jusqu'à leur utilisation pour la PCR. Il est possible d'estimer les quantités d'ADNc par spectrophotométrie, comme précédemment (cf I-2).

I-12.3 REVERSE TRANSCRIPTASE PCR (RT-PCR)

L'acronyme RT-PCR signifie Reverse Transcriptase PCR, soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc). En réalité, il s'agit d'une PCR "classique" réalisée sur un ADN complémentaire (ou ADNc), qui est une copie d'un ARN obtenue par une transcription inverse.

La RT-PCR est effectuée dans un thermocycleur (*Applied Biosystem*). L'amplification du minigene pTB/CFTR est effectuée par le couple d'amorce 2,3α/BRA2rev (tableau 4). La composition du mélange réactionnel est la même que pour une PCR classique. Le programme d'amplification est de 35 cycles dans les conditions suivantes :

Amplification standard :

Dénaturation	3 min	à 94°C
Hybridation	2 min	à Tm des amorces
	ſ	Elongation 30 s à 72°C
35 cycle	s {	Dénaturation 30 s à 94°C
	l	- Hybridation 30 s à Tm
Elongation fin	ale	5 min 72°C

Une électrophorèse, en présence du marqueur de taille, sur gel de 1,5% d'agarose et 0,5 μ g/mL de bromure d'éthidium (BET), à 50 V pendant 1 heure permet de contrôler les amplifications. La lecture et l'interprétation du gel se font sur un transluminateur UV, muni d'un appareil à photographier.

Tableau 3 Les oligos sens et a	antisens utilisés
--------------------------------	-------------------

Amorces	Séquences
2,3α	5'-CAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTGC-3'
BRA2REV	5'-AGGGTCACCAGGAAGTTGGTTAAATCA-3'

I-13 LA MUTAGENESE DIRIGEE

Les réactions de mutagenèse dirigée permettent de modifier la séquence connue d'un gène en engendrant des variations nucléotidiques. La méthode de mutagenèse Gene Tailor (*Invitrogen*) permet de créer des mutations ponctuelles en modifiant la nature d'un nucléotide, d'insérer ou de déléter un ou plusieurs nucléotides (Figure 13). Au cours de cette étude, nous avons utilisé le kit *Gene Tailor Site-Directed Mutagenesis (Invitrogen)*.

Cette méthode est basée sur la technique de PCR et utilise les performances de la *Pfu*Turbo DNA Polymerase qui réplique avec une haute fidélité les deux brins d'un ADN plasmidique à partir de deux oligonucléotides synthétiques contenant la mutation à insérer. Ces deux oligonucléotides complémentaires s'hybrident sur chacun des brins du plasmide, puis sont allongés par la PfuTurbo DNA Polymerase qui génère ainsi un plasmide muté.



Figure 13. Méthode de mutagenèse dirigée avec le kit Gene Tailor Site-Directed Mutagenesis (*Invitrogen*).

I-13-1 PLASMIDES UTILISES POUR LA MUTAGENESE

A- PS65T/EGFP-C1/WT-CFTR.

Les plasmides d'expression eucaryote PS65T/EGFP-C1/WT-CFTR codant pour les protéines CFTR sauvage (wt) ou mutée F508del nous ont été généreusement confiés par le Dr. Stanton (Dartmouth University, Dartmouth, USA) ont servi de matrice pour la génération des protéines CFTR modifiées. Pour construire le vecteur d'expression pGFP-CFTR chez les mammifères, l'ADNc humain de CFTR a été excisé du pdbluescript II SK-(*Stratragene*, La Jolla, CA) avec *Ava*I, traité avec le fragment de Klenow pour remplir les extrémités cohésives, et ligaturé dans le plasmide pS65T-GFP-C1 (*Clontech*, Palo Alto, CA) digéré par *Sma*I. Afin d'améliorer la fluorescence de la GFP, l'ADNc a été modifié pour que la protéine synthétisée émette 6 fois plus de fluorescence que la GFP classique (S65TGFP).



Figure 14. Carte de restriction de pS65T/EGFP-C1/WT-CFTR

L'analyse de la séquence d'ADN de la jonction GFP-CFTR a confirmé le cadre de lecture. La protéine de fusion résultante se compose de la GFP en N-ter, une séquence de liaison de 23 acides aminés, et CFTR en C-ter (Figure 14).

Ce plasmide porte le gène qui confère la résistance à la kanamycine.

B- pTCF-wt.

Les plasmides d'expression eucaryote codant pour les protéines CFTR sauvage (wt) ou mutée F508del ont été généreusement cédées par le Dr. Pacale Fanen (CHU Henri Mondour, Créteil, France). Un vecteur plasmidique d'expression dans des cellules de mammifères a été construit en plaçant l'ADNc humain de CFTR et l'ADNc de la GFP sous deux promoteurs différents (Fanen *et al.*, 1999) Le plasmide résultant est désigné pCFTRwt (figure 15). Ce plasmide porte le gène qui confère la résistance à l'ampicilline. La mutagenèse dirigée a été réalisée sur pTCF-wt à l'aide du kit de la mutagenèse dirigée par des oligonucleotides (kit TransformerTM, *Clontech*).



CFTR wt : 1-4483 (ORF : 38-4480) BGH polyadenylation signal : 4536-4750 fl ori : 4813-5226 SV40 promo et ori : 5291-5616 EM-7 promo : 5632-5698 GFP-Zeocin : 5699-6775 (ORF GFP : 5699-6403/ Zeocin : 6404-6775) ColE1 origin : 7418-8091 Ampicillin resistance : 8236-9095 CMV promo : 9442-10096 T7 promo : 10096-10115

Figure 15. Carte de pTCF-wt

I-13-2 LES DIFFERENTES ETAPES DE LA MUTAGENESE

A-Réaction de méthylation

Une étape préalable à la mutagenèse dirigée est nécessaire pour permettre l'élimination des brins parentaux (matrice) qui ne portent pas la mutation. Pour cela, une réaction de méthylation est réalisée avec les réactifs suivants (tableau 5) :

Réactifs	Volumes
ADN (Acide Désoxyribonucléique) plasmidique	100 ng
Tampon de méthylation	1,6 µL
10x SAM (S-adénosylméthionine)	1,6 µL
ADN méthylase (4U/µL)	1 μL
Eau distillée stérile	qsp 16 μL

Tableau 4. Mélange réactionnel pour la réaction de méthylation des plasmides (Kit GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System ; *Invitrogen*).

Ce mélange réactionnel est effectué puis incubé à 37°C pendant une heure avant de procéder à l'étape de mutagenèse dirigée.

B- Réaction de mutagenèse dirigée

L'insertion de la mutation voulue lors de l'étape de mutagenèse dirigée (Kit GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System ; *Invitrogen*) est possible grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques contenant la mutation : deux amorces ont été utilisées pour chaque réaction de mutagenèse. Les nucléotides mutés sont indiqués par des caractères gras et soulignés. Afin de permettre l'amplification en cercle roulant chez la bactérie, l'amorce contient une région double brin de 15-20 nucléotides pour améliorer l'efficacité de l'insertion de la mutation, le site de mutation ainsi que deux régions simple brin de 10 nucléotides s'étendant chacune aux extrémités 3' pour permettre la polymérisation (figure 16).



Figure 16. Schéma de la construction des amorces utilisées dans la mutagenèse dirigée

Le tableau 5 présente les différents couples d'amorces utilisés lors de l'analyse des allèles complexes.

 Tableau 5. Liste des amorces de mutagénèse utilisées pour réaliser les différentes

 mutations

CFTR Mutation	Nucleotide Change	Mutagenesis primer $5' \rightarrow 3'$
D443Y	G to T at 1459	5' GTACTCCTGTCCTGAAA <u>T</u> ATATTAATTTCA 3'
(c.1347G>T, p.Asp443Tyr)		5' TTTCAGGACAGGAGTACCAAGAAGTGA 3'
G576A	G to C at 1859	5' TTAGACTCTCCTTTTG <u>C</u> ATACCTAGATGTT 3'
(c.1727G>C, p.Gly576Ala)		5'CAAAAGGAGAGTCTAATAAATACAAAT 3'
R668C	C to T at 2134	5' AACTGAGACCTTACAC <u>T</u> GTTTCTCATTAG 3'
(c.2002C>T, p.Arg668Cys)		5' GTGTAAGGTCTCAGTTAGGATTGAATT 3'
G149R	G to A at 577	5' GGCCTTCATCACATT <u>A</u> GAATGCAGATGAG 3'
(c.445G>A, p.Gly149Arg)		5'AATGTGATGAAGGCCAAAAATGGCTG 3'

Pour permettre cette réaction, le mélange réactionnel suivant est réalisé (tableau 6) :

Tableau 6. Mélange réactionnel pour la mutagenèse dirigée

Réactifs	Volumes
Tampon 10x High Fidelity PCR	5,0 µL
10 mM dNTP (désoxyribonucléotide)	1,5 µL
50 mM MgSO ₄	1,0 µL
Amorces (10 μ M de chaque)	1,5 µL
ADN méthylé (12,5-31,25 ng)	2 - 5 μL
Platinum [®] <i>Taq</i> High Fidelity (5U/µL)	0,2-0,5 μL
Eau distillée autoclavée	qsp 50 μL

Les tubes sont ensuite placés dans le thermocycleur pour subir 20 cycles de PCR (Polymerase Chain Réaction), ce qui va permettre d'augmenter fortement le nombre de copies du plasmide. Le programme utilisé pour cette PCR est (tableau 7) :

Tableau 7. Conditions de PCR

Température	Temps	Nombre de cycles
94°C	2 min	1
94°C	30 s	
55°C	30 s	→ 20
68°C	10 min	
68°C	10 min	1

Les produits de PCR sont conservés à -20°C en vue de leur utilisation pour transformer les bactéries (*E. coli* DH5 α) compétentes (cf I-7).

I-14.SEQUENÇAGE

La technique de séquençage utilisée est adaptée de celle décrite par Sanger et *al.* (1977). La réaction de séquençage est effectuée par un séquenceur automatique. Quatre réactions de PCR sont menées parallèlement en présence d'une des quatre bases marquées par un fluorochrome spécifique sous forme de didésoxyribonucléoside triphosphate en très faible concentration et d'un seul « primer » qui va déterminer le sens du séquençage. La migration sur gel des produits de séquence fluorescents permet la séparation de deux intermédiaires consécutifs ayant une taille qui diffère d'un seul nucléotide. Un logiciel d'analyse, détecte le fluorophore présent à l'extrémité du fragment.

Les amorces sens et reverse utilisées pour les différentes séquences étudiées sont présentées ci-dessous.

1) Etude de la mutation D443Y (G>T) Exon 9

PCR avec [MgCl₂]=1,5mM et gel agarose 1,5% Amorce sens exon 9 (HPCF 9A) 5'[TGGGGAATTATTTGAGAAAG]3' Tm 54°C Amorce réverse exon 9 (CF9C) 5'[TGCCTGCTCCAGTGGAT]3' Tm 54°C Taille du fragment=**176pdb**

2) Etude de la mutation G576A (G>C) Exon 12

*Exon 11/*Exon 12/ une partie d'Exon 13 PCR avec [MgCl₂]=1,5mM et gel agarose 1,5% Amorce sens exon 11 (E11S) 5'[ACATCTCCAAGTTTGCAGAG]3' Tm 58°C Amorce réverse exon 13 (E13R) 5'[AATAGCTGCTACCTTCATGC]3' Tm 58°C Taille du fragment=291pdb GACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGTGGAATC ACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAG<u>AGCAGTATACAAA</u> <u>GATGCTGATTTGTATTTATTAGACTCTCCTTTTGCATACCTAGATGTTTTAAC</u> <u>AGAAAAAGAAATATTTGAAAG</u>CTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAAACTAG GATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAAGCTGACAAAATATTAATT TTGCATGAAGGTAGCAGCTATTTT

3) Etude de la mutation R668C (C>T) Exon 13

Une partie <u>Exon 13</u> PCR avec [MgCl₂]=1,5mM et gel agarose 1,5% Amorce sens exon 13 (E13S) 5'[CTACAGCCAGACTTTAGCTC]3' Tm 60°C Amorce réverse exon 13 (HPCF13Ar)5'[GGATTGAGAATAGAATTCTTCC]3'Tm 60°C Taille du fragment= **206pdb**

4) Etude de la mutation G149R (G>A) Exon 4

Exon 4 et une partie exon5 PCR avec [MgCl₂]=1,5mM et gel agarose 1,5%

Amorce sens exon 4(Ex4Sens) 5'[AGTCACCAAAGCAGTACAGC] 3' Tm 60°C. Amorce réverse exon 5(EX5Rev) 5'[TCTAGAACACGGCTTGACAG] 3'Tm 60°C Taille fragment=**243pdb**

GAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTGGGAAGAATCATAGCTTCCT ATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGG CTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTGCTCCTACACCCAGCCATTTTG GCCTTCATCACATT GGAATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTAT AAGAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGTGTTCTAGA CTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGAACAAATTTGATGAA

II- MATERIELS ET TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

II-1 CULTURE CELLULAIRE

Les cultures cellulaires sont très sensibles aux contaminations. L'environnement expérimental (locaux et matériel) doit assurer les conditions indispensables de stérilité. La pièce dédiée à la culture cellulaire est précédée d'un sas. La manipulation des cellules s'effectue sous une hotte à flux laminaire et tout le matériel utilisé est stérile et à usage unique.

Les lignées cellulaires sont cultivées à 37°C en présence d'une atmosphère de 5% de CO₂ dans un milieu de culture DMEM + Glutamax-1 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, *Life Technologies*) contenant de la pénicilline à 100 UI/mL et de la streptomycine à 100 µg/mL afin d'éviter les contaminations bactériennes. Les milieux de culture sont renouvelés tous les 2 jours pour éviter leur appauvrissement et pour éliminer les cellules mortes. Le milieu contient en plus 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (à 56°C pendant 30 min). La récolte nécessite d'enlever le milieu de culture et de laver les cellules au PBS (Phosphate-Buffered Saline), afin d'éviter toute inhibition de l'action de la trypsine par des éléments du sérum. Les cellules sont ensuite recouvertes d'un volume de trypsine (2mL) et incubées à 37°C pendant 5min. La réaction est arrêtée par ajout de quatre volumes de milieu de culture. La suspension est centrifugée 5 min à 500g. Les cellules peuvent alors être repiquées en reprenant le culot dans le milieu de culture et en les redistribuant dans les boites à la dilution adéquate.

II-1-1 PRESENTATION DES LIGNEES CELLULAIRES

Trois types cellulaires ont été étudiés. Les cellules HeLa ont été utilisées lors de l'ensemble des techniques cellulaires. Les deux autres types cellulaires (HT29 & HEK293) ont été testés

uniquement lors des techniques d'épissage. Ces cellules étaient cultivées en routine pour d'autres expériences, ce qui explique que nous avons pu facilement les obtenir.

A- Cellules HeLa

Les cellules HeLa, lignée établie d'un adénocarcinome du col utérin ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide 95% /5% CO₂ dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM Gibco) complémenté en Sérum de veau foetal (SVF, 10%) et Antibiotiques (Pénicilline 100 U/mL, Streptomycine 0,1mg/mL).

B- Cellules HT29

Les cellules HT29 sont des cellules humaines de cancer du colon isolées à partir d'une tumeur primaire. La lignée est décrite comme un adénocarcinome du colon humain modérément différencié de grade II. En 1984, Augeron et Laboisse ont décrit l'émergence d'un clone cellulaire différencié de façon permanente à partir de traitement des cellules HT29 par du butyrate de sodium, notamment le clone 19A (Augeron et Laboisse, 1984).

C- Cellules HEK293

Les cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney) sont dérivées d'une lignée cellulaire adhérente (ATCC : CRL 1573), qui a été adaptée à la suspension dans du milieu sans sérum (Côté *et al.*, 1998). La lignée HEK-293 3F6 utilisée pour cette étude a été générée à partir d'un tube de la Banque maitresse (MCB) et certifiée suivant les Bonnes Pratiques de Laboratoires (Good Manufacturing Practices). Ces cellules, référées comme cellules HEK293, sont cultivées en suspension, dans du milieu SFM4TransFx-293 (HyQ), sans sérum et sans composé d'origine animale (HyClone, Waltham, MA, USA).

II-1-2 ENTRETIEN DES LIGNEES CELLULAIRES

Les cellules doivent faire l'objet d'un suivi régulier. Le milieu de culture de culture doit être changé régulièrement afin de fournir les nutriments aux cellules en croissance. L'acidification du milieu est visualisée par la présence d'un indicateur coloré, le rouge de phénol, qui vire du rouge au jaune.

A- Réactifs et milieu de culture

Réactifs :

Tous les réactifs cités ci-dessous sont distribués par *GIBCO Invitrogen* à l'exception des antibiotiques qui sont commercialisés par *Panpharma SA*. Les deux antibiotiques sont fournis sous forme de poudre. Ils se conservent à + 4°C avant reconstitution et sont réhydratés avant l'emploi.

- •Pénicilline G : 1 000 000 UI par flacon.
- Streptomycine : 1 g par flacon.
- PBS (1X) pH: 0,2g/l KCl; 0,21g/l KH₂PO_{4;} 8, 00 g/l Na Cl; 1, 15 g/l Na₂HPO4.7H₂O
- Trypsine-EDTA (1X): Trypsine 0, 25%; EDTA 1mM; (sans Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺). Réactif congelé prêt à l'emploi.
- SVF : Sérum de veau Fœtal non décomplémenté. A conserver à 20°C
- D-MEM : Milieu d'Eagle Modifié par Dulbecco (1X). Milieu de culture à conservé à +4°C.

Description et préparation du milieu D-MEM :

Le D-MEM utilisé contient en plus des vitamines, minéraux et acides amines indispensables, un dipeptide, la L-Alanyl-L-Glutamine qui est la forme stabilisée de la L-Glutamine. Contrairement à la L-Glutamine, le dipeptide ne se dégrade pas en milieu aqueux. D-MEM supplémenté utilisé pour les cultures :

- 500 mL D-MEM
- 50 mL de SVF (décomplementé 30 minutes à 56°C, 10%)
- 0,5 mL de Pénicilline G à 100 UI/ mL
- 0,5 mL de Streptomycine à 100 μ g/ mL

B- Décongelation des lignées cellulaires

Le DMSO (Diméthylsulfoxyde), utilisé pour son efficacité cryo-protectrice lors de la congélation des cellules, est toxique pour les cellules à 15°C. Il est donc indispensable que l'étape de décongélation soit effectuée avec rapidité. L'ampoule contenant les cellules est sortie de l'azote liquide et décongelée rapidement. 10mL de milieu est ajouté et le tout est centrifugé 5 min à 350g. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par 10 mL de milieu supplémenté. Cette suspension contenant 5.10⁶ cellules est mise en culture dans une boite de Pétri de 10cm de diamètre.

C- Conditions d'incubation

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère saturée en eau et contenant 5% de CO₂.

D- Surveillance des cultures

Tous les jours les boites sont observées au microscope inversé afin de vérifier l'état des cellules. Le jour suivant un repiquage on vérifie l'adhérence des cellules au support. Par la suite, on surveille journellement leur multiplication par l'envahissement progressif de la surface. Durant le contrôle journalier, on s'attache également à vérifier la non contamination du milieu par des bactéries ou des levures. Tous les 2 jours le milieu de culture est remplacé

par 10mL de milieu supplémenté. La confluence est obtenue au bout d'une semaine de culture pour les 3 lignées cellulaires.

E- Entretien des cultures cellulaires

A l'état de confluence, la multiplication cellulaire s'arrête par inhibition de contact. Avant cela, les cellules doivent donc faire l'objet soit d'une remise en culture soit d'une congélation pour un usage ultérieur. A partir d'une culture cellulaire à l'état de confluence, on effectue une trypsination pour décoller les cellules de leur support et les disperser. Le milieu est aspiré puis les cellules sont lavées deux fois avec 10mL de PBS pour éliminer toute trace de SVF qui inhiberait l'action de la trypsine. On surveille régulièrement au microscope inversé le décollement cellulaire qui se produit sous l'action de 2mL de trypsine à 37°C pendant environ 5min. La dissociation cellulaire est achevée par l'action mécanique d'aspirations et refoulements successifs. L'activité de la trypsine est arrêtée en ajoutant 8mL de milieu supplémenté. La mise en culture s'effectue en transférant 200 µL de cette suspension dans une nouvelle boite de Pétri contenant 10 mL de milieu supplémenté. Les cellules sont dispersées en agitant doucement les boites sur la paillasse.

F- Congélation des cellules eucaryotes

Après lavage au PBS, décrochage des cellules adhérentes par la trypsine à 0,05% et resuspension de ces cellules dans du milieu de culture, celles-ci sont centrifugées 2 min à 2000g à température ambiante. Le culot cellulaire est alors resuspendu dans le milieu de congélation suivant : 10% DMSO (Diméthylsulfoxyde) (*Sigma-Aldrich*, France), 20% SVF, et 70% milieu DMEM. Les cellules sont par la suite placées successivement pendant 4h à - 20°C, puis transférées à -80°C pendant au moins 1 jour et finalement stockées indéfiniment dans de l'azote liquide (-180°C).
II-2 TRANSFECTION TRANSITOIRE DES CELLULES

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, *Invitrogen*). Ainsi, les complexes ADN-liposomes seront réalisés selon le rapport suivant pour un puits : 4 μ g d'ADN plasmidique pour 10 μ L de lipofectamine. L'ADN est dilué dans 250 μ L de milieu Opti-MEM sans sérum de culture dans un premier tube pendant 5min et la lipofectamine sera diluée dans un second tube avec également 250 μ L de milieu de culture non complémenté ; les deux tubes sont ensuite rassemblés afin de former les complexes liposomes-ADN durant 15 minutes à température ambiante. Puis les complexes sont ajoutés à chaque puits et la plaque est agitée doucement. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C dans un incubateur CO₂ entre 18 et 48h.

II-3 IMMUNOLOCALISATION CELLULAIRE

La technique d'immunofluorescence indirecte permet de localiser une protéine dans un tissu ou une cellule à l'aide d'un anticorps primaire spécifique puis un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome reconnaissant la région constante (Fc) de l'anticorps primaire. La fluorescence est ensuite détectée par microscopie classique ou confocale.

II-3-1 IMMOBILISATION DES CELLULES : fixation au paraformaldéhyde (PFA)

Chacune des lamelles de verre, côté cellules adhérentes, est rincée 3 fois au PBS 1X pendant 3min à raison de 2mL/lamelle. Afin de fixer les structures biologiques des cellules, celles-ci sont traitées par 1mL de PFA (paraformaldéhyde) 4% pendant 10min à température ambiante.

<u>PFA 4% :</u>

PFA 4g PBS 1X 100mL Ajuster à pH 7

II-3-2 COLORATION DES NOYAUX

Après l'étape de fixation, les cellules sur lamelles sont lavées 2 fois 3min au PBS 1X, puis 1mL de 0,1% PBS-Triton X-100 est déposé sur chacune des lamelles. Ce traitement est appliqué durant 10min, suivi de 3 lavages de 3min au PBS 1X. Le Triton étant un détergent, il induit des perforations au niveau de la membrane plasmique des cellules engendrant leurs perméabilisations. L'étape clé pour visualiser les noyaux consiste à colorer ces derniers par 50µL de TO-PRO -3 iodide (*Invitrogen*), préalablement dilué au 1/1000 dans du PBS 1X, durant un temps d'application de 15min. Très succinctement, le TOPRO-3 iodide donne une coloration forte et spécifique des noyaux cellulaires où il se lie à l'ADN en s'intercalant entre les bases. Le TO-PRO -3 iodide s'observe dans le rouge lointain avec une raie d'excitation à 633nm et son émission de fluorescence est récupérée entre 640 et 690nm. Après avoir rincé les cellules successivement par 1mL de PBS 1X puis 1mL d'H2O distillée pendant 5min, la dernière étape nécessite d'apposer la lamelle côté cellules sur une lame de verre ou lame porte objet à l'aide de 5µL/lamelle de Vectashield (*CliniSciences*). Les lamelles sont enfin scellées par du vernis. Une fois le montage effectué, les lames sont stockées à 4°C à l'abri de la lumière. L'analyse des lames a été effectuée par l'intermédiaire d'un microscope à fluorescence dans le service de microscopie confocale.

II-3-3 MARQUAGE IMMUNOLOGIQUE

A-Fixation et perméabilisation des cellules

Pour les expériences d'immunolocalisation, les cellules sont cultivées sur des lamelles de 12 mm de diamètre. Les cellules exprimant les protéines CFTR sauvage, mutée F508del et modifiées sont dans un premier temps fixées pendant 20 min à température ambiante par du paraformaldéhyde à 4% (*Sigma-Aldrich*, France). Les cellules sont ensuite perméabilisées avec 0,2% de triton X-100 pendant 5 min puis les sites sont saturés pendant 1 h avec du tampon de blocage (0,5% BSA dans du PBS).

B-Incubation avec les anticorps primaire et secondaire

Apres saturation des sites de fixation non spécifique à l'aide d'une solution BSA 1%, les cellules sont mises en présence de l'anticorps primaire. Les incubations successives avec l'anticorps primaire anti-ER et anti-p58K (1h à 4°C) et l'anticorps secondaire de souris couplé à l'Alexa 488 (*Invitrogen*, France) nous permet de détecter au niveau cellulaire le complexe anticorps antigène fluorescent. La lamelle est ensuite montée sur une lame à l'aide du milieu de montage (Vectashield® with Dapi, *Abcys*, France). Le microscope confocal à balayage laser nous a permis de visualiser les complexes protéiques d'intérêt marqués au niveau cellulaire. La technique d'imagerie confocale à fluorescence permet d'obtenir des images de grande résolution de l'échantillon grâce à une projection sur l'axe Z. Le système disponible au

sein de l'institut est un microscope Leica TCS SP2. Cette unité est couplée à un microscope équipé d'un objectif 63× à immersion à huile. Le système possède deux lasers : un UV et un Argon permettant d'obtenir 8 raies d'excitation (351, 354, 458, 476, 488, 514, 543 et 633 nm), couvrant ainsi tout le spectre d'excitation. L'acquisition de la fluorescence, la reconstitution des images et les échelles sont données par le logiciel contrôlant l'unité centrale : *Leica confocal software (Leica*, France). La figure 17 représente le principe de l'immunofluorescence indirecte.



Figure 17. Schéma représentant le principe de l'immunofluorescence indirecte. 1- Si l'on veut détecter une substance X non soluble (donc fixée) dans la cellule, on l'utilise comme un antigène en l'injectant à un lapin. Celui réagit en fabriquant des anticorps (immunoglobulines) anti-X. 2-Sur la préparation cellulaire, les anticorps anti-X se fixent spécifiquement sur X. 3- On pourrait fixer une molécule de fluorescéine directement sur ces anticorps mais il est plus aisé d'utiliser des anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin soudés à une molécule de fluorescéine. 4-Sur la préparation cellulaire, les anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin soudés à une molécule de fluorescéine. 4-Sur la préparation cellulaire, les anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin soudés à une molécule de lapin se fixent spécifiquement sur les anticorps de lapin anti-X. 5-Observée en lumière ultraviolette, la fluorescéine fixée fluoresce en vert et permet de localiser la substance X. Remarque : de nombreux tests sont nécessaires pour éliminer toute fixation non spécifique. (www.snv.jussieu.fr/bmedia/Mitose/42fluoverte.htm).

III- TECHNIQUES DE BIOCHIMIE

III-1 WESTERN BLOT ANALYSIS

III-1-1 Extraction des protéines

Les lysats cellulaires sonts réalisés selon le protocole suivant : après 3 rinçages au PBS, les cellules sont mises en suspension par grattage dans 400µL de tampon de lyse : Tris-HCl (pH 7,5) 50mM, EDTA 1mM, Na Cl 100Mm, Triton X-100 0,5%, le cocktail d'antiprotéases (Roche). Le tout est récupéré, puis incubé 30 min et centrifugé à 4°C pendant 10 à 16500g. Le surnageant est récupéré et dosé par spectrophotométrie (cf III-1-2).

III-1-2 Dosage protéique

La quantité de protéines dans les lysats est mesurée par spectrophotométrie par la méthode de l'acide bicinchonidique (BSA). Celle-ci permet la détermination de la quantité de protéines de 10 à 50 μ g. Le réactif se compose d'un volume de solution B (CuSO₄, 5H₂O 4%) et de 50 volumes de solution A (sel dissodique d'acide bicinchoninique 1%, Na₂CO₃, (1H₂O) 2%, tartrate dissodique 0,16%, NaOH 0,4%, NaHCO₃ 0,95% pH 11,25). Les échantillons à doser sont préparés en prenant 10 et 20 μ L de lysats, complétés à 100 μ L avec de l'eau, auxquels sont ajoutés 1 mL de réactif final. Les tubes sont incubés pendant 30 min à 37°C. Une gamme étalon est réalisée en parallèle et l'absorbance des échantillons est lue à 562 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

III-1-3 Western Blot

A- Préparation des gels de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide est préparé. Il est composé de deux gels, un gel de séparation et un gel de concentration qui est coulé sur celui de séparation entre deux plaques (une plaque de verre et une plaque d'alumine). Le gel de séparation utilisé ici est un gel à 5% de polyacrylamide (composition dans le tableau 8). Une fois ajoutés 150µL d'APS 10% (péroxodisulfate d'ammonium) et 10µL de Temed (TétraMéthylEthylèneDiamine), le gel est coulé rapidement et de l'isopropanol est déposé à la surface du gel pour qu'il polymérise bien droit.

Component	Gel of séparation	Gel of concentration
H ₂ O	2,5 mL	1,3 mL
Bis-Acrylamide 30%	0,5 mL	0,2 mL
Tampon de séparation 4X	1 mL	
Tampon de concentration 4X		0,5 mL
Temed	4 μL	2 μL
APS 10% (Ammonium	40 µL	20 µL
Persulfate)		

Tableau 8. Composition des gels de polyacrylamide.

Après polymérisation du gel de séparation, le gel de concentration est préparé avec, pour 15 mL, 1,5 mL d'Acrylamide 40%, 3,75 mL de tampon de concentration, 9,75 mL d'eau, 200µL d'APS et 15µL de Temed. Un peigne est déposé rapidement, en évitant la présence de bulles, pour former les puits de dépôt des échantillons. Lorsque le gel est polymérisé, les échantillons

et un marqueur (Protein Marker, Precision Plus Protein Standards, Kaléidoscope, *Bio-Rad*) sont déposés dans les puits et soumis à un courant de 300 V et 30 mA jusqu'à ce que le front de migration bleu arrive en bas du gel. Après migration, le gel est coloré au bleu de Coomassie pour révéler la présence des protéines, puis le surplus de coloration est enlevé avec une solution de décoloration.

B- Electrophorèse sur gel

Les échantillons protéiques sont mélangés avec un volume égal de tampon de dénaturation 2X de Laemmli et incubés à 37°C durant 20min, avant d'être déposés sur gel. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) est réalisée suivant la technique de Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) en utlisant un gel de concentration à 4% et un gel de séparation à 7 ou 10% en fonction de la masse de la protéine étudiée. Le montage est effectué dans un dispostif MiniproteanIIII^R (BioRad). La composition du tampon de Laemmli est proposée dans le tableau 9. La migration a lieu à 34 mA et est suivie à l'aide d'une marqueur de poids moléculaire coloré (*BioRad*).

Tableau 9. Tampon 2X de Laemmli			
Tris-HCl (pH 6,8)	62,5mM		
SDS	2,3%(p/v)		
α-aminothioglycérol	5%(v/v)		
Glycérol	15%		
Bleu de bromophénol	0,001%(p/v)		

C-Electrotransfert de SDS-PAGE

La première étape est une électrophorèse sur gel de polyacrylamide comme décrit précédemment. Ensuite, les protéines contenues dans le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par application d'un courant électrique. Les protéines se fixent à la membrane grâce à des interactions hydrophobes et ioniques. Un montage en «sandwich» est réalisé : le gel est placé sur une feuille de papier buvard, puis il est recouvert de la membrane qui, elle-même, est recouverte par du papier buvard, le tout est imprégné de tampon de transfert et placé entre deux plaques de mousse. La membrane est placée du côté positif et le gel du côté négatif de la cuve à électrotransfert. Le transfert est effectué à 200mA pendant environ 1 heure. Après transfert, la membrane est lavée trois fois 5 min dans du PBS-Tween 0,1%.

Composition du tampon de transfert :

Tampon d'électrophorèse de Laemmli (Tp 10X)	250mL
Éthanol 100%	1L
H ₂ O	3,750L

Les sites non spécifiques de la membrane sont saturés par du lait. Puis elle est incubée en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Elle est ensuite lavée plusieurs fois dans du PBS-Tween 0,1% et un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dirigé contre la premier est ajouté. La réaction se produit pendant une heure. Après lavage, la révélation enzymatique par chimiluminescence de la protéine d'intérêt est effectuée grâce au kit *ECL (Enhanced Chemiluminescence) Advance Western Blotting (Amersham)*.

D- Détection immunologique des protéines

La détection de la protéine d'intérêt, CFTR, est permise grâce à l'utilisation d'anticorps primaire et secondaire spécifiques et du kit de détection ECL. Après le transfert, la membrane est lavée trois fois 5 min avec du PBS-Tween 0,1%, puis celle-ci est incubée 1h dans du PBS-Tween 0,1%-Blocking Reagent 2%, afín de saturer la membrane et d'empêcher la liaison des anticorps à des cibles non-spécifiques. La membrane est encore lavée trois fois avec du PBS-Tween 0,1%, puis elle est incubée 1h dans l'anticorps primaire, anti-CFTR de souris (M3A7, *Chemicon*), dirigé contre les acides aminés 1197-1480 (Farinha *et al.*, 2004) et dilué au 1/1000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-Blocking Reagent 2%. Pour la β-Actine, l'anticorps 18-0054 de chez *Zymed* développé chez le lapin est utilisé. Les anticorps secondaires utilisés sont des anticorps primaire : IgG de lapin Anti-Souris et IgG de chèvre Anti-Lapin dilué au 1/10000^{ème} dans du PBS-Tween 0,1%-Blocking Reagent 5%. Les anticorps utilisés sont présentés dans le tableau 10. La membrane est lavée trois fois pour diminuer le bruit de fond et permettre une meilleure révélation.

Le principe de la révélation est simple : une molécule contenue dans les solutions du kit de révélation réagit avec la peroxydase, couplée à l'anticorps secondaire, ce qui entraîne la formation d'un composé excité qui libère alors son énergie sous forme lumineuse. Cette émission est captée par un film autoradiographique. Cette étape de révélation commence par l'incubation de la membrane dans un mélange des solutions de détection A et B (1:1) pendant 5 min. Puis la membrane est placée dans du Saran, qui est bien étiré pour éviter tout pli, dans une cassette en contact avec un film autoradiographique entre 15 s et 5 min, selon l'intensité du révélateur. Le film est ensuite plongé dans un bain de révélateur, puis de fixateur.

Tableau 10. Liste des différents anticorps utilisés pour l'étude.

Anticorps	Fournisseur
Monoclonal mouse anti-human CFTR, M3A7	Chemicon
Anticorps secondaire de souris couplé à la peroxydase	Sigma
Anti Actin	Sigma

IV- TECHNIQUE ELECTROPHYSIOLOGIQUE

IV-1 Mesure du potentiel membranaire

La mesure de l'activité CFTR a été évaluée par imagerie de fluorescence sur cellules isolées, en utilisant une sonde fluorescente sensible aux variations du potentiel membranaire appelée oxonol.

IV-1-1 Principe de la sonde oxonol

La sonde oxonol (Figure 18) ou bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid)trimethine oxonol ([DiSBAC₂(3)] Molecular Probes, Eugene, OR) est une sonde fluorescente sensible aux variations du potentiel membranaire.



Figure 18: Structure de la sonde [DiSBAC₂(3)].

L'oxonol est une sonde chargée négativement. Elle est capable d'entrer dans les cellules dépolarisées et de se lier aux protéines membranaires intracellulaires. L'augmentation de la quantité d'oxonol dans la cellule provoque une augmentation de la fluorescence émise. A l'inverse, l'hyperpolarisation, induit une diminution de la quantité d'oxonol dans la cellule et donc une diminution de la fluorescence.

La longueur d'onde d'excitation de la sonde oxonol se situe à 546 nm et celle d'émission à 580 nm. La fluorescence augmente lorsque la membrane est dépolarisée et inversement, la fluorescence diminue lorsque la membrane est hyperpolarisée.

IV-1-2 Protocole de charge

Pour faciliter le transport de Cl⁻, les cellules sont incubées pendant 20 minutes à température ambiante dans une solution de Krebs (Tableau 11) dépourvue de Cl⁻ et contenant 250 nM d'oxonol, elles sont ensuite disposées dans un support adapté sous le microscope confocal.

Krebs sans Cl ⁻				
Na gluconate	101 mM			
K acetate	5 mM			
Ca gluconate	2 mM			
Mg acetate	2 mM			
Mannitol	50 mM			
Glucose	5 mM			
Hepes-Tris	5 mM			
рН	7.4			

Tableau 11. Composition de la solution de Krebs sans Cl.

IV-1-3 Analyse des résultats

La mesure d'oxonol est réalisée grâce à une station de microscopie confocale (FV1000, Olympus) équipée d'un microscope inversé à fluorescence (IX-81, Olympus). L'acquisition des signaux et le traitement des images sont réalisés à l'aide du logiciel d'acquisition Fluoview v1.6. L'acquisition se fait à température ambiante et la fluorescence basale est enregistrée pendant 3 minutes avant l'addition de la drogue. Le système d'acquisition permet la sélection des différentes cellules au sein d'un même champ cellulaire. Les variations de fluorescence au sein de chaque zone sont retransmises sous forme d'intensité de fluorescence en fonction du temps. Les résultats sont présentés en pourcentage de variation de la fluorescence (Fx) selon l'équation : $F_x = ([F_t - F_o]/F_o) x 100$ ou F_t et F_o sont respectivement l'intensité de fluorescence à un temps t et au temps t_0 correspondant à l'addition de la drogue sur les cellules (Figure 19). Les résultats sont exploités sous le logiciel Origin 5.0.



Figure 19. Tracés et images XY représentant l'évolution de fluorescence de la sonde $[DiSBAC_2(3)]$ en fonction du temps suite à l'application d'un agoniste et d'un inhibiteur.

RESULTATS & DISCUSSIONS

Le fil conducteur de l'ensemble de ces travaux concerne les mutations de l'exon 9 dans le gène *CFTR*.

Au fur à mesure des résultats, nous déroulons le fil de la connaissance des mutations authentiques de cet exon avec la découverte de deux pseudo-mutations dans l'intron 9 à l'aide d'un nouveau protocole spécifique de diagnostic moléculaire (première partie, cf articles 1 & 2).

Puis l'analyse de la mutation D443Y (exon 9) découverte lors de cette première étude associée avec d'autres pour former un allèle complexe a permis la détection de trois allèles complexes et d'étudier leurs impacts physiopathologiques (localisation, maturation & fonctionnalité) : l'un de ces allèles complexes provoque la mucoviscidose tandis que les deux autres sont associés à des CFTR-RD. Cette corrélation entre génotype et phénotype a été confirmée par la collection de l'ensemble des résultats obtenus à partir de différents CHU français (seconde partie, cf article 3).

Enfin, lors de la première étude sur l'épissage de l'ARNm de *CFTR*, l'effet de la mutation K464N (modification du dernier nucléotide de l'exon 9) a été initié car cette mutation est fortement suspectée de provoquer la mucoviscidose au vu des résultats cliniques. Lors de cette troisième partie, nous avons aussi travaillé sur une autre variation 875 +40A>G dans l'intron 6a, qui semble provoquer une pancréatite grave chez un patient alors que ses gènes de pancréatite ne sont pas affectés, suggérant l'implication du gène *CFTR* (troisième partie, cf article 4). Ce sont seulement les résultats obtenus avec la seconde mutation que nous détaillons dans ce mémoire puisque nous n'avons pas encore obtenu des clones possédant l'information correcte au niveau de l'exon 9.

I- Etude de l'impact des duplications de l'exon 9 et des régions adjacentes sur le diagnostic des mutations du gène *CFTR*

I-1- Contexte de travail

Le dépistage des mutations de l'exon 9 de *CFTR* est difficile en raison du polymorphisme de la séquence (TG)m (T)n répétée située à l'extrémité 3' de l'intron 8. Du fait de ces variations, l'utilisation des techniques basées sur la PCR ou la DHPLC pour la détection des mutations dans cette région est difficile. Ainsi, si la DHPLC est réalisée, il est nécessaire d'utiliser des amorces qui sont en aval du site polymorphe (Le Marechal *et al.*, 2000). Par cette méthode, cependant, seulement la séquence à partir de l'exon 9 est amplifiée. Comme cette séquence du gène *CFTR* a été dupliquée dans plusieurs régions du génome, nous suggérons que l'utilisation de ces amorces classiques pourrait conduire à une mauvaise identification des mutations. Au cours de notre travail, nous avons analysé deux cas (cf annexes). Nous démontrons ainsi que les anomalies techniques menant à un diagnostic moléculaire incorrect sont dues à l'utilisation des amorces utilisées dans le protocole de PCR.

Aucune étude présentant l'impact des homologies de séquences entre l'exon 9 de *CFTR* (codant pour une partie du premier domaine de fixation des nucléotides) et des séquences homologues, n'avait été réalisée. Étant donné que les méthodes traditionnelles pour l'amplification de cette séquence seraient réalisées sur plusieurs régions extragéniques et extrachromosomiques, nous définissons ici les conditions qui doivent être utilisées pour étudier exclusivement cette région de *CFTR*. Notre objectif est de réévaluer les mutations décrites dans la base de données comme soit des pseudomutations dans les régions dupliquées du génome, soit de vraies mutations.

I-2- Contexte bibliographique

Des études antérieures du gène *CFTR* ont signalé que l'exon 9 et ses séquences adjacentes sont présents en de multiples copies dans le génome humain. En effet, cette région est une partie d'une grande unité de séquence dupliquée, nommée LCR7-20. Ces séquences sont dispersées sur des chromosomes différents dans le génome humain (Rozmahel *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 2004), et contiennent une séquence homologue à un rétrotransposon de la famille LINE- 1 (long interspersed nuclear elements-1), ce qui pourrait expliquer l'origine des réarrangements (Rozmahel *et al.*, 1997). L'analyse des fragments de restriction a montré une trentaine de copies de séquence LCR7-20 (Liu *et al.*, 2004). Au cours de notre étude, nous avons identifié une région de 647 pdb contenant l'exon 9 et ses régions adjacentes présente dans le génome humain en seulement 7 copies ; l'analyse et la comparaison des séquences ont été réalisées en utilisant les programmes ClustalW et Blast (El-Seedy *et al.*, 2009).

I-3- Articles & Communications

ARTICLE 1 : <u>Influence of the Duplication of *CFTR* Exon 9 and its Flanking</u> <u>Sequences on Diagnosis of Cystic Fibrosis Mutations</u>

ARTICLE 2 : <u>Consequences of partial duplications of the human *CFTR* gene on CF diagnosis: mutations or ectopic variations</u>

Communication affichée: Brest

Communication Orale (invitation): Reims

Diagnosing Mutations in the *CFTR* Exon 9 (Publications No. 1 et 2)

Article 1

Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 11, No. 5, September 2009 Copyright © American Society for Investigative Pathology and the Association for Molecular Pathology DOI: 10.2353/moldx.2009.090005

Consultations in Molecular Diagnostics

Influence of the Duplication of *CFTR* Exon 9 and Its Flanking Sequences on Diagnosis of Cystic Fibrosis Mutations

Ayman El-Seedy,* Tony Dudognon,* Frédéric Bilan,*[†] Marie-Claude Pasquet,[†] Marie-Pierre Reboul,[‡] Albert Iron,[‡] Alain Kitzis,*[†] and Véronique Ladeveze*

From the Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires,* Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 6187, Université de Poitiers, Poitiers, the Centre Hospitalia Universitaire de Poitiers,[†] Poitiers, and the Laboratoire de Génétique Moléculaire,[†] CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

The DNA sequences of seven regions in the human genome were examined for sequence identity with exon 9 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene, which is mutated in cystic fibrosis, and its intronic boundaries. These sequences were 95% to 96% homologous. Based on this nucleotide sequence similarity, PCR primers for CFIR exon 9 can potentially anneal with other homologous sequences in the human genome. Sequence alignment analysis of the CFTR exon 9 homologous sequences revealed that five registered mutations in the Cystic Fibrosis Mutation Database may be due to the undesired annealing of primers to a homologous sequence, resulting in inappropriate PCR amplification. For this reason, we propose that certain pseudomutations may result from the similarity between CFTR exon 9 (and its flanking introns) and related sequences in the human genome. Here we show that two mutations previously described in the CFTR database (c.1392 + 6insC; c.1392 + 12G>A) were inappropriately attributed to two individuals who sought carrier testing. A more detailed study by either direct sequencing or subcloning and sequencing of PCR products using specially designed primers revealed that these apparent mutations were not, in fact, present in CFIR. In addition, we present new PCR conditions that permit specific amplification of CFTR exon 9 and its flanking regions. (J Mol Diagn 2009, 11:488-493; DOI: 10.2353/jmoldx.2009.090005)

The cystic fibrosis (CF) gene, encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), is located on the long arm of chromosome /, at position /p31. CFTR is involved in the active transport of ions through the apical membrane of epithelial cells.1 The 250-kb gene, containing 27 exons, appears highly susceptible to mutations due to its large size.² More than 1500 genetic alterations have been described to date. Most are disease-causing mutations; about half lead to amino acid substitutions (missense mutations), 20% lead to splicing errors, and 30% appear to be nonsense and frame shift (including small deletions and insertions) or promoter mutations (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/, last accessed November 29, 2006). Moreover, the type and distribution of mutations vary substantially between populations.^{3,4}

Previous studies on the *CFTR* gene have reported that exon 9 and its flanking introns are present in multiple copies in the human genome. Indeed, this region is part of the large duplicated sequence unit LCR7-20 (low-copy repeats 7 to 20), which is dispersed on different chromosomes in human genome.^{5,6}

Screening for OFTR exon 9 mutations is difficult due to the polymorphism of the (TG)*m* (T)*n* repeats located at the end of intron 8. This variation eludes common PCRbased techniques for mutation detection in this region, including direct sequencing, as well as denaturing highperformance liquid chromatography. Thus, if denaturing high-performance liquid chromatography analysis is used, it is necessary to use primers that have been documented⁷ to prevent the variability that T/TG repeats can cause. Using this method, however, only the beginning of exon 9 is amplified. Because this region of CFTRhas been duplicated in several regions of the genome, we suggest that using these classical primers could lead to misidentification of a CFTR pseudogene mutation as a CF-causative mutation.

488

Supported by Poitiers Hospital and University of Poitiers, France. Accepted for publication April 21, 2009.

Address reprint requests to Alain Kitzis, CHU de Poitiers, BP 577, 86021 Poitiers, France. E-mail: a.kitzis@chu-poitiers.fr.

Here, we analyzed two cases in which there were molecular diagnosis difficulties in the exon 9 region of *CFTR*. We demonstrate that technical anomalies leading to incorrect molecular diagnosis are due to the primers used in the PCR protocol. The consequence of these primer mismatches could be that multiple mutations already registered in the Cystic Fibrosis Mutation Database (*http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/*; last accessed December 24, 2008; Hospital for Sick Children, Toronto, Canada) could be irrelevant.

To our knowledge, there has been no previous report demonstrating the effect of sequence similarity between *CFTR* exon 9 (encoding a part of the first nucleotidebinding domain⁸) and related sequences on *CFTR* mutation screening. Therefore, our primary aim in this paper is to provide evidence of mutations in the database that are in fact pseudomutations in duplicated regions of the genome, with normal sequences in exon 9 of the *CFTR* gene. Since traditional methods for amplification of exon 9 and its flanking sequences will amplify several ectopic regions on chromosomes other than chromosome 7, we define here conditions that can be used to study this region exclusively. We suggest that each patient who presents such mutations should be re-examined by our proposed method.

Cases

The first case was a pregnant woman (UNP 10186, French origin) tested at Poitiers Hospital, because her husband was heterozygous for a mutation in CFTR. The c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations were identified in intron 9 (T. Bienvenu, C. Cazaneuve, J. C. Kaplan, B. Neldjord, personal communication). Following this result, the parents of case 1 were tested at Bordeaux Hospital. Surprisingly, only one mutation was identified in her father (p.Asp443Tyr in exon 9), and no mutation was found in her mother. The same result (p.Asp443Tyr mutation) was obtained in Bordeaux with case 1. Using microsatellites analysis, the Bordeaux laboratory confirmed that no error of sampling (blood or DNA) was made between case 1 and her father in Poitiers or Bordeaux. For these reasons, Poitiers Hospital analyzed this case again using the original blood sample and a freshly drawn blood sample. The new analysis for this family confirmed the previous results: case 1 carries the c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations in intron 9, but not the Asp443Tyr mutation in exon 9. On analysis of fresh parental samples at Bordeaux Hospital, the previous parental results were also confirmed, showing that her father must be carrier for Asp443Tyr mutation in exon 9.

The second case was a pregnant woman (UNP 10481, French origin) tested in Poitiers Hospital for genetic counseling of cystic fibrosis. Her family history revealed that her cousin had died of this disease, but the underlying *CFTR* mutations had not been identified. The presence of mutations in the 27 exons and neighboring intronic regions of the *CFTR* gene was assessed by denaturing gradient gel electrophoresis (for exons 3, 4, 6b, 10, 11, 12, 14a, 20, 21) and by denaturing high-performance liquid chromatography (all others). The c.1392 + 6insC

Diagnosing Mutations in the CFTR Exon 9 489 JMD September 2009, Vol. 11, No. 5

and c.1392 + 12G>A mutations were detected by sequencing. Moreover, no other mutations were identified.

Control groups used in these studies consist of: (1) six individuals with no history of CF, as a negative control, and (2) 30 patients with at least one clearly identified pathogenic *CFTR* mutation, as a positive control. The control samples were screened using the same methods used to detect the c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations in cases1 and 2.

Materials and Methods

DNA Extraction and Sequencing

Blood samples (5 ml) were collected in tubes containing EDTA. All genomic DNA samples were extracted from peripheral blood cells using the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) according to the supplier's protocol. The concentration of DNA in the samples was determined by spectrophotometry to obtain the desired final concentration (5 mg/L for patients and controls [calibrator], and 10 mg/L for control samples used for standard curve). DNA samples were screened for mutations within the CFTR gene by direct sequencing using the PCR primers as described in Table 1. PCR products were purified on Dye Ex 2.0 Spin kit columns (Qiagen) and then subjected to automated sequence analysis, on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer using the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) with targeted primers.

Primer Design

CFTR gene exon 9 primers were tested for their ability to amplify CFTR exon 9 sequences from genomic DNA without interference from other sequences in the human genome. A map of primers in intron 8, exon 9, and intron 9 is shown in Figure 1. Primer sequences, annealing temperatures, and sizes and localization of the PCR products are shown in Table 1.

PCR Amplification

Genomic DNA used for mutation screening was amplified in a total volume of 50 μ l containing 100 ng DNA, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 mmol/L dNTP, 1 U *Taq* polymerase (Amersham), and 20 pmol of each primer. The conditions used for amplification were as follows: 5 minutes at 94°C; 30 cycles of 30 seconds at 94°C followed by 30 seconds at annealing temperature (see Table 1), and 30 seconds at 72°C; and a final extension step for 5 minutes at 72°C.

Subcloning and DNA Sequencing

PCR products were subcloned into pGEM-T vector (Promega) to provide templates. Plasmid DNA was extracted by alkaline lysis using a plasmid Mega purification kit

490 El-Seedy et al JMD September 2009, Vol. 11, No. 5

PCR Product	Primers names	Primer sequence (forward primer first)	Amplicon size (bp)	Annealing temp. (°C)
А	CF9.6 CF9 + 58	5'-TGGGGAATTATTTGAGAAAGC-3' 5'-ccttccagcactacaaactagaaa-3'	285	50
В	CF9-130 CF9 + 58	5'-acagtgtaatggatcatgggc-3' 5'-ccttccagcactacaactagaaa-3'	395	55
C*†	CF9-268 CF9 + 121	5'-tgtatacatgtagtagtagt-3' 5'-acattctcctaatgctcatg-3'	572	55
D*†	CF9-70 CF9 + 121	5'-gtacataaaacaagcatctat-3' 5'-tgtatacatgtagtaattcagt-3'	394	56
E*‡	CF9-70 CF9 + 437	5'-gtacataaaacaagcatctat-3' 5'-tctaaatctattgaaaattg-3'	710	54
F	CF9-184 CF9.181	5'-cctctagaaaccgtatgc-3' 5'-tgcctgctccagtggat-3'	364	54

Table 1. Primers Used in PCR Amplification and Sequencing of CFTR Exon 9 and its Intronic Boundaries

*Indicates specific PCR amplification for CFTR exon 9 and its flanking introns

¹Two sets of primers were used in which the forward primers are outside the region of similarity, but the reverse primers are inside this region. ¹Another set of primers were used in which both the forward and reverse primers are outside the region of similarity. This primer design allows the selective amplification of the target region, avoiding amplification of any similar sequences.

(Qiagen). The inserted DNA was subjected to automated DNA sequencing (as described above). Sequences were deduced from data obtained for both strands.

Nucleotide Sequence Analysis

Sequence homology searches against CFTR exon 9 and flanking intronic regions were executed by means of BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) computer-based analyses, made available through the National Center for Bio technology Information.^{9,10} Surprisingly, these sequences had high identity with sequences on other chromosomes. Another similarity was observed in the intronic boundaries of CFTR exon 9. These sequences were aligned/compared with human sequences in the GenBank database using the CLUSTALW program (www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index. html, last accessed 24/12/2008), which inserts gaps into one or the other sequence in a pair wise comparison with maximize similarities between the two sequences.

Data Bank Accession Numbers

Sequences homologous to CFTR exon 9 and its flanking introns analyzed in this study were obtained from GenBank accession numbers: NW_001839181.1 Hs9_



Figure 1. Schematic illustration of primers spanning exon 9 of the human CFIR gene and its intronic boundaries. Black bars, *CFIR* exon 9 coding region, dotted bars, intronic boundary region; solid arrowheads, beginning and end of similarity with other sequences in the human genome. DNA fragments were obtained using primers from the laboratories of Poitiers Hospital (A) and Bordeaux Hospital (B). **Open arrowheads** indicate posi-tions of primers developed in this study for specific PCR amplification of the desired region: (C and D) mono specific primers and (E) double specific primers. nrimers

WGA574_36 chromosome 9 genomic contig; NW_ 925362.1 HsCraAADB02_461 chromosome 12 genomic contig (Chr 12-a); NW_925284.1 HsCraAADB02_454 chromosome 12 genomic contig (Chr 12-b); NT_ 011387.8 Hs20_11544 chromosome 20 genomic contig (Chr 20-a); NT_025215.4 Hs20_25371 chromosome 20 genomic contig (Chr 20-b); NW_001840455.1 HsUn_ WGA2630_36 genomic contig (Cx); NW_001841138. 1 HsUn_WGA3313_36 genomic contig (Cy).

Results

Case 1

Sequence variations were identified for each PCR fragment that had an abnormal DHLPC pattern. The classical primers7 used in Poitiers Hospital allow amplification of exon 9 and the beginning of intron 9 (Figure 1. PCR product A). Sequencing of the PCR fragments using CF9.6 and CF9 + 58 primers revealed two heterozygous mutations, c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A. However, PCR using the CF9-130 and CF9 + 58 primers (PCR product B, Bordeaux primers), revealed only the G>T variation at position 1327, corresponding to the p.Asp443Tyr mutation, and not the expected c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations

To rule out the possibility that samples had been mishandled, the samples (and controls) were reassessed by PCR using the same primers and conditions; this reanalysis revealed the same mutations identified in the previous analysis. We then tested whether the choice of the primers could have affected the results. Surprisingly, only the p.Asp443Tyr mutation was detected using another primers pair that spans from intron 8 to intron 9. (CF9-268 and CF9 + 121, PCR C, from intron 8 to intron 9 as for Bordeaux primers)

To explain the results obtained, additional PCR amplifications followed by direct sequencing were performed using intronic or exonic primers (Table 1). The results revealed that PCR product F covers only the Asp443Tyr mutation, whereas PCR products obtained using exonic

Diagnosing Mutations in the CFTR Exon 9 491 JMD September 2009, Vol. 11, No. 5

Case	Clone genotype	N/N N/N	c.1327G>T(p.Asp443Tyr) N/N	N/N c.1392 + 6insC; c.1392 + 12G> A	c.1327G>T(p.Asp443Tyr) c.1392 + 6insC; c.1392 + 12G> A	Total number of clones tested
Case 1 Case 2	% clones of PCR A % clones of PCR C % clones of PCR A % clones of PCR C	19 60 4 67	54 40 26 33	27 0 35 0	0 0 35 0	26 15 15 6

Table 2. Summary of Clones with Different Genotypes Used for PCR Amplification and Sequencing

N/N = wild-type genotypes.

forward primers and intronic reverse primers cover the heterozygous c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations (data not shown).

To investigate the number of different alleles and confirm the unusual result from direct sequencing, PCR products of the region of interest have been cloned. Sequencing analysis of cloned PCR product C showed two alleles: one mutated (p.Asp443Tyr allele) and one wild-type. In contrast, by using cloned PCR (A) product, a third allele is detected containing the c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations. In addition, we found these apparent mutations in homozygous state, which clearly allows identification of the insertion. Table 2 shows the percentage of each genotype obtained by direct amplification and sequencing, confirming that different experimental protocol yielded o different numbers of alleles.

Case 2

Similar data have been obtained for case 2 either by direct sequencing or by subcloning of PCR products A and C. This individual carries a G>A polymorphism at position 1395 in exon 9. In fact, four alleles could be detected: two with G>A at position 1395 and two with G>T at position 1395 and c.1392 + 6insC; c.1392 + 12G>A. The c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations were never found without the G>T polymorphism at position 1395.

Most surprisingly, these results show that a different sequence, an apparent copy of *CFTR*, was amplified specifically in each case. Indeed, the amplification procedure revealed a G>T polymorphism at position 1395 in case 2 that was never observed in case 1.

DNA Sequence Comparisons

A BLAST search for regions of similarity to *CFTR* exon 9 and its flanking introns revealed an identical sequence in five regions in the human genome, named 20-a, 20-b, 12-a, 12-b, 9, and two genomic contigs named Cx and Cy. An alignment of these sequences was preformed to determine the common region of similarity. The beginning of similarity is located 61 bp upstream and continued 401 bp downstream of the exon 9 (Figure 1).

Comparison of the CFTR Exon 9 Coding Sequence

Exon 9 shares 95% identity with other homologous sequences. Several variations have been identified in exon 9, including four possible mutations shown in Figure 2A: p.Lys464Asn, c. 1328_1329delAT, c.1235delC, and p.Asn416ser (*http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/*; last accessed 24/12/2008) [Personal communications: p.Lys464Asn (E. Bleth, V. Gaston, P. Gautry), c.1328_1329delAT (T. Bienvenu, L. Tchertkoff, C. Cazeneuve, C Beldjord), c.1235delC (C. Férec), and p.Asn416Ser (L. Picci, M. Cameran, O. Marangon, D. Marzenta, M. Scarpa)]. Table 3 summarizes the mutations that may be due to these homologous sequences.

Comparison of Intronic Sequences

We also studied the relationship of the intronic boundaries of *CFTR* exon 9 with homologous sequences. The c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations, previously thought to lie at the beginning of intron 9, were found in all homologous sequences (Figure 2B). Furthermore, an analysis of the number of thymines in a thymine repeat in intron 8 (IVS8) indicated that the duplicated sequences do not affect the T5/T7/T9 polythymidine tract situated in intron 8 near the acceptor splice site for exon 9. Moreover some other PCR products revealed addi-



Figure 2. Mutations in human *CFTR* exon 9, its intronic boundaries, and homologous sequences in the human genome. A: Name and localization of potentially incorrect mutations (pseudomutations). These variants could be a consequence of local sequence identity with similar regions in the human genome that result in a severely increased frequency of priming artifacts. B: Horizontal lines show human chromosomal regions with homology to *CFTR* exon 9 and its intronic boundaries, and **arrowheads** show positions of mutations found within these homologous sequences (based on CLUSTALW multiple alignment nanlysis).

492 El-Seedy et al JMD September 2009, Vol. 11, No. 5

CFTR mutation	Common nomenclature	Nucleotide change	Site of mutation*	Consequences
p.Lys464Asn	K464N	G to T at 1392	Exon 9 (no. 10)	Lys to Asn at 464; mRNA splicing defect?
c.1328_1329deIAT	1460delAT	Deletion of AT from 1328	Exon 9 (no. 10)	Frameshift
c.1235delC	1367delC	Deletion of C at 1235	Exon 9 (no. 10)	Frameshift
p.Asn416Ser	N416S	A to G at 1247	Exon 9 (no. 10)	Asn to Ser at 416
c.1392 + 6insC; c.1392 + 12G>A	1524 + 6insC 1524 + 12G>A	Insertion of C after 1392 + 6, G to A at 1392 + 12	Intron 9 (no. 10)	mRNA splicing defect?

Table 3. Mutations in CFTR Exon 9 and its Intronic Boundaries that Have Homologous Sequences in Other Chromosomes

These mutations were previously reported as personal communication to the CF Genetic Analysis Consortium (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr, last accessed December 24, 2008).

Tast accessed December 24, 2009, "Conventional CFTR exon/intron numbering includes exons 6a and 6b, exons 14a and 14b, and exons 17a and 17b; for exon/intron numbers in parentheses, these exon pairs are numbered sequentially, without modifiers such as "6a" and "6b."

tional substitutions, indicating that other sequences were co-amplified (data not shown).

PCR analyses were performed using specific primers directed to the ends of or inside the homologous sequences to confirm the presence or absence of the c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations (Figure 1). Sequencing of PCR products C, D, and E revealed the wild-type sequence of exon 9 on chromosome 7. Moreover, when the annealing temperature of PCR A was increased from 50°C to 60°C, the PCR product A presented only the p.Asp443Tyr mutation (G>T at 1327) in exon 9, and not the c.1392 + 6insC; c.1392 + 12G>A mutations.

Furthermore, the c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations were detected in DNA samples from each of the six negative control subjects and in patients with other *CFTR* mutations, when the classical primers were used, but were not detected in these same subjects when the specifically designed primers or the high annealing temperature was used. Taken together, our data confirm that the c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations are not actually present in the *CFTR* gene, but are in fact the consequence of multiple copies of this region throughout the human genome.

Discussion

The Cystic Fibrosis Mutation Database is useful for screening different populations, especially for laboratories involved in the diagnosis of *CFTR* mutations. Furthermore, to determine *CFTR* abnormalities in mutation carriers, these resources have important implications for continuing research on the molecular basis of CF. The identification and confirmation of newly discovered mutations is a challenge, particularly to CF clinics, for improving methods of detection.

The availability of complete genome sequences for many organisms in accessible databases has facilitated the assessment of DNA sequence similarities allowing a better understanding of both inter- and intragenomic homology, and thus of global genome structure.¹¹ The final and conclusive characterization of a genomic rearrangement usually relies on the identification of sequences that harbor the rearrangement/mutation(s).¹² Ultimately, the functional consequences of disease-associated genomic rearrangements/mutations can be assessed only by accurately determining the exact DNA sequences(s) responsible for the particular disease phenotype. BLAST analysis of CFTR exon 9 and its flanking intronic regions revealed several exon 9 repeat sequences in the human genome. Surprisingly, the c.1392 + 6insC and c.1392 + 12G>A mutations were found in all of these pseudogene sequences. Moreover, the T at position 1395 was also detected in one similar sequence. Therefore, sequence similarities and structure alignment indicate that these mutations could be pseudomutations. It is noteworthy that we identified four other mutations in the CFTR database (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/, last accessed December 24, 2008) that are present in homologous sequences within CFTR exon 9. The above data are consistent with a report describing the amplification of this segment to multiple copies in human genome by cloning, sequence analysis, and chromosome localizations.⁵ A detailed analysis of this segment has previously shown that this region is part of a large duplicated sequence unit (LCR7-20), and that duplicated units are localized on different human chromosomes. Furthermore, restriction fragment analysis and limited sequencing data have shown that the human genome contains approximately 30 copies of LCR7-20-like sequences.⁶ Our present results, however, do not agree with this high copy number. Moreover, an insertion containing a 647-bp sequence with strong sequence similarity to CFTR exon 9 has been previously described,⁶ and the authors suggested that these regions were copied and co-integrated with an L1 retrotransposon during its transposition to new locations in the aenome.

Based on our results and those from other studies, we suggest that technical anomalies can occur when screening for *CFTR* mutations due to the presence of several genomic regions that are homologous to this gene. Therefore, we have studied human *CFTR* exon 9 and its intronic boundaries by investigating a wide range of highly similar/homologous sequences to design primers that precisely amplify only *CFTR* exon 9 and its flanking introns, and that can be used to identify true mutations in this gene. We used an upstream fragment in intron 8 near exon 9 to avoid amplifying the polymorphic tract upstream of exon 9; other amplified fragments were located in exon 9 or intron 8. This strategy successfully

excluded amplification of pseudogene sequences. By direct sequencing with non-specific primers, the findings revealed different sequences that were not located in the CFTR exon 9 regions. Subsequently, we used PCR cloning with specific and non-specific primers to confirm the pseudogene variants. We have described here three specific primer pairs for CFTR exon 9 that have no similarity to other pseudogene sequences. In one primers set (CF-70, CF + 437), both the forward and reverse primers are outside the region of homology. In the two other primer sets, forward primers (CF-70, CF-268) that are outside the region of homology, and a common reverse primer (CF + 121) is inside the region of homology. These designed primer sets, along with suitable melting temperatures, preclude co-amplification of pseudogene sequences.

Our results also suggest that several mutations that have been described in *CFTR* exon 9 and its flanking regions could, in fact, be ectopic variants in pseudo-genes. These include p.Lys464Asn, c.1328_1329delAT, c.1235delC, and p.Asn416Ser in exon 9, and c.1392 + 6insC; c.1392 + 12G>A in intron 9. In conclusion, all patients carrying such mutations should be re-examined using the primers and protocol described here.

References

- 1. Tsui LC, Buchwald M: Cystic fibrosis. Ann Med Genet 1992, 24:192-245
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC,

Diagnosing Mutations in the CFTR Exon 9 493 JMD September 2009, Vol. 11, No. 5

Collins FS, Tsui LC: Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 1989, 245:1066-1073

- Wang LJ, Wang J, Zhang YH, Hsu E, Heim RA, Bowman CM, Woo MS: Improved detection of CFTR mutations in Southern California Hispanic CF patient. Hum Mutat 2001, 18:296–307
 Bobadilla JL, Macek JM, Fine JP, Farrell PM: Cyslic fibrosis: a world-
- Bobadilla JL, Macek JM, Fine JP, Farrell PM: Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutation-correlation with incidence data and application to screening. Hum Mutat 2002, 19:575–606
- Rozmahel R, Heng HHO, Duncan AMV, Shi XM, Rommens JM, Tsui LC: Amplification of CFTR exon 9 sequences to multiple locations in the human genome. Genomics 1997, 45:554–561
- Liu X, Li X, Li M, Acimovic YJ, Li Z, Tshui LC: Characterization of the segmental duplication LCR7-20 in the human genome. Genomics 2004, 83:262–269
 Le Marechal C, Audrezet MP, Quere I, Raguenes O, Langonne S,
- Le Marechal C, Audrezet MP, Quere I, Raguenes O, Langonne S, Ferec C: Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing highperformance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counseling. Hum Genet 2001, 108:290–288
- Strong TV, Wilkinson DJ, Monsoura MK, Devor DC, Henze K, Yang Y, Wilson JM, Cohn JA, Dawson DC, Frizzell RA, Collins FS: Expression of an abundant alternatively spliced form of the cyslic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene is not associated with a cAMP-activated chloride conductance. Hum Mol Genet 1993, 2:225–230
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990, 215:403–410
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, MillerW, Lipman DJ Gapped: BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 1997, 25:3389–3402
- 11. Miller W: Comparison of genomic DNA sequences: solved and unsolved problems. Bioinformatics 2001, 17:391–397
- Montagna R: Genomic rearrangement account for more than onethird of the BRCA1 mutations in the northern Italian breast/ ovarian cancer families. Hum Mol Genet 2003, 12:1055–1061

Article 2 - soumis

Consequences of partial duplications of the human CFTR gene on

CF diagnosis: mutations or ectopic variations

Ayman El-Seedy¹, Marie-Claude Pasquet², Thiery Bienvenu³, Eric Bieth⁴, Marie-Pierre Audrezet⁵, Emanuele Buratti⁶, Alain Kitzis^{1,2}, and Véronique Ladeveze^{1*}

¹Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS UMR 6187, Université de Poitiers, Poitiers, France.

²*Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Poitiers, France.*

³Groupe Hospitalier Cochin Saint-Vincent de Paul, Assistance Publique, Hôpitaux de Paris, France.

⁴Laboratoire de Génétique Cellulaire et Moléculaire, Hôpital Purpan, Toulouse, France. ⁵Laboratoire de Génétique Moléculaire, Université de Bretagne Occidentale, and INSERM U613, Brest, France.

⁶Molecular Pathology Group, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste, Italy.

*Corresponding author

Veronique Ladeveze, MSc, PhD,

Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires,

Université de Poitiers, 86022 Poitiers cedex, France

TEL: + (33) 5 49 45 49 73

FAX: + (33) 5 49 45 49 72

Email addresses:

- AE: el_seedyus@yahoo.com
- MC-P: surv.gcelmol@chu-poitiers.fr
- TB: thierry.bienvenu@inserm.fr
- EB: bieth.e@chu-toulouse.fr
- MP-A: marie-piere.audrezet@inserm.fr
- EB: buratti@icegb.org
- AK: a.kitzis@chu-poitiers.fr
- VL: veronique.ladeveze@univ-poitiers.fr

Keywords: *CFTR* exon 9, nucleotide sequence analysis, human genome, *CFTR* pseudomutations

Abstract

Background: The identification and confirmation of new mutations in *CFTR* gene are challenging but important for improving the diagnosis of this disease, particularly in cystic fibrosis (CF) clinics. In a previous work, we have shown that CFTR exon 9, and its flanking regions, duplication on other chromosomes could have important consequences on CFTR mutation diagnosis.

Methods: All CFTR exons as well as relevant intronic regions were tested for mutations by DHPLC or DGGE. Here, we conducted a CFTR mutation analysis of eight French patients and one Italian patient DNA carrying mutations in exon 9 using PCR amplification with suitable melting temperature and specific primers to avoid the amplification of the duplicated regions.

Results: We present results obtained with the DNA samples previously described as bearing c.1235delC, c.1247A>G and c.1392G>T mutations in exon 9 and c.1392+6insC; c.1392+12G>A mutations in intron 9. First, we observed five affected patients misdiagnosed with the c.1392+6insC; c.1392+12G>A sequence variations, who have now been re-evaluated as wild type at *CFTR* exon 9. Second, we checked for the presence of the c.1392G>T mutation in two DNA samples obtained from a CF family, the healthy mother and her son with CF. Using our method, we confirmed that both individuals were heterozygous for the c.1392G>T mutation. Third, using the same approach, we detected the presence of 1235delC and c.1247A>G mutations located in *CFTR* exon 9 in the DNA sample from two different patients.

Conclusion: The current findings demonstrated that all variations described in exon 9 are real mutations and only c.1392+6insC and c.1392+12G>A variations in intron 9, which found in all duplicated sequences, are ectopic variations.

Background

CFTR, the gene that encodes the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, which is located on chromosome 7, is responsible for cystic fibrosis (CF). It encodes a large transmembrane protein of 1480 amino acids that forms an ATP- and cAMP-dependent chloride channel found in the apical border of epithelial cells lining most exocrine glands [1]. The *CFTR* mutation databases are useful for screening different populations and are especially useful to laboratories involved in the diagnosis of *CFTR* mutations. The identification and confirmation of new mutations in this gene are challenging but important for improving the diagnosis of this disease, particularly in the CF clinics. To date, more than 1800 mutations of the CFTR gene have been reported (Cystic Fibrosis Mutation Database, http:// www.genet.sickkids.on.ca/cftr/, last accessed 18/06/2010), but little is known about the molecular mechanisms by which these mutations affect the function of *CFTR*, and only a minority have been characterized at the protein level [2]. However, mutational heterogeneity of the CFTR gene complicates CF diagnosis at DNA level. Moreover, a significant percentage of the CFTR gene [3].

CFTR exon 9 is duplicated, at least, on 8 other chromosomes in the human genome [4-6]. On these duplicated regions, 6 nucleotides variations are described that could interfere with the real sequence of patients' CFTR exon 9. The amplification of these duplicated regions, instead of the CFTR exon 9, would result in the misinterpretation of these variations as CFTR mutations. Surprisingly, the c.1392+6insC; c.1392+12G>A mutations were basically found in all of these pseudogene sequences. We previously described a new strategy to realise the amplification of CFTR exon 9 avoiding amplification of the duplicated regions. This strategy consists of different specific primers and suitable melting temperature [6].Therefore, sequence homology, structure alignment and the correct identification of either mutant or wild-type alleles indicate that these mutations are pseudomutations [6] Furthermore, several mutations described in exon 9 may in fact be ectopic variations from sequences detected in pseudogenes: c.1235delC, c.1247A>G, c.1338_1339delAT and c.1392G>T. Beside that, no published cases of such genotypes exist.

Recently, we received DNA samples previously described as bearing the mutations c.1235delC; c.1247A>G; c.1392G>T in exon 9, and c.1392+6insC; c.1392+12G>A in intron 9. Thus, the present study was aimed at identification of the underlying mutations in the *CFTR* exon 9 using our specific strategy to validate this approach and to avoid future misamplification of duplicated sequences during genetic counselling and prenatal diagnosis.

Methods

Case Report

The c.1235delC mutation was identified in a French CF patient diagnosed at birth. After the diagnosis, the patient showed a severe lung disease with idiopathic pancreatitis (IP). The sweat chloride result was of 176 mmol/L. He carried c.1521_1523delCTT (F508del) on the other allele (Ferec C, personal communication).

The c.1247A>G mutation was detected in a 30 years old Italian man during the screening program of relatives carriers. It was seen it only once, in over 3000 chromosomes analysed by DGGE. No other mutation was detected. (Picci L, personal communication).

The c.1392G>T mutation was identified in a French CF patient carrying the c.3659delC mutation on the other chromosome. No other mutation was detected after extensive screening for CFTR mutations. The patient was a newborn child referred for elevated immunoreactive trypsinogen (newborn screening) and positive sweat test ($CI^{-} > 100 \text{ mEq/L}$). At age 6 months, he expressed a severe phenotype with pancreatic insufficiency, chronic cough, and bronchial infection (*H. influenzae and S. aureus*; Bieth E, personal communication).

The c.1392 +6ins C; c.1392+12 G>A mutations were identified in five French patients from independent families. Previously, two cases have been published [6]. In this study, we confirm our results with three other cases: the first one was a 34-year-old woman initially diagnosed with bronchietasis with cough and dyspnea without digestive and pancreatic problems. The second case was a 62-year-old man initially diagnosed with obstructive pulmonary disorder without digestive and pancreatic problems. Moreover, no other mutations were identified in these two patients. The third case was that of a 19-year-old adolescent initially diagnosed with CF. He revealed the heterozygous presence of c.1521_1523delCTT and c.617T>G mutations (Bienvenu T, personal communication).

CFTR Mutation Analysis

The mutation detection test was performed on DNA collected from 9 patients in 7 different families. The reported cases were referred to Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers (3 cases); Assistance Publique, Hôpitaux de Paris (3 cases); Hôpital Purpan, Toulouse (1 case); Laboratory of molecular genetics, Brest (1 case), regarding the diagnosis of CF disorder and an italien male from laboratory of molecular genetics, Padova (Figure 1B).

Genomic DNA samples were extracted from blood leukocytes using the QiaAmp DNA Blood Mini kit (Qiagen) according to protocols provided by the manufacturer. Extensive *CFTR* gene analyses were performed in the patients and healthy individuals using a combination of methods including: (i) screening for frequent mutations using diverse commercial assays; (ii) scanning of the 27 exons and their boundaries using DGGE or DHPLC, followed by sequencing to characterize the variants. The *CFTR* mutation analysis was performed for the mutations c.1392G>T and c.1235delC in exon 9 and c.1392+6insC; c.1392+12G>A in intron 9, respectively by PCR amplifications. The conditions used for amplification were as follows: 5 min at 94°C; 30 cycles of 30 sec at 94°C followed by 30 sec at annealing temperature and 30 sec at 72°C; and a final extension step for 5 min at 72°C.

PCR products were sequenced directly on an ABI Prism 310 Genetic Analyzer using the ABI PRISMTM Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) with targeted primers. Sequencing results were compared with the sequence of the wild-type CFTR Mutation gene published on the Cystic Fibrosis Database (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html). The specific primers for the identification these mutations follows: Forward CF9-184. of were as primer, 5'-CCTCTAGAAACCGTATGC-3'; Reverse primer, CF9+58, 5'-CCTTCCAGCACTACAAACTAGAAA-3' (Figure 1A).

Splice-site prediction analysis

In order to predict the impact of the c.1392G>T (Lys464Asn, K464N) mutation on the splicing process, we selected a combination of three distinct tools [Delta-G, Max entropy, Senepathy] that are contained in the Sroogle analysis package (freely available at http://sroogle.tau.ac.il/) [7].

Mutation Nomenclature

Mutations at the protein level were named according to the recommendations of the Human Genome Variation Society (HGVS) guidelines (http://www.hgvs.org/mutnomen/). For those described at the nucleotide level, DNA mutation numbering is based on the cDNA sequence (GenBank NM_000492.3) that uses the A of the ATG translation initiation start site as nucleotide +1 [8] and on the CFTR Mutation Database (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/). The traditional nomenclature is also included using nucleotide position 133 as the translational start site.

Results and Discussion

Molecular diagnosis for *CFTR* exon 9 mutations is difficult because this exon and its flanking sequences (especially the downstream sequences) have been duplicated and inserted into several chromosomes as pseudogenes [4-6] and because of the presence of polymorphic tracts upstream of exon 9. The TG and poly (T) repeats in IVS-8 just upstream of exon 9 can lead to a reduction of the exon 9 signal (9). The typical length of the IVS8-poly (TG) tract is 10–12 copies, whereas the usual IVS8-poly (T) tract length is 7T, with 5T and 9T occurring with significant frequency (10, 11). The combination of these polymorphisms and the multiple pseudo-exon 9 copies on other chromosomes limits the choice of primers to use for amplification of exon 9. Thus, the inclusion of confirmatory fragments for exon 9 is necessary (12).

Detection of CFTR exon 9 mutations

DNA samples were screened for mutations within *CFTR* using primers that hybridize to intron 8 and intron 9 to avoid interference with other sequences in the human genome (Figure 1A). Direct sequencing of amplified fragments was performed with the same PCR primers for three new patients from Cochin Saint Vincent de Paul Hospital and two patients from Poitiers CHU who had previously been diagnosed as carrying the c.1392+6insC; c.1392+12G>A mutations in intron 9 (Figure 1B).

The results are shown in comparison with the sequence of wild-type *CFTR* (Table 1) and confirm that these variants are pesudomutations and are in fact a PCR artifact and the consequence of the existence of multiple copies of this region in the human genome.⁵ Indeed, these variants are not found within the *CFTR* gene, whereas they are present in each duplicated region (Figure 1C).

The mutations described in the exon 9 in this report were identified in the examined patients by direct sequencing (Figure 1D). Thus, these variants appear to be authentic

mutations in CFTR exon 9. Moreover, they were only observed in one or two duplicated sequences (Figure 1C). The c.1235delC mutation, a frameshift that causes deletion of cytosine at position 1235, was first described in a French CF patient (Ferec C, personal communication). The c.1247A>G mutation is a transition (Figure 1D), which causes a change of Asparagine to Serine at position 416 of the CFTR polypeptide; the two amino acids are with neutral polar side chain. The c.1392G>T mutation is a transition mutation of 1392 G>T in exon 9 (Figure 1D), which causes a change of Lysine to Asparagine at position 464 of the CFTR polypeptide and a modification of the last nucleotide of the exon 9 last codon. This substitution is predicted to reduce splicing efficiency. The effect of the predicted splicing mutation c.1392G>T was analyzed by computer-assisted splice-site prediction using Delta-G, Max entropy, and Senepathy programs. The used programs recognized the wild-type as well as the mutant splice site with appreciable big difference in score (Table 2). This mutation should affect the strength of the 5' splice site. This variant was identified in one patient with CF carrying the c.3659delC mutation on the other chromosome, which leads to a frame shift mutation starting from codon 1220 (Bieth E, personal communication). Further experiments could be performed to determine the impact of the c.1392G>T mutation on splicing.

Conclusions

We present here some recent results from our method that is very specific for the amplification of CFTR exon 9. This approach could be useful in studying and characterizing mutations in this region in CF patients. Furthermore, our previous study [6] and our new findings in patients carrying c.1235delC, c.1247A>G and c.1392G>T mutations will help with the genetic evaluation and screening of patients with these mutations to diagnose CF with much greater accuracy. Thus, we demonstrate that all variations described in exon 9 are real mutations and only c.1392+6insC and c.1392+12G>A variations in intron 9, which found in all duplicated sequences, are ectopic variations.

Abbreviations

DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography; DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; PCR: polymerase chain reaction

Competing interest

There is no competing interest.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Picci L for the generous donation of the DNA sample of c.1247A>G mutation. This work was supported by Poitiers Hospital and University of Poitiers, France.

References

1. Radpour R, Gourabi H, Gilani MA, Dizaj AV, Rezaee M, Mollamohamadi S **Two novel** missense and one novel nonsense *CFTR* mutations in Iranian males with congenital bilateral absence. *Mol Hum Reprod* 2006, 12: 717–721

Grangeia A, Barro-Soria R, Carvalho F, Damas AM, Maurício AC, Kunzelmann K, Barros A, Sousa M: Molecular and functional characterization of CBAVD-causing mutations located in CFTR nucleotide-binding domains. *Cell Physiol Biochem* 2008, 22: 79–92

 Bombieri C, Bonizzato A, Castellani C, Assael B M, Pignatti P F: Frequency of large CFTR gene rearrangements in Italian CF patients. *Eur J Hum Genet.* 2005, 13(5):687-689. 4. Rozmahel R, Heng HH, Duncan AM, Shi XM, Rommens JM, Tsui LC: Amplification of CFTR exon 9 sequences to multiple locations in the human genome. *Genomics* 1997, 45(3):554-61.

5. Liu X, Li X, Li M, Acimovic YJ, Li Z, Tshui LC: Characterization of the segmental duplication LCR7-20 in the human genome. *Genomics* 2004, 83: 262–269

6. El-Seedy A, Dudognon T, Bilan F, Pasquet MC, Reboul Mp, Iron A, Kitzis A, Ladeveze V: Influence of the Duplication of CFTR Exon 9 and Its Flanking Sequences on Diagnosis of Cystic Fibrosis Mutations. *J Mol Diagn* 2009,11: 488-493

7. Schwartz S, Hall E, Ast G: **SROOGLE: webserver for integrative, user-friendly** visualization of splicing signals. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37: 189–192

8. OginoS, Gulley M L, Den Dunnen J T, Wilson R B. and the Association for Molecular Pathology Training and Education Committee Standard Mutation: Nomenclature in Molecular Diagnostics, Practical and Educational Challenges. *J Mol Diagn* 2007: 1: 1–6

9. Radpour R, Gourabi H, Diza AV: Genetic investigations of *CFTR* mutations in congenital absence of vas deferens, uterus, and vagina as a cause of infertility. J of Androl 2008, 29: 506–513

10. Kiesewetter S, Macek M, JR, Davis C, Curristin SM, Chu CC, Graham C, Shrimpton AE, Cashman SM, Tsui LC, Mickle J, Amos J, Highsmith WE, Shuber A, Witt DR, Crystal RG, Cutting GR: A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet* 1993, 5: 274–278

11. Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C and Claustres M: **Mutations in the cystic fibrosis gene in patients** with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995, 332: 1475–1480
12. Hantash FM, Redman JB, Starn K, Anderson B, Buller A, McGinniss MJ, Quan F, Peng M, Sun W, Strom CM: Novel and recurrent rearrangements in the *CFTR* gene: clinical and laboratory implications for cystic fibrosis screening. *Hum Genet* 2006, 119:126–136

Figure legends:

Figure 1

CFTR exon 9 region and its duplicated sequences in the human genome.

(A) Localization of *CFTR* mutations found in duplicated sequences of exon 9 and its intronic flanking regions. These variants may be due to the sequence identity with similar sequences in the human genome that markedly increase priming artifacts. Horizontal arrows indicate the location of primers used in this study.

(B) Number of individuals examined in this study who carry the c.1235delC, c.1247A>G, c.1392G>T, and c.1392 +6ins C; c.1392+12 G>A mutations (top). The number of families is also shown (bottom).

(C) Chromosomal location of *CFTR* exon 9 on chromosome 7 and the duplicated *CFTR* exon 9 region. The positions in these sequences of the previously described *CFTR* mutations are shown (arrowheads). The open box indicates mutations found in all duplicated sequences and that are not *CFTR* exon 9 mutations. The circled arrowheads indicate location of the *CFTR* mutations tested in this study.

(D) Positions of c.1235delC, c.1247A>G and c.1392G>T mutations and DNA sequence of exon9 from the examined patients.

Figure 1



CFTR mutation Amino acid		Site of	Status	Consequences
(legacy name)	change	mutation [§]		
c.1235delC (1367delC)	p.Ala412Glufs*30	Exon 9 (no. 10)	М	Frameshift
c.1392G>T (1524G>T)	p.Lys464Asn	Exon 9 (no. 10)	М	Severe mutation, mRNA splicing defect?
c.1330_1331delAT (1460delAT)	p.Ile444X	Exon 9 (no. 10)	ND	Frameshift
c.1247A>G (1379A>G)	p.Asn416Ser	Exon 9 (no. 10)	М	Unknown
c.1392 +6ins C; c.1392+12 G>A (1524+6insC ; 1524+12G>A)		Intron 9 (no. 10)	NM	None

Table 1. Mutations in CFTR and in the duplicated exon 9 region.

Abbreviations: fs, frameshift; X, change in DNA sequence that causes translation to stop; M, CFTR real mutation; ND, not determined; NM, no mutation in CFTR.

These mutations were previously reported as personal communications to the CF Genetic Analysis Consortium (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr, last accessed 18/06/2010).

*Position of deletion of base(s) in DNA sequence which results in shift in the reading frame during translation.

[§]Conventional *CFTR* exon/intron numbering includes exons 6a and 6b, exons 14a and 14b,

and exons 17a and 17b; for exon/intron numbers in parentheses, these exon pairs are

numbered sequentially, without modifiers such as "6a" and "6b".

CFTR	location	Site splicing	WT score	MUT score
Mutation		prediction software		
c.1392G>T	Last nucleotide	Delta-G	-4.80	-0.00
	exon 9			
		Max entropy	+6.44	-3.69
		Senepathy	+77.82	+65.29

Table 2. Splice-site prediction analysis of c.1392G>T mutation

WT, the wild-type sequence; MUT, the sequence harboring the c.1392G>T variant

Poster présenté à la 32nd European Cystic Fibrosis conference, Brest, June 10-13, 2009



INCIDENCE OF THE CFTR EXON 9 AND ITS FLANKING SEQUENCES DUPLICATION ON MUTATION DIAGNOSIS IN CF PATIENTS

A. El-Seedy¹, T. Dudognon, ¹F. Bilan, ^{1,2} M.C. Pasquet, ²A. Iron, ³A. Kitzis, ^{1,2} and V. Ladeveze¹ ¹ Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires; CNRS UMR 6187; Université de Poitiers, France; ² CHU de Poitiers, Poitiers; ³ Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France.

INTRODUCTION

The cystic fibrosis gene, that encodes the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) appears highly susceptible to mutations due to its large size and misprocessing errors (Riordan et al., 1989). More than 1500 genetic alterations have been so far described in the CFTR gene (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr, 2006). Moreover, the types and distribution of mutations vary significantly among different populations (Wang et al 2001; Bobadilla et al, 2002).

OBJECTIVES

The aim of this work: to define new conditions to study exclusively the region of exon 9 and its flanking sequences on chromosome 7 which is duplicated with several ectopic amplifications in other chromosomes (Rozmahel et al, 1997; Liu et al, 2004) in order to put in evidence the mutations that have been described in the database whereas they are in fact present in sequences of the duplicated regions of exon 9 of chromosome 7.







(C)



homologous sequences detected on different chromosomes determined by BLAST



Summary of used clones with different genotypes for PCR amplification and

Clone/Genotype	D443	Y443	+	Y443	Ν
Case 1	+	+	1524+6insC	1524+6insC	
			+12G>A	+12G>A	
(A) Clones	19	54	27	0	26
(C) Clones	60	40	0	0	15
¹ lone/Ganotume 1	4070	1407.4	14970	1407T	N
^o lone/Genotyne i	497G	1407 A	1497G	1497T	N
Clone/Genotype Case 2	1497G +	1497A +	1497G 1524+6insC	1497T 1524+6insC	N
Clone/Genotype Case 2	1497G +	1497A +	1497G 1524+6insC +12G>A	1497T 1524+6insC +12G>A	N
Clone/Genotype Case 2 (A) Clones	4497G + 4	1497A + 26	1497G 1524+6insC +12G>A 35	1497T 1524+6insC +12G>A 35	N 6

Clone Sequencing and analysis

Cloned PCR(C) product showed two alleles: one mutated (D443Y allele) and one wild-type. Cloned PCR(A) product, a third allele is detected: the 1524 $\pm 6insC \pm 12G \times A$ mutations.

Detailed data of mutations identified in the CFTR exon 9 and its intronic boundaries of chromosome 7 in the Database

CFTR mutation	Common nommenclature	Nucleotide changes	Site of mutation	Consequences
2.1235delC	1367delC	Deletion of C	Exon 9 (No.10)	frameshift 🕇
o.Asn416Ser	N416S	A to G	Exon 9 (No.10)	missense
2.1330_1331delAT	1460delAT	Deletion of AT	Exon 9 (No.10)	frameshift
).Lys464Asn	K464N	G to T	Exon 9 (No.10)	mRNA splicing defect ?
2.1329+6insC; 2.1329+12G>A	1524+6insC; 1524+12G>A	Insertion of C at 1524+6; G >A at 1524+12	Intron 9 (No.10)	mRNA splicing defect ?

- Selection of different specific primers and suitable annealing temperature

that avoids CFTR pseudogene sequences coamplificatio

MATERIALS AND METHODS

Cases

(UNP 10186) and (UNP 10481), two pregnant women (French origin), tested at Poities: Hospital for genetic connselling of cysic filteosis. By DHPLC, abnormal profile of the region 9 (exon and intron 9) is detected and the 1524+6inSC and 1524+1205-8 mutations (described by Bienvenu et al., 1993) ere confirmed by sequencing in two case

Mutation analysis

Extraction of all genomic DNA samples from peripheral blood cells using the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) according to the sappler's percetor. Analysis of the 27 econs of the CFTR gene and their intronic flanking regions performed by DFE/C or dematuring gradient gel electrophoresis (DOGE). PCR-peodote partification on Dye Ex 20 Spin Kit columns (IQAGEN). DNA samples accerning for mutations within the CFTR gene by direct sequencing method using the same PCR primers by automated sequence analysis, on the ABI Frim 310 Genetic kanalyze using the ABI PRISMM Big Dye^{IM} Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems).

Subcloning and DNA sequencing

PCR products subcloning into pGEM-T vector (Promega) to provide templates Plasmid DNA extraction with plasmid purification kit (QLAGEN) Inserted DNA sequencing.

Sequence Alignments and Comparisons

Nucleotid: Sequence search: against the CFTR even 9 and intronic flimking regions were executed by means of BLAST analyses. These sequences were aligned/compared with human sequences in the GenBank database using the CLUSTALW program.

Determination of the common homologous region of CFTR exon 9 on chromosome



REFERENCES

Bobadilla JL, et al., Hum. Mutat. 2002, 19:575-606 Dotatina J., et al., Finiti, Milli, 2002, 17:03:000 Liu X et al., Genomics 2004, 83:262-269 Riordan JR et al., Science 1989, 245: 1066–1073 Rozmahel R et al., Genomics 1997, 45: 554-561 Strong TV et al., Hum, Mol. Genet, 1993, 2: 225-230 Wang LJ et al., Hum.Mutat 2001, 18:296-307 Zielenski J. Respiration 2000, 67: 117-133

CONCLUSIONS

1524 +6 insC and 1524 +12 G> A mutations are not real mutations in the two cases studied: Wrong molecular diagnosis in both cases

Several mutations described in exon 9 and its flanking regions (specially in intron 9) are in fact ectopic variations from sequences detected in pseudogene sequences

Our suggestion: each patient who presents such mutations should be reexamined by the method proposed in this work

I-4- Annexes

4-1 Annexe 1 : Exemple de l'analyse d'un cas (UNP10186) étudié dans notre laboratoire





CHU.

La Figure 20 présente les arbres généalogiques de la même famille à partir des résultats obtenus dans les CHU de Poitiers et de Bordeaux. Devant la discordance des résultats, nous avons utilisé un panel de couples d'amorces (cf figure 21) afin d'amplifier et cloner les fragments obtenus. Avec les amorces exoniques, l'amplification n'est pas spécifique du gène CFTR alors qu'avec des amorces introniques en 5' du site polymorphe (Tn)(TG)m seul l'exon 9 et ses régions adjacentes sont amplifiées.

Figure 21 : Représentation schématique de la région amplifiée et des couples d'amorces utilisés. Après amplification, le séquençage a été réalisé afin de détecter spécifiquement la présence ou l'absence de mutations.



La taille des différents fragments obtenus est indiquée en pdb pour chaque couple d'amorces.

4-2 <u>Résultats complémentaires : étude sur un autre individu</u>

Résultats obtenus après PCR de l'exon 9 du gène CFTR

Afin d'étudier la région d'intérêt (exon 9 du gène *CFTR*), des PCR ont été réalisées sur un échantillon d'ADN (UNP 10481). Deux couples d'amorces ont été utilisés afin d'observer d'éventuelles différences dans la présence des mutations détectées après séquençage des fragments : CF9-268/CF9+121, qui amplifient une partie de l'intron 8, tout l'exon 9 et l'extrémité 5' de l'intron 9, et HPCF9A/HPCF9B qui amplifient uniquement l'exon 9 et l'extrémité 5' de l'intron 9, correspondant à la région LCR7-20. Le premier couple d'amorces doit théoriquement amplifier un fragment de 572 pdb. Cette PCR est appelée par la suite PCR C tandis que la PCR utilisant le deuxième couple d'amorces, et amplifiant un fragment attendu de 285 pdb, est appelée PCR A. De même, pour étudier l'effet de la température sur l'hybridation des amorces et vérifier si celle-ci a un impact sur la détection de mutations caractérisées après séquençage des produits, les deux PCR sont réalisées avec des températures d'hybridation différentes : une à 50°C et l'autre à 60°C.



Figure 22 : Migration sur gel d'agarose 1,5% des produits PCR obtenus pour chaque couple d'amorces utilisé. Les résultats sont identiques pour les deux températures d'hybridation (50°C et 60°C). Le contrôle est réalisé en ajoutant 5 μ L d'eau stérile au mélange réactionnel à la place des 5 μ L d'ADN (voir Matériel et Méthodes).

Comme le montre la figure 22, les résultats observés sont en accord avec ceux attendus : aucun fragment n'est détecté dans les situations contrôles, preuve que le mélange réactionnel n'a pas été contaminé. Suite à la PCR C (intron 8-intron 9), un unique fragment est obtenu, de taille attendue, soit 572 pdb. De même, suite à la PCR A (exon 9- intron 9), un fragment de 285 pdb est détecté. Ces résultats sont identiques quelle que soit la température utilisée. Le séquençage des produits PCR a ensuite été effectué.



Figure 23 : Séquence obtenues avec la PCR A à 60°C, et la PCR C à 60°C ou 50°C. La figure 4A montre un polymorphisme en position 1497 (flèche) dans les conditions spécifiques. La figure B indique la séquence normale de l'intron 9, c'est-à-dire sans insertion et avec un G en position 1524 +12 (flèche), peut être observée sur la figure B.

Après le séquençage de la PCR A à 60°C et des PCR C aux deux températures d'hybridation, des résultats identiques sont obtenus. La présence de deux nucléotides possibles est ainsi observée en position 1497 de l'exon 9, avec soit un G (information normale), soit un A. Ceci n'a aucun effet sur le phénotype dans la mesure où cette transition n'induit pas de changement d'acide aminé au sein de la protéine codée, celui-ci étant toujours une alanine en position 455. La variation visualisée sur la figure 23A ne constitue donc pas une mutation mais un polymorphisme. La figure 23B montre qu'aucune mutation non plus

n'est détectée dans l'intron 9 des produits PCR. Il apparaît donc qu'avec une température d'hybridation de 60°C, les amorces utilisées pour réaliser la PCR A s'hybrident avec le chromosome 7 puisque les produits d'amplification obtenus sont les mêmes que ceux donnés par la PCR C.



Figure 24: Séquences obtenues pour la PCR A à 50°C. La figure A montre le polymorphisme en position 1497 (flèche) tandis que la figure B indique l'insertion 1524 +6 ins C et la transition 1524 +12 G>A, en plus de l'information normale. La séquence de cette dernière figure a été obtenue à partir de l'amorce *reverse*, ce qui explique que l'insertion induit un décalage vers la gauche.

Les séquences obtenues à partir de la PCR C à 50°C sont différentes. En effet, la figure 24A indique la présence d'un autre nucléotide possible en position 1497 en plus du polymorphisme observé précédemment. Ce T n'est pas détecté avec la PCR C, ce qui semble indiquer que celui-ci ne se situe pas sur le chromosome 7, mais sur un ou plusieurs autres chromosomes qui contiendrait une copie modifiée de l'exon 9 du gène *CFTR*. De même, deux informations différentes sont présentes au niveau de l'extrémité 5' de l'intron 9 de ce même gène : une information normale qui correspondrait à l'amplification du chromosome 7, et une séquence comprenant l'insertion 1524 +6 ins C (c.1392+6insC) et la transition 1524 +12 G>A

(c.1392+12G>A) qui appartiendraient à des duplications de l'intron 9 sur d'autres chromosomes. L'insertion induit un décalage d'un nucléotide, ce qui est très bien visualisé sur la figure 24B. Une température de 50°C ne permettrait donc pas de cibler l'hybridation du couple d'amorces HPCF9A/HPCF9B sur le chromosome 7.

Résultats obtenus après clonage

A partir des produits PCR obtenus, des *ligations* ont été effectuées grâce à l'utilisation de plasmides pGEM[®]-T Easy Vector. Nous avons vérifié les différents allèles possibles en clonant les amplifications issues de la PCR A et de la PCR C à 50°C et à 60°C. Pour chaque *ligation*, des clones blancs sont prélevés afin d'extraire leurs plasmides. Ces derniers sont repris dans de l'eau stérile et analysés sur gel d'agarose afin de vérifier que l'extraction de plasmides a bien fonctionné pour chaque clone.

Une PCR avec le couple d'amorces HPCF9A/HPCF9B est effectuée à partir de ces plasmides, ceci afin d'amplifier l'insert présent. Le fragment amplifié est donc attendu à 285pdb. Les produits obtenus par PCR sont analysés sur gel d'agarose (figure 25).





Les résultats obtenus après clonage montrent les différents homozygotes possibles : 1497Gintron 9 normal (figure 26) / 1497A-intron 9 normal (figure 27) / 1497G-intron muté (figure 28) / 1497T-intron muté (figure 29). Dans ce dernier cas, le T en position 1497 (figure 29A) est toujours associé à l'insertion 1524 +6 ins C et à la transition 1524 +12 G>A, pointées par les flèches de la figure 29B.



Figure 26 : Génotype normal. La flèche de la figure A indique le G en position 1497, la figure B montre l'absence de mutation dans l'intron 9.



Figure 27 : Génotype avec le polymorphisme A. Ce polymorphisme est indiqué par la flèche de la figure A, la figure B montre l'absence de mutation dans l'intron 9.



Figure 28 : Génotype anormal. La flèche de la figure A montre la présence d'un G en position 1497, alors que celles de la figure B pointent l'insertion 1524 +6 ins C et la transition 1524 +12 G>A.



Figure 29 : Génotype anormal. La flèche de la figure A indique cette fois la présence d'un T en position 1497. Le T est toujours associé à l'insertion 1524 +6 ins C et à la transition 1524 +12 G>A, pointées par les flèches de la figure B.

Suite aux transformations bactériennes effectuées avec les produits de la PCR A, aucune insertion ni aucune transition n'est jamais observée dans la séquence intronique des clones. De même, le polymorphisme en position 1497 est toujours A ou G. Le T, lorsqu'il est détecté en 1497, est toujours associé avec l'insertion 1524 +6 ins C et de la transition 1524 +12 G>A. Sachant que les amorces utilisées pour la PCR A sont spécifiques du chromosome 7 (l'amorce *sens* se trouve dans l'intron 8 du gène *CFTR*, et ne se retrouve sur aucun autre chromosome), l'absence de génotype avec insertion et transition révèle que ces dernières sont en fait situées sur d'autres chromosomes. Ceci est confirmé par le fait que le T n'est jamais observé en 1497 avec les produits de la PCR A, alors qu'il l'est avec les produits de la PCR C. Il est donc très important de savoir quelles amorces ont été utilisées avant de déterminer s'il existe une mutation dans cette région intronique particulière.

L'alignement des séquences indique la présence de duplications de l'exon 9 du gène *CFTR* et ses régions adjacentes sur d'autres chromosomes (figure 30). Ces copies existent même parfois en plusieurs exemplaires sur un même chromosome, comme c'est le cas pour le chromosome 20. On remarque en particulier la présence d'un T en position 1497 sur ce chromosome, indiquant ainsi que le génotype 1497 T, 1524 +6 ins C +12 G>A observé après séquençage des clones (figure 29) correspondrait à la détection de la région dupliquée de ce même chromosome. Toutefois, les délétions présentes en amont de ce T n'ont pas été observées lors du séquençage de nos clones. Mis à part le chromosome 7, tous les autres chromosomes ayant une région dupliquée de la région de l'exon 9 du gène *CFTR* possèdent l'insertion et la transition au niveau de l'intron 9, confirmant l'hypothèse selon laquelle la détection de celles-ci ne correspondent pas au chromosome 7 mais bien à d'autres chromosomes (chromosome 9, 12 et 20a en ce qui concerne le génotype 1497 G, 1524 +6 ins C +12 G>A).

(Intron 8 3')

7	TCTGACAAAC	TCATCTTTTA	TTTTTGATGT	GTGTGTGTGT	GTGTGTGTGT	TTTTTTAACA	G
20a		g		•	. t-		-
20b							-
9		C	g		t-t-t		-
12a							-

(Exon 9)

7	GGATTTGGGG	AATTATTTGA	GAAAGCAAAA	СААААСААТА	ACAATAGAAA	AACTTCAACT
20a				- C		
20b						
9					-a	
12a						

7	TCTAATGGTG	ATGACAGCCT	CTTCTTCAGT	AATTTCTCAC	TTCTTGGTAC	TCCTGTCCTG
20a						
20b						
9						
12a						

7	AAAGATATTA	ATTTCAAGAT	AGAAAGAGGA	CAGTTGTTGG	C <mark>G</mark> GTTGCTGG	ATCCACTGGA
20a						
20b					- <mark>t</mark>	
9					t	
12a				C	t	

7 **GCAGGCAAG** 20a -----20b -----**t** 9 ------12a ------

(5' Intron 9)

7	GTAGT.TCTT	TTGTTCTTCA
20a	<mark>c</mark>	<mark>a</mark>
20b	<mark>c</mark>	<mark>a</mark>
9	<mark>c</mark>	<mark>a</mark>
12a	<mark>c</mark>	<mark>a</mark>

Figure 30 : Alignement de la région de l'exon 9 du gène *CFTR* (chromosome 7) avec des régions homologues situées sur les chromosomes 9, 12 et 20. Les tirets (-) montrent les séquences homologues, les points (.) indiquent les délétions et les lettres en rouge correspondent à des différences de nucléotide. L'insertion 1524 +6 ins C et la transition 1524 +12 G>A sont mises en évidence par un surlignage orange. La position du polymorphisme (1497) est indiquée par un surlignage jaune.

Discussion

L'exon 9 du gène *CFTR* et ses régions adjacentes sont connus pour avoir été détectés sur d'autres chromosomes (Rozmahel *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 2004). Outre le chromosome 7, les chromosomes 9, 12 et 20 entre autres, possèdent eux aussi cette même région LCR7-20, même si la séquence correspondante n'est pas strictement identique. Grâce aux banques de données, l'alignement des séquences des chromosomes précédemment cités fait apparaître la présence de l'insertion +6 et de la transition +12 G>A chez les chromosomes 9, 12 et 20, et la présence d'un T en position 1497 pour les chromosomes 9 et 12. Les quelques variations supplémentaires qui ne sont pas visibles dans les séquences non spécifiques que nous avons obtenues pourraient être dues à des erreurs lors du séquençage automatique de ces régions.

En accord avec les résultats obtenus avec la PCR A, l'exon 9 du chromosome 7 ne porterait que le polymorphisme G ou A. La mutation détectée dans les produits issus de la PCR C à 50°C serait la conséquence d'une amplification de l'exon 9 du gène *CFTR* situé sur d'autres chromosomes. Cette hypothèse est soutenue par la détection du polymorphisme T en position 1497, existant dans ces régions dupliquées au sein de plusieurs chromosomes autres que le 7. Alors que les amorces utilisées pour la PCR A, situées dans l'intron 8 et l'intron 9 du gène CFTR, sont spécifiques du chromosome 7, celles choisies pour la PCR C, situées dans l'exon 9 et l'intron 9 du même gène, ne sont pas adaptées à la détection de mutations ciblée sur ce chromosome, et s'hybrident avec les copies de cette région chromosomique, dupliquée sur des chromosome 7. La température d'hybridation choisie pour la PCR est également cruciale : bien que les amorces soient homologues avec les différentes régions, celles-ci s'hybrident spécifiquement sur le chromosome 7 à 60°C alors qu'elles s'hybrident à d'autres

106

chromosomes lorsque la température est de 50°C. Une élévation de la température permettrait donc une augmentation de la sélectivité, par un mécanisme méconnu mais qui pourrait toutefois impliquer la structure tridimensionnelle de l'ADN.

II- Etude de l'impact des allèles complexes sur la localisation, la maturation & la fonctionnalité de la protéine

II-1- Contexte de travail

L'analyse des mutations du gène CFTR par les laboratoires des centres hospitalouniversitaires français a conduit à l'identification de patients porteurs de plusieurs mutations sur le même allèle (allèle complexe). L'allèle complexe contenant trois mutations faux-sens, D443Y-G576A-R668C [p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala et p.Arg668Cys], a été décrit pour la première fois par Abramowicz et al., (2000). La figure 1 représente la protéine CFTR et ses différents domaines ainsi que la localisation des mutations faux-sens étudiées : D443Y et G576A le domaine NBD1 et R668C le domaine régulateur. Chacune de ces mutations avait été précédemment observée indépendamment chez des patients atteints de mucoviscidose et chez ceux qui souffrent d'ABCD. L'allèle complexe G576A-R668C a été signalé chez une personne avec un test normal pour la sueur, alors que d'autres membres de la famille présentaient un phénotype atténué CF (Rowntree et Harris, 2003). Or, la mutation G576A aboutit à un défaut d'épissage sévère, avec seulement 7% de transcrits normaux (ARNm exon12+) (Pagani et al., 2003). Plus récemment, Castellani et al. (2008) ont rapporté que la mutation G576A peut être classée comme une mutation sévère induisant des CF ou comme une mutation modérée induisant une CFTR-RD. L'allèle D443Y-G576A-R668C a été classé comme seulement une mutation CFTR-RD. En outre, dans notre laboratoire, en association avec G576A et R668C, une mutation rare G149R [p.Gly149Arg] a été observée chez un individu hétérozygote F508del (p.Phe508del) atteint de la mucoviscidose. Cette mutation G149R affecte une boucle intracytoplasmique du domaine transmembranaire 1 (figure 31) et avait déjà été détectée chez un patient ABCD (Mercier *et al.*, 1995). Toutefois, il n'est pas facile de vraiment déterminer le rôle et les effets de ces associations dans la pathogénicité de la maladie. Ainsi, cette étude vise à révéler l'effet des mutations seules ou associées sur la localisation, la maturation et l'activité des protéines CFTR en vue de la compréhension de leur impact fonctionnel.



Figure 31 : Domaines de CFTR et emplacement des mutations faux sens étudiées chez les patients présentant des phénotypes différents (G149R est localisée dans la première boucle intracytosolique du domaine transmembranaire MSD1, D443Y et G576A dans le domaine NBD1 et enfin R668C dans le domaine régulateur).

II-2- Contexte bibliographique

Les allèles complexes *CFTR* sont susceptibles de jouer un rôle dans la relation génotypephénotype dans les CF. Chaque fois que des génotypes mutés apparemment identiques sont retrouvés chez les sujets présentant des phénotypes divergents, une recherche de mutations dans l'ensemble du gène est obligatoire (Lucarelli *et al.*, 2010). A l'heure actuelle, de nombreuses associations de plusieurs mutations ont été signalées dans le gène *CFTR*. L'existence d'au moins deux mutations ou variations de séquence sur le même allèle a été nommé allèle complexe (Savov *et al.*, 1995 ; Fanen *et al.*, 1999 ; Romey *et al.*, 1999 ; Clain *et al.*, 2001 ; Rohlfs *et al.*, 2002 ; Clain *et al.*, 2005). La plupart des allèles complexes représentent des associations d'une variation bénigne avec une mutation pathogène dans le même allèle (Rowntree et Harris, 2003). De plus, certaines combinaisons de mutations sévères sur le même allèle entraînent un phénotype moins sévère, ou à l'inverse, des combinaisons de mutations légères en entraînent un phénotype plus sévère comme la mucoviscidose (Clain *et al.*, 2001). De tels exemples où la mutation du second site peut moduler l'effet de la mutation principale ont été décrits par Dork *et al.*, (1991), Hung *et al.*, (1998) et Romey *et al.*, (2000).

II-3- Articles & Communications

ARTICLE 3 : <u>Functional characterization of complex *CFTR* mutants:</u> <u>understanding of genotype-phenotype and structure-function correlations (en</u> <u>cours de rédaction)</u>

Communication affichée : Paris

Functional characterization of frequent complex *CFTR* mutants (Publication No. 3)

Functional characterization of complex *CFTR* mutants: understanding of genotype-phenotype and structure-function correlations

Ayman El-Seedy ¹, Emmanuelle Girodon ², Caroline Norez ¹, Julie Pajaud ¹, Marie-Claude Pasquet ³, Thierry Bienvenu ⁴, Marie des Georges ⁵, Faïza Cabet ⁶, Guy Lalau ⁷, Eric Bieth ⁸, Martine Blayau ⁹, Frédéric Becq ¹, Alain Kitzis ^{1,3}, Pascale Fanen ², and Véronique Ladeveze ¹

(Cet article est en préparation et ne présentera que les résultats obtenus récemment avec les

plasmides pTCF-wt et mutés).

Address:

¹ Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS UMR 6187, Université de Poitiers, Poitiers; ² INSERM U955 équipe 11, Université Paris-Est UMR-S955 et AP-HP Groupe hospitalier Henri Mondor , 94010 Créteil; France ³ CHU de Poitiers, Poitiers; ⁴ Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Groupe hospitalier Cochin-Saint Vincent de Paul, AP-HP, 75679 Paris, France; ⁵ Laboratoire de Génétique Moléculaire, IURC, CHU de Montpellier, Montpellier, 34093; ⁶ Service d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies rares, Centre de Biologie et Pathologie Est, CHU de Lyon, Bron, 69677; ⁷ Pôle de Biochimie et Biologie Moléculaire, Centre de Biologie Pathologie, CHU de Lille, Lille, 59037; ⁸ Service de Génétique Médicale, Hôpital Purpan, Toulouse, France; ⁹ Laboratoire de Génétique Moléculaire, CHU Pontchaillou, Rennes, 35033, France.

Short running head: Functional characterization of frequent complex CFTR mutants

Corresponding author and reprint request: Véronique Ladevèze

Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS UMR 6187,

Université de Poitiers, 86021 Poitiers, France.

TEL: + (33) 5 49 45 49 73

FAX: + (33) 5 49 45 49 72

E-mail: veronique.ladeveze @univ-poitiers.fr

ABSTRACT

Cystic fibrosis is caused by mutations in the *CFTR* gene that encodes a chloride channel and regulator for other channels in epithelial cells, resulting in a defective function of CFTR protein and producing a wide range of effects contributing to the clinical phenotype. Here we have investigated the effect of these alleles in different genotypes on the CFTR protein localization and function to disclose its impact on the clinical phenotype. The subcellular localization of the single mutant p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala and p.Arg668Cys has shown membrane localization whereas p.Gly149Arg mutation appears to be retained within the endoplasmic reticulum. The double and triple mutants have shown to be exclusively cytoplasmic consistent with an endoplasmic reticulum localization. Western blot and functional analyses of CFTR activity indicated that the double and triple mutants had effects on maturation of CFTR protein and altered CFTR activity. The results indicated that the p.Gly576Ala and p.Arg668Cys mutation clearly showed normal effect upon CFTR protein whereas p.Asp443Tyr significantly reduced the total amount of mature protein. The Arg668Cys variant acts as a real mild mutation and generally conferred mild disease. Furthermore, the p.Gly149Arg mutation was demonstrated misprocessing and mistrafficking. More severe effect on CFTR mutant proteins was present when these mutations combined in complex alleles, supporting the influence of these frequent alleles on the clinical features of CF patients. These findings suggest a genotype-phenotype correlation with regard to the structure- function relation of these alleles as a good predictor of clinical consequences of the CFTR defect.

KEY WORDS: Cystic fibrosis; CF; CFTR; complex allele; p.Asp443Tyr; p.Gly576Ala; p.Arg668Cys; p.Gly149Arg; CFTR structure and function; protein localization; maturation; Functional analysis

INTRODUCTION

The Cystic Fibrosis (CF) Transmembrane conductance Regulator (CFTR) protein is a cyclic AMP-regulated chloride channel [Riordan et al., 1989; Anderson et al., 1991]. The CFTR gene encodes a large transmembrane protein of 1480 amino acids with a symmetrical, multidomain structure consisting of two membrane-spanning domains, two nucleotide binding folds (NBF1, NBF2), and a central, highly charged regulatory (R) domain with multiple phosphorylation consensus sites [Gallati, 2003]. In addition to its function as a Cl⁻ channel, CFTR acts as a regulator of other channels and transporter [Mehta et al., 2005]. More than 1700 CFTR gene mutations have been found in patients with CF [Welsh 2001], one of the most frequent autosomal recessive disease in the Caucasian population, and milder forms termed CFTR-related disorders (CFTR-RD), where there is evidence of CFTR dysfunction but the diagnosis criteria for CF are not met [Castellani et al, 2008; Cystic Fibrosis Mutation Database, http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/, 2009). Phenotype heterogeneity is partly due to mutational and genotype heterogeneity. Generally, patients with the classic form of CF have CF-causing mutations in each copy of the CFTR gene, whereas patients with a CFTR-RD may have a CF mutation in one copy and a mild mutation in the other allele, or mild mutations in both copies [The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, 1993; Castellani et al., 2008]. However, variable phenotypes have been observed associated with a given genotype. Little is known about the molecular mechanism by which mutations affect the CFTR function, with only a minority of mutations being characterized by functional studies. The steadily increasing description of polymutant variants on a same allele, named complex alleles [Savov et al., 1995; Fanen et al., 1999; Romey et al., 2000, Clain et al., 2001, CF mutation database], somewhat entangles diagnosis and genetic counselling in certain situations. Some variants have been considered neutral because they were identified in the non CF allele of parents of CF patients, but seem to be involved in moderate forms or syndromes of late onset, as was the case for p.Arg668Cys and p.Gly576Ala [Fanen et al., 1992]. These mutations have been described in isolation and associated in complex alleles, together and with other mutations, p.Asp443Tyr and p.Gly149Arg, notably in infertile patients with congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD) but also in CF [Chillon et al., 1995; Costes et al., 1995; Pignatti et al., 1995; Mercier et al., 1995; Bienvenu et al., 1997; Abramowicz et al., 2000; Ratbi et al., 2007].

Better knowledge of the phenotypic consequences of *CFTR* mutations is important to understand their respective effect and the relationship between CFTR structure and function, in a view to help diagnosis, prognosis and to offer appropriate genetic counselling to the families. Of note, it has been shown that p.Gly576Ala is actually a splicing defect responsible for exon 12 skipping [Pagani et al., 2003]. We thus implemented a collaborative study through the French CF laboratory network to collect all cases of patients and individuals carrying p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala, p.Arg668Cys and p.Gly549Arg, in isolation or in complex alleles, and provide epidemiological data on these mutations. We also achieved comprehensive functional studies of these isolated or complex mutants to understand their functional impact on the CFTR localization, maturation and function.

MATERIAL AND METHODS

Patients and individuals

Patients and individuals known to the French CF Laboratory Network before 1st January 2009, who were heterozygous for the p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala, p.Arg668Cys and p.Gly149Arg mutations, either in isolation or in a complex allele, were included. Reason for testing (CF, CBAVD, DB, IP, other CFTR-RDs and carrier testing) were recorded along with detailed phenotypic data whenever available. Complete genotypes were documented. Written consents to the genetic study were obtained from the patients and/or their family and from healthy subjects.

Epidemiological study in the French general population

The allelic prevalence of the p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala, p.Arg668Cys and p.Gly149Arg mutations, either in isolation or in a complex allele, and 95% Confidence Interval (CI) were determined by allele counting in a sample of healthy adult individuals of the French general population. Data were compiled from 1423 individuals screened in four molecular genetics laboratories (Montpellier, Lille, Toulouse and Créteil) as results of testing for p.Arg668Cys, p.Gly576A and p.Asp443Tyr. 791 of them had a complete scanning of the coding regions and 632 had a partial analysis. 1123/1423 individuals were healthy partners of CF carriers or CF patients and had no personal or family history of CF or CFTR-RD. The other 300 were from the general population.

Mutation Nomenclature

Mutations at the protein level were named according to the recommendations of the Human Genome Variation Society (http://www.hgvs.org/mutnomen/).

CFTR Genotype Analysis

Genomic DNAs were extracted from whole blood or amniotic fluid samples collected on EDTA using various protocols. Extensive *CFTR* gene analyses were performed in the patients

and healthy individuals using a combination of methods including: (i) screening for frequent mutations using diverse commercial assays; (ii) scanning of the 27 exons and their boundaries using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [Fanen et al., 1992] or denaturing high pressure liquid phase chromatography (DHPLC) [Le Marechal et al., 2001] or SSCA (Single Strand Conformation Analysis), followed by sequencing to characterize the variants; (iii) screening for the intronic splicing 1811+1.6kbA>G mutation (c.1679+1634A>G) [Chillon et al., 1995b]; (iv) screening for large *CFTR* rearrangements using a semi-quantitative fluorescent multiplex PCR (QFM-PCR) assay [Niel et al., 2004, Taulan et al., 2007].

Construction of a green fluorescent protein (GFP)-tagged mutated CFTR.

The GFP-tagged CFTR plasmids (wild-type (WT), and F508del-CFTR) were generously provided by B. Stanton (Dartmouth Medical School, Hanover, NH). Specific mutation substitutions alone (p.Gly149Arg, p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala and p.Arg668Cys) or in different associations were introduced into the WT-CFTR plasmid using the Gene tailor site-directed mutagenesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) using the designed primers and according to the manufacturer's protocol (Fig.1 and Table1). The sequence of each plasmid containing the desired mutations in individual clones was controlled through plasmid sequencing on both strands using the ABI PRISM Big Dye Terminator[™] Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems).

Cell culture and Transient transfection

Hela cells were grown in a DMEM medium with Glutamax-I (Life Technologies) amended with 10% fetal bovine serum (FBS;Gibco) and 100 unit/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin in humidified incubator at 37°C in the presence of 5% CO₂. Wild-type and mutant *CFTR* were transiently expressed in HeLa cells using LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Examination of distribution of GFP-CFTR by confocal microscopy

Forty-eight hours after transfection, Hela cells were washed twice with ice-cold PBS and fixed in paraformaldehyde (3% in TBS) for 10 min at 4 °C. Nuclei were stained with TOPRO-3 iodide (1:1000 in TBS, Molecular Probes). Cover glasses containing cells were mounted in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Images were acquired using a reversed microscope (Olympus IX 70) equipped with a laser scanning confocal unit (model MRC-1024, BioRad), a 15 m W krypton-argon laser, and a X60 water immersion objective. GFP fluorescence was excited using the 488 nm laser line and collected using a standard fluorescein isothiocyanate filter set (522±32 nm). Fluorescence associated with TOPRO-3 iodide was excited using the 647 nm laser line and collected using a filter set (680±32 nm). Double fluorescence images were generated simultaneously. For Golgi complex staining, fixed cells were blocked by three washes in PBS/3% BSA. Coverslips were incubated for 1 h with Golgi p58 K antimouse antibody (Sigma, Poole, UK) at a 1:100 dilution. To detect the endoplasmic reticulum (ER), after paraformaldehyde (3% in PBS), cells were washed twice with PBS and were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS, incubated with Anti-calreticulin (Cambridge Bioscience, Cambridge, UK) for 1 h in PBS containing 3% bovine serum albumin, and washed 3 times for 5 min with PBS. Secondary antibody incubation was performed for 45 min in PBS containing 3% bovine serum albumin, after which the cells were washed as described above. Subsequently, cells were mounted in appropriate medium.

Western Blot Analysis

24 h after transfection, cells were harvested, and resuspended in RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, and 100 mM NaCl, 1% Triton X-100) buffer supplemented with protease inhibitors (Roche Diagnostics). Cell lysates were incubated on ice for 30 minutes and clarified by centrifugation at 15,000 g for 10 minutes at 4°C. Total proteins were quantified using the

BCA protein assay reagent (Sigma), and 50 μ g of proteins were analysed onto a SDS-PAGE according to Laëmmli and Favre [Laëmmli and Favre, 1973]. Whole cell lysates were separated on a 5 % SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories Inc.) and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with 5% non-fat dry milk in 0.1% Tween 20 in PBS at 4°C overnight. Then the membranes were washed in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T). Primary antibody was incubated for 1 h against *CFTR* protein (clone M3A7, Chemicon) in PBS. M3A7 is a mouse monoclonal antibody that recognizes an epitope at the C-terminal, in the region of residues 1370 to 1380. Mouse anti β-actin monoclonal antibody (1/10 000 in 5% w/v dry milk) was applied to detect β-actin. The membranes were washed with PBS-T three times and then incubated with the horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma) for 1 h. They were washed in PBS-T a gain and the blots were developed with chemiluminescence with ECL kit (Amersham Biosciences) and visualized on x-ray film after a 1-15 min exposure. Immunoblots were quantified using DuoScan transparency scanner and scion image software (developed by U.S. NIH, http://www.scioncorp.com/).

Single cell measurement of CFTR activity

CFTR function was assessed by single-cell fluorescence imaging, using the potential-sensitive probe, bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid)trimethine oxonol (DiSBAC₂(3); Molecular Probes, Eugene, OR), as previously reported [Renier et al., 1995; Norez et al., 2009]. Fluorescence intensity was recorded by confocal laser scanning microscopy using Bio-Rad MRC 1024 equipped with 15 mW Ar/Kr gas laser (Hemel Hempstead, UK). Maximal resolution was obtained with Olympus plan apo X60 oil, 1.4 NA, objective lens. Fluorescence signal collection was performed through the control software Lasersharp 3.2 (Hemel Hempstead, UK). The resolution time was 30 s. Bis-oxonol slowly distributes across biological membrane according to the membrane potential and binds to hydrophobic cell components; since the

quantum yield of the dye increases impressively upon the binding, the fluorescence of cells incubated in a medium containing bis-oxonol increases upon depolarization and, conversely, decreases with hyperpolarization [Dall'Asta et al., 1997]. In our experiments, CFTR-dependent current was stimulated by application of Forskolin + Genistein (noted Fsk+Gst), inducing a depolarization characterized by an increase of the fluorescence. On the contrary, CFTR-dependent current was inhibited by application of CFTR_{inh}-172 characterized by a decrease of the fluorescence. Results are presented as transformed data to obtain the percentage signal variation (Fx) relative to the time of addition of the stimulus, according to the equation : Fx = ([Ft-F0]/F0]X100 where Ft and F0 are the fluorescent values at the time t and at the time of addition of the stimulus, respectively. For histogram representation, the values correspond to the level of stable variation of fluorescence induced by each drug.

RESULTS

Phenotypic description of patients carrying p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala, p.Arg668Cys and/or p.Gly149Arg in varied combinations

A total of 102 patients and healthy individuals carrying at least one allele p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala, p.Arg668Cys and/or p.Gly149Arg, in isolation or in a complex allele, were identified, reported by six laboratories (Table 2): 82 were referred for diagnostic request including 3 CF, 9 suspicion of CF, 8 DB, 5 chronic sinus disease, 1 idiopathic pancreatitis, 47 CBAVD, 2 other infertility and 7 fetal bowel anomalies; 20 were referred for genetic counselling purposes. In these 20 cases, exons 12, 13 and 9 were tested, in the framework of a complete study of the coding regions or complementary to search for frequent anomalies because of specific or geographic origins (Dequeker et al., 2009). The 3 classical CF cases carried the p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys] complex allele in combination with a severe CF mutation in the other allele. Genotypes including p.Gly149Arg and a severe CF mutation *in trans* were not found in any other patient with a mild disease, thereby leading to

suspect that the major deleterious effect of the complex allele is attributed to p.Gly549Arg. Strikingly, the most frequent phenotype associated with combinations of p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala and p.Arg668Cys was CBAVD, found in 47 patients. 38 of them had a severe CF mutation *in trans*, including 27 p.Phe508del. 42/47 carried the triple mutant p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]. Of the 7 cases of fetal bowel anomalies, 5 carried a severe CF mutation *in trans*. The outcome was known in 5 cases: one baby, with the triple mutant p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys], was considered affected with mild CF whereas the two older brothers carrying the same genotype had been unrecognized as CF patients until then (Abramowicz et al., 2000); 2 had not CF (follow-up and normal sweat test); termination of pregnancy was carried out in another case for chromosomal abnormality and fetal death occurred in the last case in the context of intra-uterine growth retardation. Of the 20 healthy individuals, 6 had a severe CF mutation *in trans*: 1 carried the triple mutant p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys], 4 the double mutant p.[Gly576Ala;Arg668Cys] and 1 p.Arg668Cys in isolation. These observations strongly argue against a severe deleterious effect of these alleles.

Epidemiological data in the French general population

Of the healthy individuals screened, 1423 26 were heterozygous for p.[Gly576Ala;Arg668Cys] (allelic frequency 0.91%); 4 for p.[Asp443Tvr;Glv576Ala;Arg668Cvs] (allelic frequency 0.14%); 2 for p.Arg668Cvs; 2 for p.Gly576Ala (allelic frequency for each 0.07%) and 1 for p.[Ser519Gly;Gly576Ala;Arg668Cys] (allelic frequency 0.04%). No homozygote or compound heterozygote was found. Of the subset of 791 individuals who benefited from a complete study, none was found to carry p.Glv149Arg.

121

Subcellular localization of CFTR mutants

Confocal microscopy was used to determine the subcellular localization of wild-type and mutant GFP-CFTRs in transfected HeLa cells (Fig. 2). As the first control, GFP when expressed alone, localized to the cytoplasm (Fig. 2, A), the wild-type-CFTR was clearly present at the cell membrane whereas p.Phe508del-CFTR localized preferentially in the endoplasmic reticulum (ER) compartment (Fig. 2B and 2C). Mutants p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala, p.Arg668Cys showed a cell membrane protein distribution similar to that of the wild-type CFTR protein (Fig. 2, D-F). However, p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys], and p.[Gly576Ala;Arg668Cys] showed subcellular distribution consistent with an aggregated form in the cytoplasmic as well as plasma membrane staining (Fig. 2; G-H). But p.Gly149Arg and p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys] present the same localization as p.F508del in ER (Fig.2, I and J).

To explore the subcellular localization of CFTR mutants in more detail, we performed colocalization studies with cellular marker proteins in HeLa cells transfected by different mutants. As shown in Fig. 3B, there was an apparent colocalization of CFTR with the Golgi marker protein (p58k) in mutant CFTR proteins p.Asp443Tyr. However, no colocalization between CFTR protein and p58k in other mutant CFTR was observed. Calreticulin (a soluble protein resident in the ER lumen) but also found weakly in other membrane-bound organelles, the cell surface and extracellulary. Immunofluroescent labelling of CFTR mutants with ER marker in HeLa cells showed that the double mutant p.[Gly576Ala;Arg668Cys] observed in individuals is studied as other complex alleles not detected (p.[Asp443Tyr;Gly576Ala], p.[Asp443Tyr;Arg668Cys], p.[Gly149Arg;Asp443Tyr], and p.[Asp443Tyr;Gly576Ala]) appeared to localize to distinct areas of the cytoplasm, a perinuclear-endoplasmic reticulum (ER) localization mutants (Fig. 4A,c). The triple **CFTR** mutants p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;.Arg668Cys] appeared to localize to distinct areas of the cytoplasm, a perinuclear-endoplasmic reticulum (ER) localization (Fig. 4A,d) whereas p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys] is retained in the ER (Fig. 4A,e). Thus, from these data we concluded that mutant CFTR protein accumulates at or close to the ER or ER-derived membranes in transfected HeLa cells.

Processing of CFTR Mutants

To study the trafficking of p.Gly149Arg, p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala mutations and p.Arg668Cys polymorphism in different genotypes combination when they expressed in HeLa cells, we performed a Western blot (WB) analysis. In WB experiments, a band of lower molecular mass than band B was detected by using M3A7 antibody. This band was previously shown to correspond to a polypeptide resulting from usage of an alternative translation initiation site of the CFTR mRNA [Chang et al., 1999; Farinha et al., 2004]. As illustrated in Figure 3, the relative a mount of fully glycosylated proteins (band C) is not different between p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala, p.Arg668Cys mutations and WT-CFTR, confirming that these mutant proteins can fold and trafficking normally to the plasma membrane in HeLa cells. However, the p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala and p.Arg668Cys mutants produced significantly less band C (60%, 78.5 % and 77.5 % of the total CFTR, ratio C/(B+C)) than wild-type 82.5%; Fig. 3B). These results present decrease of C/(B+C) in p.Asp443Tyr mutation transfected cells. This decrease (around 20% compared to the WT-CFTR) is statistically significant (p< 0.025) when Kruskal Wallis test (http://www.viesanimales.org) is performed.

In addition, p.[Gly576Ala;Arg668Cys] showed a faint band C whereas maturation patterns of mutant CFTR (p.Phe508del-CFTR), p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;.Arg668Cys], and p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys], represent the immature, partially glycosylated protein (band B) that is located in the endoplasmatic reticulum (Fig 4B and 4C). This indicates that these mutations caused a misprocessing defect and decreased the mature CFTR form. These results consistent with subcellular localization data as p.Phe508del-CFTR were not detectable

in the plasma membrane. However, the findings support the hypothesis that differences in CF phenotype could be related to the effect of the genotype on CFTR protein production and function.

Functional analysis of CFTR activity in CFTR mutants

To determine the impact of the p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala mutations and p.Arg668Cys polymorphism in single, double or triple genotypes on CFTR chloride channel function, we expressed full-length wild-type and mutant proteins in HeLa cells and measured chloride channel activity by single-cell fluorescence imaging using the potential-sensitive probe, bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid) trimethine oxonol [DiSBAC₂(3); Molecular Probes, Eugene, OR]. The CFTR Cl⁻ channel conductance has been detected in plasma membrane in wild-type CFTR and mutants CFTR; p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala and p.Arg668Cys whereas not observed in the negative control cells transfected with either GFP or p.Phe508del-CFTR (Fig. 3D). Furthermore, we showed that the previous CFTR mutants channel exhibit mixed properties of the WT-CFTR and reduced level of active CFTR. This demonstrates the presence of active CFTR at plasma membrane.

In contrast, CFTR activity was not detected in the cell transfected with p.Gly149Arg, p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys], p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys]. These channels therefore were more closely similar to p.Phe508del-CFTR. In addition, the activation of p.[Gly576Ala;Arg668Cys] mutation by forskolin and genistein represent strongly lower levels of CFTR activity at plasma membrane (Fig.4D).

In summary, Table 3 demonstrate all differences into genotypes of *CFTR* mutants by changes on subcellular localization, protein processing and Cl⁻ channel activity which were characterized in this study. The mutations p.Gly576Ala and p.Arg668Cys revealed a decrease of CFTR activity when compared with WT and p.Asp443Tyr mutation. Although these mutations lead to normal maturation of CFTR protein, except for p.Asp443Tyr which showed

124

decrease in processing efficiency. We also found a low level of the CFTR activity and processing efficiency of the p.[Gly576Ala;Arg668Cys] mutation The p.Gly149Arg mutation lead to a cellular mislocalization, misprocessing of the CFTR protein, as well as CL⁻ channel activity. In addition, both p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys] and p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys] are similar to the pattern of p.Gly149Arg mutation.

DISCUSSION

Cystic fibrosis (CF), in its classic form, is characterised by chronic pulmonary disease, pancreatic insufficiency, intestinal obstruction, male infertility and elevated sweat chloride [Welsh et al., 2001]. The clinical spectrum of CF disease is much broader than previously believed; disease-causing or putative CFTR gene mutations have been identified in patients with "atypical" or monosymptomatic manifestation, including chronic bronchitis and chronic sinusitis with nasal polyposis, and in men with infertility due to obstructive azoospermia [Wiatrak et al., 1993; Anguiano et al., 1992]. However, its clinical expression can vary widely and partly depends on the nature of the underlying mutation genotype [Zielenski and Tsui, 1995]. In the present study, we analyzed the consequence of two frequently found CFTR mutations p.[Gly576Ala;Arg668Cys], or three p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys], or more rarely p.[Gly149Arg; Gly576Ala;Arg668Cys] in vitro to investigate the pathogenesis of these mutations upon clinical phenotypes. Until recently, it is not yet entirely clear how these mutations contribute to phenotype and their effects on the cellular level. Here, we exclusively evaluated the impact of these mutations in single, double or triple genotypes on the CFTR processing along with functional characterization. We compared the clinical characteristics of patients with functional investigations. Immunofluoresence staining was performed to detect the localization of wild type and CFTR mutants. Protein level in Hela cells was evaluated by Western blot after transfection.

The mutations in patients with CBAVD may result in a CFTR protein with a normal structure but low levels of expression [Osborne et al., 1993], which may cause disease only in the organs most sensitive to CFTR dysfunction, such as the vas deferens [Trezise et al., 1993; Tizzano et al., 1993]. The p.Asp443Tyr mutation is frequently observed in CBAVD patients and in patients with idiopathic chronic pancreatitis. It is also frequently associated in cis with other missense mutations p.Gly576Ala and p.Arg668Cvs, [Bienvenu T, personnel communication]. Western blot analyses showed a reduced expression level of the p.Asp443Tyr mutated CFTR protein and the cellular localization showed that a part of this mutant protein is trapped in the Golgi apparatus and is not transferred to the plasma membrane, which reduces the overall expression but the CFTR function was approximately similar to the positive control reaction. This indicated that the amount of mature CFTR protein is sufficient for normal Cl⁻ channel conductance. The p.Gly576Ala is a missense mutation that resulted in a severe splicing defect, with only 7% of normal exon12+ mRNA transcripts and cause CFTR exon 12 skipping [Pagani et al., 2003]. This result is consistent with the findings found in this study which showed normal maturation of the CFTR protein but a decrease in the activity of functional protein. Recent studies by Castellani et al. [2008] reported that p.Gly576Ala mutation may belong to CF-causing or CFTR-related disorders. The p.Arg668Cys polymorphism has been reported with high frequencies in patients with disseminated bronchectasis, asthma and CBAVD [Pignatti et al., 1995; Pignatti et al., 1996; Girodon et al., 1997; Lazaro et al., 1999; Kanavakis et al. 1998] and recently found in patients with pancreatic-sufficient CF, alcoholic chronic pancreatitis [Casal et al., 2004] and CBAVD patients (the current study). In addition, it was found in a patient with pancreatic insufficiency when present in cis with other CFTR mutation as reported by Krasnov et al., [2008]. In fact, the Arg668Cys variant acts as a real mild mutation and generally conferred mild disease.
Furthermore, p.Gly576Ala and p.Arg668Cys mutations are documented in US Hispanic CF population with a relative frequency greater than 1% [Iris et al., 2005].

The non classic CF forms, including late-onset pulmonary disease, bronchiectasis, and congenital bilateral absence of vas deferens or idiopathic pancreatitis were associated with the presence of the p.Gly576Ala allele combined with the p.Arg668Cys polymorphism [Polizzi et double al.. 2008]. The mutant allele p.[Gly576Ala;Arg668Cys] and p.[Asp443Tyr;Gly576Ala] represent apparently a weak response of CFTR activity comparable to cells transfected by WT-CFTR due its ER retention of these mutations. Such decrease of the CFTR chloride channel function most likely results from reduced a mount of mature protein and therefore the CFTR channel density in the plasma membrane. It appears that the combination of p.Gly576Ala and p.Arg668Cys alleles reflected variable degree of CF Additionally, disease phenotype. the complex **CFTR** genotype p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys] which is primarily associated with male infertility (CBAVD) was recently found in a patient with chronic pancreatitis [Casal et .al., 2004]. The present findings showed that this genotype has incomplete maturation and mislocalization of CFTR protein. Thus, one could propose that p.[Gly576Ala;Arg668Cys] allele decrease the level of CFTR protein expression and activity as shown in this study. This complex allele had been reported in a family exhibit a mild CF phenotype and it is therefore possible that the inclusion of the p.Asp443Tvr mutation to this allele result in the CF phenotype [Rowntree and Harris, 2003] and severity of this genotype. The phenotype variability seen in this allele could be determined by other non-CFTR genes acting as possible modifier of disease expression which could explain the pathogenic role of this allele.

More interesting, the complex CFTR allele p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys] that has been found in CF patients, containing the p.Gly149Arg in exon 4, p.Gly576Ala in exon 12 and p.Arg668Cys in exon 13 and p.Phe508del on the other allele in a compound

127

heterozygote. This finding is in accordance with current study demonstrating an incomplete maturation and mislocalization of *CFTR* protein. The missense mutations p.Gly149Arg lead to substitution of amino acid alterations in more conserved portions of the *CFTR* protein, was previously reported in a CBAVD patient [Mercier et al. 1995]. It was associated to frequent mutations tested in this study. This indicate the importance of this association which showed the accumulation of deleterious effect of different CFTR gene mutations upon CFTR protein to be cause of CF rather than these mutations a lone.

To investigate the impact of different compound association in more detail, we established further combination structure which not found in the subjects for further study of the previous mutations. Interestingly, we noted that p.Gly149Arg, p.[Asp443Tyr; Arg668Cys], p.[Gly149Arg;Asp443Tyr], and p.[Gly149Arg;Asp443Tyr;Gly576Ala], p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys], p.[Gly149Arg;Asp443Tyr;Gly576Ala; p.Arg668Cys] inhibit *CFTR* maturation by altering the glycosylation of *CFTR*. The absence of glycosylation is consistent with the hypothesis that these mutant proteins are trapped in the ER and are not transferred to the Golgi apparatus where the glycosylation takes place.

The poly-T tract (Tn), near a poly-TG repeat [(TG)m], in the branch/acceptor splicing site of intron 8 exists in three variants with 5, 7 or 9 thymidines (the T5, T7 and T9 alleles respectively) [Kiesewetter et al., 1993]. The T7 and T9 alleles generate a predominantly normal transcript, whereas the T5 variant generates two transcripts, one normal with exon 9 intact and the other with an in-frame deletion of exon 9. The translated product of the CFTR transcript lacking exon 9 is apparently devoid of cAMP-activated chloride conductance [Jézéquel et al., 2000]. For the polymorphic IVS8 (TG)mTn, haplotype TG11/T7 was the most common in all studied subjects.

Most cases of cystic fibrosis (CF) are caused by mutations that block the biosynthetic maturation of the CF gene product, the CF transmembrane conductance regulator (CFTR)

chloride channel. CFTR-processing mutants fail to escape the endoplasmic reticulum and are rapidly degraded [Comet-Boyaka et al., 2004]. The most common mutation is the Δ F508 mutation, which localizes to the first nucleotide-binding domain (NBD1) and is present on \approx 90% of all CF chromosomes. Little or no p.Phe508del-CFTR protein escapes the endoplasmic reticulum (ER) under normal conditions; instead, this mutant is rapidly degraded by the proteasome [Ward et al., 1995]. We have shown that CFTR mutants p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala, p.Arg668Cys, p.[Asp443Tyr;Gly576Ala], p.[Gly576Ala;Arg668Cys] can be expressed in the plasma membrane of HeLa cells. Abnormal function of p.Gly149Arg, p.[Gly149Arg;Asp443Tyr], p.[Gly149Arg;Asp443Tyr;Arg668Cys], p.[Gly149Arg; Gly576Ala;Arg668Cys], p.[Gly149Arg;Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys] and p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys] mutations like p.Phe508del-CFTR suggest that the ER retention of these mutants result in the absence of normal Cl⁻ channel conductance.

Taken together, these results provide different *CFTR* activities between *CFTR* constructs. This behaviour could be due to some mutant pairs may be able to complement each other by increasing the overall *CFTR* function, but other mutant pairs may not. This may explain some of the phenotypic variation in patients with CFTR mutation, especially those with some residual function [Zerhusen et al., 1999]. There are examples where the second site mutation can modulate the effect of the principal mutation [Dork et al., 1991; Hung et al., 1998; Romey et al., 2000]. The findings support the hypothesis that differences in CF phenotype could be related to the effect of the genotype on *CFTR* protein production and function.

In conclusion, we propose that the subcellular localization and functional analysis of *CFTR* are useful to confirm the precise phenotypic consequences of the complex *CFTR* alleles. Subsequently, these compound genotypes should alert the clinicians which provide the insight on pathological impacts of these structures upon the possibility that they may

129

contribute to *CFTR* phenotype. It is also very efficient and sensitive for mutation diagnosis of compound heterozygote in patients. This study may also provide useful information on the role of allelic heterogeneity in CF disease and might prove beneficial to CF patients. Further studies of such alleles with complex genotypes among cystic fibrosis patients will allow detailed characterization of the regulation of *CFTR* gene expression.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. B.R. Stanton for providing the CFTR-plasmids (Dartmouth College, Hanover, NH). We also thank Anne Cantereau for her excellence assistance with the use of the confocal laser microscope. We are grateful to several colleagues providing us with reagents and for stimulating discussions. This work was supported by Poitiers Hospital and University of Poitiers, France. C. Norez and F. Becq are supported by grants from the French association "Vaincre la Mucoviscidose".

REFERENCES

- Abramowicz MJ, Dessars B, Sevens C, Goossens M, Boulandet EG. 2000. Fetal bowel hyperechogenicity may indicate mild atypical cystic fibrosis: a case associated with a complex CFTR allele. J Med Genet 37: 8-15.
- Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ.1991. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. Cell 67: 775-784.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM,
 Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting GR, Dequeker E, Dodge J, Doull I,
 Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti
 PF, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhrmann M, Tzetis M, Zielenski J, Elborn
 JS. 2008. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in
 clinical practice. J Cyst Fibros 7: 179-96.
- Chang XB, Cui L, Hou YX, Jensen TJ, Aleksandrov AA, Mengos A, Riordan JR. 1999.
 Removal of Multiple Arginine-Framed Trafficking Signals Overcomes Misprocessing of
 F508del CFTR Present in Most Patients with Cystic Fibrosis. Mol Cell 4: 137-4220.
- Rowntree RK, Harris A. 2003. The phenotypic consequences of CFTR mutations. Ann Hum Genet 67: 471-85.
- Chillon M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, Nunes V., Férec C, Stivill A. 1995. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. New Engl J Med 332: 1475-1480.
- Clain J, Fritsch J, Lehmann-Che J, Bali M, Arous N, Goossens M, Edelman A, Fanen P. 2001. Two mild cystic fibrosisassociated mutations result in severe cystic fibrosis when combined in cis and reveal a residue important for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing and function. J Biol Chem 276: 9045-9049.

- Clain J, Fritsch J, Lehmann-Che J, Bali M, Arous N, Goossens M, Edelman A, Fanen P. 2001. Two mild cystic fibrosis-associated mutations result in severe cystic fibrosis when combined in cis and reveal a residue important for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing and function. J Biol Chem 276: 9045-9049.
- Clain J, Lehmann-Che J, Girodon E, Lipecka J, Edelman A, Goossens M, Fanen P. 2005. A neutral variant involved in a complex CFTR allele contributes to a severe cystic fibrosis phenotype. Hum Genet 116: 454-460.
- Cormet-Boyaka E, Jablonsky M, Naren A, Jackson P, Muccio D, Kirk K. 2004. Rescuing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by transcomplementation. Proc Natl Acad Sci 101: 8221-8226.
- Dall'Asta V, Gatti R, Orlandini G, Rossi P, Rotoli B, Sala R, Bussolati O, Gazzola G. 1997. Membrane potential changes visualized in complete growth media through confocal laser scanning microscopy of bis-oxonol loaded cells. Exp Cell Res 231:260-268.
- Daniels GM, Amara SG. 1998. Selective labeling of neurotransmitter transporters at the cell surface. Methods Enzymol 296: 307-318.
- De Braekeleer M and Ferec C. 1996. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. Mol Hum Reprod 9: 669-677.
- Dequeker E, Stuhrmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M, Pignatti PF, Scheffer H, Schwartz M, Witt M, Schwarz M, Girodon E. 2009. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders – updated European recommendations Eur J Hum Genet 17, 51-65
- Dörk T, Wulbrand U, Richter T, Neumann T, Wolfes H, Wulf B, Maass G, Tümmler B. 1991.Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. Hum Genet 87, 441-446.

- Fanen P, Clain J, Labarthe R, Hulin P, Girodon E, Pagesy P, Goossens M, Edelman A. 1999. Structure-function analysis of a double-mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein occurring in disorders related to cystic fibrosis. FEBS Lett 452: 371-374.
- Fanen P, Ghanem N, Vidaud M, Besmond C, Martin J, Costes B, Plassa F, Goossens M. 1992. Molecular characterization of Cystic Fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. Genomics 13: 770-776.
- Farinhaa CM, Mendes F, Roxo-Rosaa M, Penque D, Amaral MD. 2004. A comparison of 14 antibodies for the biochemical detection of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein Molecular and Cellular Probes 18 235-242.
- Feldmann D, Couderc R, Audrezet MP, Ferec C, Bienvenu T, Desgeorges M, Claustres M, Mittre H, Blayau M, Bozon D, Malinge MC, Monnier N, Bonnefont JP, Iron A, Bieth E, Viviane D, Clavel C, Cazeneuve C, Girodon E. 2003. CFTR Genotypes in Patients with Normal or Borderline Sweat Chloride Levels. Human Mutation 22:340-346.
- Girodon E, Cazeneuve C, Lebargy F, Chinet T, Costes B, Ghanem N, Martin J, Lemay S, Scheid P, Housset B, Bignon J, Goossens M. 1997. CFTR gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. Eur J Hum Genet 5: 149–155.
- Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF, Kim SH. 1998. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. Nature 396: 703–707.
- Jézéquel P, Dubourg C, Le Lannou D, Odent S, Le Gall JY., Blayau M, Le Treut A, David V. 2000. Molecular screening of the CFTR gene in men with anomalies of the vas deferens: identification of three novel mutations. Mol Human Reprod 6: 1063-1067.
- Kanavakis E, Tzetis M, Antoniadi Th, Pistofidis G, Milligos S, Kattamis C. 1998. Cystic fibrosis mutation screening in CBAVD patients and men with obstructive azoospermia or severeoligospermia. Mol Hum Reprod 4:333–337.

- Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, et al. .1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science 245: 1073-1080.
- Kiesewetter S, Macek M, Davis C. *et al.* 1993. A mutation in *CFTR* produces different phenotypes depending on chromosomal background. Nature Genet 5: 274–278.
- Laemmli, UK, Favre M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. Journal of Molecular Biology 80: 575-599.
- Lazaro C, De Cid R, Sunyer J, Soriano J, Gimenez J, Alvarez M, Casals T, Anto JM, EstivillX. 1999. Missense mutations in the cystic fibrosis gene in adult patients with asthma.Hum Mut 14: 510–519.
- Loumia O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercot B, Denine R, Grangaud JP. 2008. CFTR mutations in the Algerian population. J Cyst Fibros 7: 54–59.
- Mercier B, Verlignue C, Lissens W, Silber SJ, Novelli G, Bonduelle M, Audrezet MP, Ferec C .1995. Is Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens a Primary Form of Cystic Fibrosis? Analyses of the CFTR Gene in 67 Patients. Am.J. Hum Genet 56: 272-277.
- Niel F, Legendre M, Bienvenu T, Bieth E, Lalau G, Sermet I, Bondeux D, Boukari R, Derelle J, Levy P, Ruszniewski P, Martin J, Costa C, Goossens M, Girodon E. 2006. A New Large *CFTR* Rearrangement Illustrates the Importance of Searching for Complex Alleles Hum Mut 27: 716-717.
- Niel F, Martin J, Dastot-Le Moal F, Costes B, Boissier B, Delattre V, Goossens M, GirodonE. 2004. Rapid detection of CFTR gene rearrangements impacts on genetic counselling in cystic fibrosis. J Med Genet 41: e118.
- Norez C, Antigny F, Noel S, Vandebrouck C, Becq F. 2009. A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype. Am J Respir Cell Mol Biol 41: 217-225.

- Pagani F, Stuani C, Tzetis M, Kanavakis E, Efthymiadou A, Doudounakis S, Casals T, Baralle FE. 2003. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. Hum Mol Genet 12: 1111-1120.
- Pignatti PF, Bombieri C, Benetazzo M, Casartelli A, Trabetti E,Gile LS, Martinati LC, Boner AL, Luisetti M. 1996. CFTR gene variant IVS8–5T in disseminated bronchiectasis. Am J Hum Genet 58: 889–892.
- Pignatti PF, Bombieri C, Marigo C, Benetazzo M, Casartelli A, Trabetti E, Gile LS, Martinati L, Boner A, Luisetti M. 1995. Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. Hum Mol Genet 4: 635–639.
- Pignatti PF, Bombieri C, Marigo C, Benetazzo M, Luisetti M. 1995. Increased incidence of cystic fibrosis gene mutations in adults with disseminated bronchiectsis. Hum Mol Genet 4: 4 635-639.
- Renier M, Tamanini A, Nicolis E, Rolfini R, Imler JL, Pavirani A, Cabrini G. 1995. Use of a membrane potential-sensitive probe to assess biological expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Hum Gene Ther 6: 1275-1283.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science 245: 1066-1073. (Erratum, Science 245:1437.)
- Romey MC, Pallares-Ruiz N, Mange A, Mettling C, Peytavi R, Demaille J, Claustres M. 2000. A naturally occurring sequence variation that creates a YY1 element is associated with increased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression. J Biol Chem. 275: 3561-3567.
- Savov A, Angelicheva D, Balassopoulou A, Jordanova A, Noussia-Arvanitakis S, Kalaydjieva L. 1995. Double mutant alleles: are they rare? Hum Mol Genet 4: 1169-1171.

- Taulan M, Girardet A, Guittard C, Altieri JP, Templin C, Beroud C, des Georges M and Claustres M. 2007. Large genomic rearrangements in the *CFTR* gene contribute to CBAVD M. BMC Med Genet 8: 22-27.
- The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis .1993. N Engl J Med 329:1308-1313.
- Tsui L-C .1992. The spectrum of cystic fibrosis mutations. Trends Genet 8: 392-398.
- Ward C.L., Omura S. and Kopito R.R. 1995. Degradation of CFTR by the ubiquitinproteasome pathway. Cell 83:121-127.
- Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F and Cutting GR. 2001. Cystic Fibrosis. In Scriver C, Vogelstein B, Beaudet AL, Childs B, Kinzler KW, Sly WS, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease (8th edn). McGrawHill, New York, pp. 5121– 5188.
- Zerhusen B, Zhao J, Xie J, Davis PB, Ma J. 1999. Single conductance pore for chloride ions formed by two cystic fibrosis transmembrane conductance regulator molecules. J Biol Chem 274(12):7627-7630.
- Zielenski J and Tsui L-C. 1995. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. Annu Rev Genet 29: 777-807.

Figure legends:

Figure 1: Schematic diagram of Human CFTR protein and the location of mutations studied in CFTR cDNA.

(A) The structural components of the CFTR protein, which include two membrane spanning domains (MSD1 and MSD2), two nucleotide-binding domains (NBD1 and NBD2), and a regulatory region (R).

(B) Partial representation of the plasmid covering exons 4 -13 of the CFTR cDNA, the exons are indicated by the boxes; the desired mutations in the current study are given above.

(C) Diagrammatic representation of Plasmid Constructs in dotted Lines illustrating (a) Single mutant, G149R (p.Gly149Arg, c.445 G>A), D443Y (p.Asp443Tyr, c.1347 G>T), G576A (p.Gly576Ala, c.1727 G>C) mutations and R668C (p.Arg668Cys, c.2002 C>T) polymorphism; (b-e) double mutant, p.[Gly576Ala;Arg668Cys], (f-h) triple mutant, p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys], p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys].

Figure 2: Subcellular localization of wild-type and mutant CFTR protein (green) in expressing HeLa cells assessed by confocal laser scanning microscopy. CFTR is stained green after cell permeabilization. (a) GFP protein, (b) wild-type or mutant GFP-tagged CFTR mutant proteins: p.Phe508del, p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala and p.Arg668Cys polymorphism. (d-f) p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala and p.Arg668Cys are targeted to the plasma membrane. Mutants p.Phe508del (c), p.[Asp443Tyr; Gly576Ala] (g) p.[Gly576Ala;Arg668Cys], (h) [p.Asp443Tyr;p.Gly576Ala;p.Arg668Cys], (i) Gly149Arg (j) p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys] are not targeted to the plasma membrane but either mislocalize, or diffuse in the cytoplasm compared with the wild-type transfected cells (j-o). A mean number of 15 cells were examined in 3 independent experiments for each CFTR protein analysed. Scale Bars, 10μm.

Figure 3. Functional analysis of wild-type and mutant GFP-tagged CFTR protein.

(A) HeLa cells were transiently transfected with wild-type (a) or mutant (b–d) GFP-tagged CFTR. Cells are stained for Golgi body with the Golgi 58K antibody followed by incubation with Alex-Fluor 555 goat anti-mouse secondary antibody. Cell nuclei were stained blue with TO-PRO-3 as indicated above each column. The last column shows the merged images of each row. Mutant proteins D443Y partially localize the cell membrane but retained within the Golgi body (c) and G576A (e) and R668C (d) show strong membrane fluorescence similar to the wild-type.

(**B**) Western blotting analysis of WT and mutant CFTR in transiently expressing HeLa cells. CFTR is detected by M3A7, a mouse monoclonal antibody that recognizes an epitope at the C-terminal of CFTR, in the region of residues 1370 to 1380. Arrows indicate positions of core-glycosylated (band B) and fully glycosylated (band C) forms of CFTR. Lane 1: GFP-WT-CFTR, lane 2: GFP-F508del-CFTR, lane 3: GFP-p.Asp443Tyr-CFTR, lane 4: GFP-p.Gly576Ala-CFTR, lane 5: GFP-p.Arg668Cys-CFTR, lane 6: GFP-p.Asp443Tyr;p.Gly576Ala; p.Arg668Cys-CFTR.

(C) Densitometric analysis of the CFTR bands. Efficiency of CFTR maturation is shown as the ratio of mature fully-glycosylated (band C) to total CFTR (bands C+B). Data represent the means \pm SEM of at least three independent experiments. *Significantly different from WT-CFTR (P<0.025).

(**D**) Properties of wild-type and mutant CFTR by fluorescence imaging. Histograms report the means of the relative fluorescence collected from separate experiments. Examples of typical time courses of relative fluorescence obtained at respect time. A mixture of forskolin $(10\mu M)$ + genistein $(10\mu M)$ is used to activate CFTR. CFTR_{inh} – 172 $(10\mu M)$ is used to inhibit CFTR. (A) HeLa cells transfected with wild-type (WT) CFTR as positive control, (F508del, GFP) as a negative control, and CFTR mutants; p.Asp443Tyr, p.Gly576Ala and p.Arg668Cys. Statistical significance is ***p< 0.001; **p<.01; *p<0.05; ns, non significant.

Figure 4. Functional analysis of wild-type or mutant GFP-tagged CFTR protein.

(A) HeLa cells were transiently transfected with mutant (a-d) GFP-tagged CFTR. Cells are stained for ER with the calreticulin antibody followed by incubation with Alex-Fluor 555 doneky anti-rabbit secondary antibody. Cell nuclei were stained blue with TO-PRO-3as indicated above each column. The last column shows the merged images of each row. Mutant p.Gly149Arg p.[Asp443Tyr;Arg668Cys] proteins (b), (c), [p.Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys] (d) and p.[Gly149Arg;Asp443Tyr;Arg668Cys] (e) were retained within the Endoplasmic Reticulum (ER) similar to the p.Phe508del-CFTR (a). (B) Western blotting analysis of WT and mutant CFTR protein in transiently expressing HeLa cells. CFTR is detected by M3A7, a mouse monoclonal antibody that recognizes an epitope at the C-terminal of CFTR, in the region of residues 1370 to 1380. Arrows indicate positions of core-glycosylated (band B) and fully glycosylated (band C) forms of CFTR. Lane 1: GFP-WT-CFTR, lane 2: GFP-p.Phe508del-CFTR, lane 3: GFP-p.Gly149Arg-CFTR, lane 4: GFP-Gly149Arg; p.Gly576Ala; p.Arg668Cys-CFTR.

(C) Western blotting analysis of the CFTR mutants: p.[Gly576Ala-p.Arg668Cys-CFTR] and p. [Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys].

(**D**) Properties of wild-type and mutant CFTR by fluorescence imaging. Histograms report the means of the relative fluorescence collected from separate experiments (a-c). Examples of typical time courses of relative fluorescence obtained at respect time (d-f). A mixture of forskolin $(10\mu M)$ + genistein $(10\mu M)$ is used to activate CFTR. CFTR_{inh} – 172 $(10\mu M)$ is used to inhibit CFTR. (A) HeLa cells transfected with wild-type (WT) CFTR as positive control, (p.F508del, GFP) as a negative control, and CFTR mutants; p.Gly149Arg, p.[Asp443Tyr;Arg668Cys], [p.Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys] and p.[Gly149Arg;Asp443Tyr;Arg668Cys]. Statistical significance is ***p< 0.001; **p<.01; *p<0.05; ns, non significant.

Table 1: List of oligonucleotide primers used to create p.Gly149Arg, p.Asp443Tyr,p.Gly576Ala mutations and p.Arg668Cys polymorphism by site-directed mutagenesis.

Table 2: Phenotype and genotype data of patients carrying at least one of the *CFTR* gene mutations studied (p.Asn443Tyr, p.Gly576Ala, p.Arg668Cys, Gly549Arg)

Table 3: Comparison of mutation genotypes and their impact on subcellular localization,

 CFTR processing and iodide efflux.





Figure 2:



















Table 1:

CFTR Mutation	Nucleotide	Mutagenesis primer $5' \rightarrow 3'$
	Change	
D443Y	G to T at 1459	5' GTACTCCTGTCCTGAAA <u>T</u> ATATTAATTTCA 3'
(c.1347G>T, p.Asp443Tyr)		5' TTTCAGGACAGGAGTACCAAGAAGTGA 3'
G576A	G to C at 1859	5' TTAGACTCTCCTTTTG <u>C</u> ATACCTAGATGTT 3'
(c.1727G>C, p.Gly576Ala)		5'CAAAAGGAGAGTCTAATAAATACAAAT 3'
R668C	C to T at 2134	5' AACTGAGACCTTACAC <u>T</u> GTTTCTCATTAG 3'
(c.2002C>T, p.Arg668Cys)		5' GTGTAAGGTCTCAGTTAGGATTGAATT 3'
G149R	G to A at 577	5' GGCCTTCATCACATT <u>A</u> GAATGCAGATGAG 3'
(c.445G>A, p.Gly149Arg)		5'AATGTGATGAAGGCCAAAAATGGCTG 3'

Two primers were used for each mutagenesis reaction. The mismatched nucleotides, which encode the mutated amino acids, are indicated by bold-typed and underlined letters.

Résultats & Discussions – Partie 2

Table 2:

pe	Allele 2	p.Phe508del	p.Phe508del	IN	p.Arg75Glu (c.224G>A)	IN	1898+73T>G	p.Phe508del	p.Phe508del	IN	p.Glu92Asn	p.Phe508del	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	IN	p.Leu997Phe	IN	IN	c.262deITT (394deITT)	p.Phe508del	p.Phe508del	p.Phe508del	p.Gln689X	IN	IN	p.PheF508del	p.Arg668Cys	c.1210-34TG[12]T[5]	146
CFTR genoty	Allele 1	p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Arg668Cys	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Arg668Cys	[p.Arg668Cys;c.3717+12191C>T] (3849+10kbC>T)	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Arg668Cys	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	[p.Arg668Cys;c.3717+12191C>T] (3849+10kbC>T)	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	
Sweat test	(Cl-,mmol/L)	NA	92	NA	55, 58	80	50	20-59	36-48	40-59	41	NA	67	<40	23-71	34-60	NA	80-87	NP	NA	NA	09<	NA, 29	NA	NA	NA	NA	
Age at	diagnosis	3m1/2	6y	2m,1y,4y	16y	59y	27y	2y	1y	NA	78y	60y, 71y	20y	17y	26y	72y	NA	66y	19y	48y	72y	18y	14y,16y	35-39y	49y	42y	NA	
henotype	Additional information	P, PI	P, PI	GI, cholestasis	Bronchitis, ENT	Ρ	P, PI	Failure to thrive	Ρ	Р	Id		Pa infections			Pa infections	Azoospermia		ENT	Bronchitis	Sinusitis, bronchiolitis	Nasal polyposis	Nasal polyposis		Bronchitis			
d	Main diagnosis	CF	CF	CF?	CF?	CF?	CF?	CF?	CF?	CF?	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	DB	CSD	CSD	CSD	CSD	CSD	IP	dI	dI	IP	
No. of	Patients	2	1	4	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	1	1	1	

2
Partie
Ι
Discussions
Y
Résultats

4	IP		19-69y	NA	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	IN
1	Cholestasis		60y	NA	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	c.1584G>A (1716G>A)
33	CBAVD		27-50y	9-82	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
2	CBAVD		30y,36y	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	c.2051A>G,2052delA (2183AA>G)
1	CBAVD		34y	72	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Trp1282X
1	CBAVD		NA	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Asn1303Lys
1	CBAVD		35y	65-66	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Ser549Asn
1	CBAVD		NA	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	c.3605del (3737delA)
1	CBAVD		30y	41-69	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Gln1411X
1	CBAVD		31y	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Arg347His
3	CBAVD		29y,34y,NA	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Gly542X
1	CBAVD		35y	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	c.946delT (1078delT)
1	CBAVD		26y	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	c.4242G>T,4242+1delG (4374 4374+1GG>T)
1	CBAVD		41y	31	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Arg117His (R117H;T7)
1	CBAVD		32y	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Thr338Ile
1	CBAVD		NA	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Glu379Lys
1	CBAVD		NA	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Met1137Val
1	CBAVD		NA	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Thr1246Ile
2	CBAVD		NA	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	IN
1	CBAVD		34	NA	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Asn1303Lys
8	CBAVD		30-42y	NA	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	IN
1	CBAVD		27y	NA	p.Arg668Cys	p.Phe508del
1	CBAVD		30y	NA	p.Arg668Cys	NI
1	CUAVD		NA	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
1	CUAVD		NA	NA	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	IN
1	CUAVD	Renal agenesis	NA	NA	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	NI
1	Hypofertility (not CBAVD)	CF carrier's partner	NA	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Asp1152His
1	FBA	Mild CF, 2 older	22wg	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Asn1303Lys
		brothers with the same				

Résultats & Discussions – Partie 2

		genotype and a very mild phenotype				
1	FBA	TOP for de novo	21wg	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Arg31Cys
		chromosomal translocation; not CF				
1	FBA	Not CF at birth	28wg	<30	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
1	FBA	Unknown outcome	23wg	NA	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
1	FBA	Not CF at birth	21wg	<30	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Trp846X
1	FBA	Fetal death	20wg	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Ser1235Arg
1	FBA	Unknown outcome			p.Arg668Cys	p.Phe508del
1	FBA	Not CF at birth	38wg	NA	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	IN
1	FBA	Not CF at birth	28wg	NA	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	IN
1	healthy	CF patient's mother	NA	NP	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
1	healthy	Newborn, elevated IRT	birth	<30	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
		but normal ST (not CF)				
1	healthy	Mother of a CF fetus (p.[Phe508del]+[phe508del])	NA	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
1	healthy	Mother of a fetus with	NA	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
		FBA but not affected				
		WITH CF				
2	healthy	Mother of a fetus with	NA	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	NI
		FBA but not affected				
	healthy	CF patient's mother	59y	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
1	healthy	CF patient's mother	NA	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.[Ser912Leu;Asn1303Lys]
1	healthy	CF patient's mother	32y	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Leu137Arg
1	healthy	CF carrier's partner	NA	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	[p.Ser1235R;c.1210-12T5]
1	healthy	CF carrier's partner	NA	NP	p.[Ser519Gly;Gly576Ala;Arg668Cys]	IN
2	healthy	CF carrier's partner	37y, NA	NP	p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys]	IN
20	healthy	CF carrier's partner	24-42y	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	NI
1	healthy	CF carrier's partner	32y	NP	p.Gly576Ala	IN
1	healthy	CF patient's mother	37y	NP	p.Arg668Cys	p.Arg792X

148

1	healthy	CF relative (p.Gly745X)	22y	NP	p.Arg668Cys	IN
, 	healthy	General population	NA	NP	p.[Gly576Ala;Arg668Cys]	IN
1	CF	P, PI	3m1/2	NA	p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
1	CF	P, PI	6y	92	p.[Gly149Arg;Gly576Ala;Arg668Cys]	p.Phe508del
CF: cystic	fibrosis; CF?: sus	spicion of cystic fibrosis; C	CBAVD: conge	enital bilateral al	bsence of vas deferens; CSD: chro	nic sinus disease; DB:

disseminated bronchiectasis; ENT: ear, nose, throat symptoms; FBA: fetal bowel anomaly; GI: gastro-intestinal symptoms; IP: idiopathic pancreatitis; IRT: immuno-reactive trypsinemia; m: months; NA: not available; NI: not identified; NP: not performed. P: pulmonary symptoms; Pa: Pseudomonas aeruginosa; PI: pancreatic insufficiency; wg: weeks of gestation, ST: sweat test, y: years.

		0 1 11 1	CEED	CETE
CFTR mutation	Exons	Subcellular	CFTR	CFTR
		localization	Processing	Activity
p.Gly149Arg	4	ER	immature	F508del
n.Asn443Tvr	9	GL. Mb	mature	WT
F		- , -		
n.Glv576Ala	12	Mb	mature	pWT
protycronia		1110		P *** -
n Arg668Cvs	13	Mh	mature	nWT
p. in goode ys	15	1010	mature	PWI
n Cly576Ala: n Arg668Cys	12 13	ER PMb	mature	nWT
p. Gly 570Ala, p. Algooocys	12, 15		mature	pwi
n Asn/13Tyr. n Cly576Ala. n Arg668Cys	9 12 13	FR	mature	nWT
p.Asp++51 y1, p.Oly570Ala, p.Alg000Cys),12, 15	LIX	mature	p w 1
n Clu140 Argen Clu576 Alee n Arg669 Cus	1 12 12	ED	immoture	F508dal
p.ory 147Arg, p.ory 570Ara; p.Arg006Cys	4,12, 15	LK	mmature	roodel

Table 3:

Poster présenté au 11^{ème} Colloque des jeunes chercheurs sur la mucoviscidose, 8 Mars

2010, Institut Pasteur, Paris (France).



ACKNOWLEDGEMENTS We thank Anne Cantereau for her excellence assistance with the use of the confocal laser microscope. C.Norez and F. Becq are supported by grants from the French association "Vaincre la Mucoviscidose".

II-4- Annexes

4.1 Annexe 1 - autres constructions utilisées

Pour étudier l'impact de l'association composé différent de façon plus détaillée, nous avons réalisé d'autres combinaisons qui n'existent pas chez les patients pour une étude plus approfondie des mutations précédentes.

En présence du génotype D443Y-G576A, une diminution de la maturation de la protéine CFTR est observée (figure 32 B). Mais fait plus intéressant, dans les génotypes mutés suivants :

- D443Y-G576A
- D443Y-R668C
- G149R-D443Y,
- G149R-D443Y-R668C,
- G149R-D443Y-G576A-R668C

Une inhibition totale de la maturation de CFTR a été observée. Cette absence de glycosylation serait due au fait que ces protéines mutantes soient piégées dans le RE. Ainsi, elles ne sont pas transférées à l'appareil de Golgi (organite dans lequel la glycosylation est réalisée). L''analyse de la localisation (figure 32 A) et de la fonctionnalité (figure 32 C) a confirmé ces résultats.

Α			
D443Y-G576A	2		
D443Y-R668C	b		
G149R-D443Y		2QC	
G149R-D443Y-R668C	d	(A)	8
G149R-D443Y-G576A-R668C	e	ab	COO S



Figure 32. Analyse des protéines sauvage et mutées GFP-CFTR

- (A) : localisation par immunofluorescence : vert : GFP, rouge : ER, bleu : noyau, merge : superposition des couleurs
- (B) : maturation des protéines GFP-CFTR étudiées
- (C) : fonctionnalité des protéines GFP-CFTR étudiées

4-2 Résultats supplémentaires :

4-2-1 Comparaison de deux constructions plasmidiques portant l'ADNc de CFTR

Dans un premier temps, nous avons effectué toutes les expériences avec un plasmide porteur de l'information GFP-CFTR (les deux ADNc sont fusionnés en phase) (pS65T/EGFP-C1/WT-CFTR, B. Stanton, Dartmouth, USA): la mutagenèse dirigée, le clonage, l'extraction des plasmides, le séquençage, les transfections pour mettre en évidence la localisation, la maturation et la fonctionnalité de la protéine. Dans la majorité des cas, les résultats obtenus sont cohérents entre le génotype et le phénotype :

- une séquence sans mutation est associée à un phénotype normal et cela est vrai avec
 l'étude de la localisation membranaire, de la maturation et de la fonctionnalité de la protéine,
- une séquence mutée induisant un phénotype de mucoviscidose induit une localisation non membranaire, une absence de maturation et d'activité de CFTR,
- des séquences mutées induisant des CFTR-RD induit une localisation membranaire, une maturation et une activité de CFTR.

Toutefois, dans le cas de l'allèle complexe D443Y-G576A-R668C, la localisation non membranaire de la protéine, l'absence de maturation et la non fonctionnalité de la protéine ne sont pas en adéquation avec le phénotype CFTR-RD (et non mucoviscidosique) du patient.

Une hypothèse pour expliquer cette différence serait une forte diminution de l'expression de la protéine GFP-YAC par rapport à la protéine YAC. En effet, l'addition de l'étiquette GFP pourrait induire une structure et une activité différente, empêchant la formation du canal et donc la fonctionnalité de la protéine. Ce changement de structure serait moins important dans les autres protéines (sauvage et mutées).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons testé ensuite une nouvelle construction dans laquelle l'ADNc de *CFTR* et l'ADNc de *GFP* sont présents dans le plasmide mais non fusionnés comme précédemment (pTCF-wt, construction de P. Fanen, CHU de Créteil, France). Ainsi, la structure de la protéine CFTR est intacte, sans modification de structure. Avec cette construction et les trois mutations en cis, nous observons une activité de la protéine CFTR, faible mais suffisante (figure 33), expliquant le phénotype peu sévère des patients.



Figure 33 : Comparaisons des résultats de la fonctionnalité des protéines CFTR sauvage et mutées (YAC) en fonction du plasmide utilisé (plasmide Poitiers : GFP-CFTR, plasmide Créteil : CFTR et GFP). Les résultats ont été obtenus par la technique physiologique décrite page 68 sur des cellules isolées au microscope confocal. WT-CFTR : D en position 443, G en position 576, R en position 668 ; YAC-CFTR : Y en position 443, A en position 576, C en position 668.

4-2-2 Analyse de la localisation des protéines CFTR sauvage et mutées en utilisant le plasmide pTCF.

En utilisant le plasmide pTCF-wt, nous avons pu réaliser toutes les mutagenèses afin d'obtenir les différents plasmides mutés comme précédemment. La figure 34 présente la localisation non membranaire des protéines CFTR portant les mutations sévères (F508del, R et RAC, figure 34A) et celle membranaire de CFTR-WT et des autres CFTR mutés (comme Y, A, C, AC et YAC, figure 34B).



Figure 34A : Localisation de CFTR sauvage et mutés par microsopie confocale. Les cellules HéLa sont incubées avec l'anticorps primaire anti-CFTR humain toute la nuit à 4°C. Les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire (Fluo Probe 488). Les noyaux sont marqués en bleu en utilisant le Topro-3 iodide. L'échelle représente 10µm.

R : R en position 149, RAC : R en position 149, A en position 576, C en position 668.







Figure 34B : Localisation de CFTR sauvage et mutés par microsopie confocale. Les cellules HéLa sont incubées avec l'anticorps primaire anti-CFTR humain toute la nuit à 4°C. Les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire (Fluo Probe 488). Les noyaux sont marqués en bleu en utilisant le Topro-3 iodide. L'échelle représente 10µm.

YAC : Y en position 443, A en position 576, C en position 668.

AC : A en position 576, C en position 668.

D443Y : Y en position 443, G576A : A en position 576, R668C : C en position 668.

4-2-3 Résultats de la maturation des protéines CFTR sauvage et mutées en utilisant le plasmide pTCF.

Les résultats obtenus ont été réalisés dans l'équipe du Dr P. Fanen au CHU de Créteil, suite à une collaboration établie depuis deux ans avec nous. Les résultats avec le plasmide pTCF portant les différentes mutations étudiées sont identiques avec ceux visualisés avec les plasmides mutés pS65T/EGFP-C1/CFTR, à l'exception du plasmide pTCF portant les mutations D443Y-G576-R668C (YAC). En effet, dans ce cas, la protéine CFTR-YAC présente une faible maturation (figure 35), ce qui indique que la protéine est maturée et localisée à la membrane.



Figure 35 : Analyse de la maturation des protéines CFTR sauvage et mutées

4-2-4 Résultats de la fonctionnalité des protéines CFTR sauvage et mutées en utilisant le plasmide pTCF.

Les résultats obtenus avec le plasmide pTCF portant les différents CFTR mutés sont identiques avec ceux visualisés avec les plasmides mutés pS65T/EGFP-C1/CFTR, à l'exception du plasmide pTCF portant les mutations D443Y-G576-R668C (YAC). En effet, dans ce cas, la protéine CFTR-YAC présente une faible activité (figure 36), ce qui confirme que la protéine est correctement maturée et localisée à la membrane.



Figure 36 : Analyse de la fonctionnalité des protéines CFTR sauvage et mutées. Le test *t* de Student pour séries appariées et non appariées a été utilisé pour déterminer la significativité des différences. ns : pas de différence significative, * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001. Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism 4.0 (*GraphPad Software*).

III- Etude de l'impact d'une mutation sur l'épissage de l'ARN de *CFTR*

III-1- Contexte de travail

Les techniques de biochimie, de biologie moléculaire et de biologie cellulaire ont permis de perfectionner les études du gène et de la protéine CFTR, tout en montrant le fossé existant sur l'absence de renseignements sur l'ARNm. Cette observation fait que le laboratoire s'est dirigé depuis peu vers les techniques de l'étude de l'épissage pour pouvoir avoir en sa totalité l'impact des mutations : de l'ADN à la protéine, *via* l'ARNm. Le premier cas que nous avons étudié concerne le polymorphisme dans l'intron 6a, 875+40G>A, (c.743+40G>A). Cette variation intronique a été choisie car elle semble être la mutation commune de 16 patients (CF ou CFTR-RD) étudiés au CHU de Poitiers. En particulier, une famille nous a particulièrement intéressée, car elle indique la transmission héréditaire de cet allèle muté avec une pancréatite sévère chez l'adulte et de moindre gravité chez l'enfant (Annexe 1). Nous amplifions la région qui nous intéresse (région qui contient dans notre cas une partie de l'intron portant la mutation), à partir d'un ADN normal et de l'ADN muté. Après insertion dans un vecteur d'expression, nous transfectons des cellules eucaryotes pour extraire l'ARNm et étudions l'ADNc obtenu par RT-PCR dans les 2 cas.

L'étude consiste à mettre en évidence l'implication d'une mutation ponctuelle dans la création d'un site d'épissage alternatif, étude essentielle pour pouvoir donner un conseil génétique. Par la suite, nous pourrons utiliser cette technique sur les mutations silencieuses ou faux sens, ou introniques qui semblent être impliquées soit dans des CF (comme K464N, en cours) ou dans des CFTR-RD (comme 875+40G>A).

III-2- Contexte bibliographique

Dans le cas d'une mutation ponctuelle ne provoquant pas l'apparition d'un codon STOP, cette mutation (faux sens ou silencieuse) pourrait toutefois avoir des conséquences pathologiques en créant un site d'épissage alternatif et produire ainsi une dégradation du messager appelé NMD (Non Sens Mediated Decay) (Chang *et al.*, 2007). Il existe déjà quelques exemples dans la littérature concernant l'implication de certaines mutations sur le saut de l'exon 9 (Buratti *et al.*, 2007), de l'exon 12 (Pagani *et al.*, 2003) ou encore sur un épissage altéré de l'exon 13 (Aznarez *et al.*, 2003) du gène *CFTR*. Plus récemment Faa *et al.*, (2009) ont caractérisé une mutation affectant le site régulateur d'épissage de l'intron 6b.

La variation 875+40A>G a été précédemment décrite comme un polymorphisme ne provoquant pas de CF sur la base de sa fréquence (Bombieri *et al.*, 2000). Cette fréquence est de 2,5%-4% chez des patients espagnols (Casals *et al.*, 2000). Cet allèle a été aussi détecté de façon sporadique dans différentes populations : chez des patients uruguyens (Luzardo *et al.*, 2002), slovaques (Kolesar *et al.*, 2008), algériens (Loumi *et al.*, 2008).

III-3- Articles & Communications

ARTICLE 4 : <u>Study the impact of the 875+40A>G polymorphism on *CFTR* <u>mRNA splicing (en cours de redaction)</u></u>

<u>Communication orale et affichée :</u> <u>Study the impact of the 875+40A>G polymorphism on *CFTR* mRNA splicing</u>
Impact of the 875+40A>G polymorphism on *CFTR* mRNA (Publication No. 4)

Study of the impact of the 875+40A>G polymorphism on CFTR

mRNA splicing

Ayman El-Seedy,¹ Marie-Claude Pasquet,² Emanuele Buratti, ³Alain Kitzis,^{1,2} and Véronique Ladeveze¹

(en préparation – nous attendons un témoin positif de défaut d'épissage comme K464N) From the Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires,¹ CNRS UMR 6187, Université de Poitiers, Poitiers, France; Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers,² Poitiers, France; Molecular Pathology Group,⁶ International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste, Italy

Corresponding and reprint requests author: Veronique Ladeveze

Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires,

Université de Poitiers, 86022 Poitiers cedex, France

TEL: + (33) 5 49 45 49 73

FAX: + (33) 5 49 45 49 72

E-mail: veronique.ladeveze@univ-poitiers.fr

Number of text pages: 12 pages; 2 Tables and 4 Figures

Running head: Impact of the 875+40A>G polymorphism on *CFTR* mRNA

Conflict of interest statement. None

Acknowledgments: This work was supported by Poitiers Hospital and University of Poitiers, France.

Abstract

Since the identification of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene in 1989, many mutations and polymorphisms have been identified in cystic fibrosis (CF) patients. However, a significant percentage of the CF alleles still remains unidentified in most of the studied populations, even after extensive studies of the CFTR gene. Moreover, many polymorphisms in the CFTR gene still remain to be characterized at the molecular level. The reason why an accurate characterization may be very important for the clinical and diagnostic world is because of its potential impact on our understanding of disease pathogenesis For example, recent studies have shown that some polymorphism may exhibit many features of CFTR-related disorders (CFTR-RD) such as the (TG)m and Tn polymorphic loci in intron 8 at the splice acceptor site of exon 9 which can cause male infertility. Another example is represented by the CFTR polymorphism, 875+40A>G, shown to be relatively frequent in French patients with CFTR-RD. Different symptoms of CFTR-RD in patients of Poitiers CHU could have been explained by the presence of the c.743+40A>G polymorphism but this variant is often associated with numerous polymorphisms as 5T. Because epidemiological data was arguing against the pathogenicity of the 875+40A>G polymorphism, we have investigated CFTR mRNA splicing using a minigene-based approach. Constructs containing wild-type and mutant CFTR exon 6a and the intron-exon boundaries were cloned into the pTB minigene construct and expressed in HeLa, HT29 and HEK293 cells. mRNA was analyzed by RT-PCR using β -globin-specific primers. This work shows clearly that this polymorphism does not result in aberrant splicing of CFTR mRNA as predicted from the changes in genomic sequence.

Keywords: cystic fibrosis, polymorphism, hybrid minigene, splicing, population screening,

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a common autosomal recessive genetic disorder caused by a variety of sequence alterations in the *CFTR* gene. Since the cloning of the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene in 1989, more than 1800 new mutations have been reported to the Cystic Fibrosis Consortium (http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr). After complete sequence analysis of the CFTR gene in many laboratories, many mutations have been identified but have not completely examined. Indeed, molecular and cellular studies have also uncovered a large number of putative mutations which showed phenotypic variability. For this reason, further studies are still needed to determine their eventual pathological effects. So, the comprehensive study will help in giving an accurate genetic counselling and prognosis for patients or individuals.

In this respect, it is now clear that single nucleotide polymorphisms may also strongly influence gene expression at the splicing level (Nielson et al., 2007). Previous genetic studies have found that functional polymorphisms in the *CFTR* gene can alter the expression of CFTR (Cuppens et al., 1998). Previous studies have suggested that the most frequent polymorphism in *CFTR* gene, the M470V in exon 10, which represents for A or G variation at position 470, plays a role in modulating CFTR protein at both the transcriptional and translational levels. It was reported that the M470 CFTR was associated with a 1.7-fold of the V470 CFTR function (Cuppens et al., 1998). In addition, the polythymidine variants in intron 8 [IVS8-poly (T)] are associated with the efficient usage of the intron 8 splicing acceptor site, and affect the transcription of exon 9 mRNA by exon skipping. The IVS8-5T results in approximately 90% of exon 9 skipping, leading to a non-functional CFTR, thereby is considered as a disease mutation with incomplete penetrance (Chu et al., 1993).

More recently, the polymorphism 875+40A>G (c.743+40A>G) in intron 6a was classified as non-CF-causing allele on the basis of its frequency (Bombieri et al., 2000). This

polymorphism has sporadically been observed as uncommon in Uruguayan (Luzardo et al., 2002); Slovac (Kolesar et al., 2008), and Algerian patients (Loumi et al., 2008), whereas it has been reported to have relatively frequent (2.5%-4.0%) in Spanish patients (Casals et al., 2000).

Here, we present a family carrying the 875+40A>G polymorphism in cis with 2694G and 4521T variants on the same allele in exons 14a and 24 respectively whereas each of them had normal effect on CFTR. The father of this family and his son had pancreatic inflammation with elevated sweat chloride levels in the absence of cystic fibrosis or any deleterious mutation. In order to investigate the eventual pathogenecity of the 875+40A>G polymorphism we examine its effect upon mRNA level in vitro using cultured cell-line (HeLa, HT29, HEK293) in minigene expression, a highly sensitive tool used to regularly screen putative CFTR mutations in CF patients.

MATERIAL AND METHODS

Analysis of 875+40A>G variant in the general population

Between April 2007 and January 2010, 640 patients French origin were referred to CHU of Poitiers for genetic counselling of CF analysis. A total of 293 participants who completed the comprehensive examination of intron 6a were investigated. Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes according to standard protocols. Subjects were initially screened on the basis of a complete medical symptoms and they carried 875+40A>G. The screening of the 875+40A>G variant has been performed by (DHPLC) analysis followed by Direct sequencing. PCR primers were: were: FOR (HPCF-6aA) 5'-5'-TCCTTTTACTTGCTTTCTTTCA-3' REV (HPCF-6aB) TATGCATAGAGCAGTCCTGGTT-3. The PCR conditions were as follows: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 74°C for 40 s, for 32 cycles. The

reaction mixture contained 5 μ L of PCR buffer, 200 μ M each of dNTPs, 20 pmol of each primer and 1.0 U of DNA polymerase in a final volume of 50 μ L, containing 1 μ L of the first PCR homozygote were used as controls. All samples showing the DHPLC profile of the heterozygote have been sequenced using the amplification primers. Subjects were initially screened on the basis of a complete medical symptoms and they carried c.743+40A>G. The patients have different clinical manifestations (CFTR-RD or CF) (Figure 1). DNA samples of cases were analysed by previously reported methods. All 27 exons of *CFTR* were amplified by PCR followed by sequencing.

Bioinformatics analysis

The effect of 875+40A>G polymorphism on intron splicing has been predicted in silico by using NNSplice (www.fruitfly.org/seq tools/splice.html), NetGene2. HSFv2.4.1 (http://www.umd.be/HSF/), PESX. Rescue-ESE, ESE 3.0 and Finder at http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home to identify modifications at the level of enhancer or silencer elements.

Generation of the minigene constructs

The construction and validation of the hybrid minigene used in this study has been described elsewhere (Pagani et al., 2000). Briefly, a PCR fragment encompassing exon intron6a and its flanking exons were amplified from human genomic DNA of normal and mutated intron 6a with intron5 and intron 6b primers (Table 1). After restriction enzyme digestion of used plasmid by *Nde*I restriction enzyme site, PCR products were inserted into pTB*NdeI* plasmid (kindly donated by F. Pagani). All hybrid minigene constructs were sequenced to verify the correct amplification of the wild-type and mutated DNA fragments.

DNA sequencing

Regions of interest in the hybrid minigene constructs were amplified by reverse transcription coupled with PCR (RT-PCR) using primers $2,3\alpha$ and BraRev (Table1) and sequenced by an

ABI Prism 310 Genetic Analyzer using the ABI PRISM[™] Big Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) with pTBDir and pTBRev primers.

Transfection, RNA isolation and RT-PCR amplification

HeLa, HT 29 and HEK 293 cells were transfected with 4µg of the wild type or the mutated minigene using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 24 h. according to the manufacturer's instruction. Total RNA was extracted from cell lysate using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) and was then dissolved in 50 µL of sterile water. cDNA synthesis was carried out at 37°C for 1 hour after adjustment of the mixture to contain 5 µL buffer 5X -Gibco-BRL (250 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 375 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂), 10 mmol/L DTT (Gibco-BRL, France), 1 mmol/L dNTP (Roche Diagnostics, France), 2.4 µg of random hexamer primers, 2 µL of sterile water, 10 µL of RNA, 40 U of RNAguard (Amersham Biosciences, Orsay, France), and 400 U of reverse transcriptase of Moloney murine leukemia virus (MMLV). The reaction medium was made up to 50 µL with sterile water. Finally, the reaction was stopped by a 2-minute incubation at 100°C. The PCR reaction medium consisted of 5 µL cDNA, 2.5 µL 10X buffer, 2 mmol/L MgCl₂, 250 µmol/L of each dNTP, 10 pM of primers $\alpha 2-3$ and $\beta 2$ in the hybrid minigene assay as previously described (Pagani et al., 2000) and 3 units of Taq polymerase in a final volume of 25 µL. PCR was performed using a 9700 GeneAmp Thermo Cycler (Perkin Elmer) under the following cycling conditions: initial denaturation at 94°C for 2 minutes, followed by 30 cycles at: 94°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, followed by a final 5-minute extension step at 72°C. The reaction was verified by 1.5% agarose gel electrophoresis.

RESULTS

Analysis of 875+40A>G variant in the general population

During the period April 2007 - January 2010, 640 patients French origin were referred to CHU of Poitiers for genetic counselling of CF analysis. Of these, 293 participants have completed the comprehensive examination of intron 6a. Thirty of 293 were carried the 875+40A>G variant in the intron 6a. 16 patients of them were initially screened on the basis of complete clinical symptoms and were diagnosed as having CF or CFTR-RD. Figure 1 shows the abnormal DHPLC profile in these patients. There is a high degree of phenotypic variability in this polymorphism. The 875+40A>G allele was found such as congenital bilateral absence of vas deference (CBVAD) (5/16), DDB (3/16, pulmonary disease (2/16), 1 hyperechogenecity (1/16) and CF (2/16). The detailed information found in the subjects participating in the study is shown in Table 2 and figure 2. Based on these data, the expected frequency of the 875+40A>G allele is 5%.

Family Data

In the course of study, we found an interested family. Here we present the main clinical feature of the family members. The family studied has the 875+40A>G polymorphism, in association with 2694T>G (exon 14a), and the 4521G>A (exon 24) polymorphisms on the same allele. The father has major health problems but not cystic fibrosis. This patient has a history of chronic diarrhea, but now can lead to a number of tools extremely important (40 to 50 per day), and while the specific genes for pancreatitis are normal (tested at the University Hospital of Brest). In addition, there is a suspicion of asthma since childhood related to nocturnal and wheezing dyspnea. The mother has one normal allele, and the other one 2694T>G (exon 14a) and 4521G>A (exon 24). She shows no signs of deleterious symptoms. The couple has 2 children, who carried the father's allele 875 40A> G. One son carries the normal allele of the mother, and he is in good health. The other son has the mutant allele from

the mother 2694T> G (exon 14a) and 4521G> A (exon 24) and he has a pathology of type CFTR-RD, but less severe than his father.

Splice-site predictions

The effect of the predicted splicing mutations (c.874+40A>G) was first analyzed by computer-assisted splice-site prediction using the NNSplice, and NetGene2 programs. The programs recognized the wild-type as well as the mutant splice site without any appreciable score reduction. Conversely, HSFv2.4.1 program analysis revealed that the donor-site score ranged from 2.54 in the absence of polymorphism, to 3.37 when the substitution took place. Finally, PESX analysis showed minor changes in ESS distribution, whereas Rescue-ESE showed no change either in the wild-type or in the mutant sequence,

CFTR Minigene Analysis of 875+40A>G in Intron 6a

We investigated the effect of 875+40A>G variant using a hybride minigene splicing approach. Constructs containing wild-type and mutated forms of intron 6a with their flanking regions were cloned into the pTB*Nde*I minigene system. Following transient transfection in HeLa, HT29 and HEK293 cells of wild type and mutant intron 6a minigenes, mRNA was analyzed by RT-PCR and direct sequencing using β -globin-specific primers (Table 1). These primers do not amplify eventual ectopically expressed *CFTR* transcripts and a 1666pb fragment specific was obtained (Figure 3A). After ligation and transformation, several clones were analyzed by using restriction enzyme. Figure 3B shows the electrophoresis profil between plasmid with and without insert. The 540 bp products are due to the correct splicing of intron 6a and its flanking exons, indicating that this polymorphism did not induce any aberrant splicing in the minigene assay (Figure 4A). Direct sequence showed a correct splicing (Exon 6a-Exon 6b). As we tested two times (24h and 48h) our data suggested that the mutant RNA was correctly spliced and stably expressed. These experiments were repeated three times independently in three types of cells (Figure 4B).

DISCUSSION

Mutations in the CFTR gene lead to the genetic disease cystic fibrosis (CF), a lethal autosomal recessive disorder (Riordan et al., 1989; Mickle and Cutting, 1998). A significant fraction (about 13%) of CFTR mutations is classified as "splicing mutations", but for almost 40% of these, their role in affecting the pre-mRNA splicing of the gene is not yet defined. Splicing mutations act by directly disrupting splice sites or by creating new ones (Faa et al., 2009).

identified Over 200 polymorphisms have been within **CFTR** gene (www.genet.sickkids.on.ca/cftr). These do not cause CF, but may alter CFTR protein production and/or function. Such alterations may be clinically insignificant in individuals without additional CFTR mutations, but have an influence on disease phenotype in patients with co-existing mutations (Davies et al., 2006). For example, the cDNA single-nucleotide polymorphisms 2694T>G and 4521G>A may affect pre-mRNA splicing by changing regulatory-sequence motifs of exonic splice enhancers, leading to increase skipping of exons 9 and 12 and lower amounts of normal transcripts (Steiner et al., 2004).

This study aims at disclosing the new putative splicing polymorphism 875+40A>G by hydride minigene assay beside its frequency in the general population. The clinical investigation and mutational data of patients, who had this polymorphism in *CFTR* gene, were identified. This finding has shown that this polymorphism is associated with CFTR-RD diseases. Moreover, in a family, this polymorphism is present in cis with 2694T>G and 4521G>A variants on the same allele in exons 14a and 24 respectively. The father has a severe pancreatic symptoms and his son has weak pancreatic inflammation with elevated sweat chloride levels in the absence of cystic fibrosis and any deleterious mutation. For this reason, we have chosen to study this nucleotide change. Here, we present epidemiological data in studied families. The 875 +40A>G polymorphism has been shown to be relatively

frequent in French population (5%) whereas, only 4% in the Spanich population (Casal et al., 2004). Other previous studies screening for this variant in patients have been reported (Loumi et al., 2008; Luzardo et al., 2002; Bombieri et al., 2000). Moreover, single nucleotide substitutions may have a profound effect on the splicing efficiency inducing both exon inclusion and skipping. The changes in the splicing pattern were modulated by the composition of the polymorphic TG/T locus in intron 8 (Pagani et al., 2003). Thus, we have investigated the effect of 875 +40A>G using minigene constructs; the results revealed that this variant could not cause aberrant splicing of intron 6a. Therefore, this polymorphism could be considered as a non-pathogenic nucleotide change. However, we tested here only this polymorphism because it is the common point of characterized 16 patients. In the family presented, this polymorphism is always associated with 2694T>G and 4521G>A, and we have no data concerning the effect of this complex allele on CFTR.

Nowadays, thousands of mutations are identified yearly. Although many directly affect protein expression, an increasing proportion of mutations is now believed to influence mRNA splicing. They mostly affect existing splice sites, but synonymous, non-synonymous or nonsense mutations can also create or disrupt splice sites or auxiliary *cis*-splicing sequences (Desmet et al., 2009). Furthermore, there are many mutations which identified as a putative splicing mutation not fully examined and confirmed its impact. So, the current study shows this variant has no clinical consequences on CFTR protein and could classified as non pathogenic polymorphism due to its effect on pre-mRNA. However, these data provide a better characterization of 875 +40A>G in CFTR-RD patients in France; however, the search for other association with this polymorphism should be examined.

REFERENCES

- Bombieri C, Giorgi S, Carles S, De Cid R, Belpinati F, Tandoi C, Pallares-Ruiz C, et al. (2000) A new approach for identifying non-pathogenic mutations: an analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. Hum Genet 106, 172–178.
- Casals T, Bassas L, Egozcue S, Ramos MD, Giménez J, Segura A, Garcia F, Carrera M, Larriba A, Sarquella J, Estivill X. (2000) Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens Human Reproduction 15, (7) 1476-1483
- Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. Nat Genet 3, 151–156.
- Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, et al. (1998) Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (TG)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. J Clin Invest 101, 487-496.
- Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Béroud G, Claustres M and Béroud C. (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. Nucleic Acids Research 37(9), 215-220
- Faa V , Incani F , Meloni, CD , Masala M , Baffico A. M, Seia M , Cao A, Rosatelli M. C (2009). .Characterization of a Disease-associated Mutation Affecting a Putative Splicing Regulatory Element in Intron 6b of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene Journal of Biological Chemistry 284, 30024-30031

- Kolesar P, Minarik G, Baldovic M, Ficek A, Kovacs L, and Kadasi L. (2008) Mutation analysis of the CFTR gene in Slovac cystic fibrosis patients by DHPLC and sequencing: identification of four novel mutations. Gen. Physiol. Biophys 27, 299-305
- Loumia O., Ferec C.Mercier B., Creff J., Fercot B., Denine R., Grangaud J.P. (2008) CFTR mutations in the Algerian population J of Cyst Fibros 7, 54-59
- Luzardo, G., Aznarez, I., Crispino, B., Mimbacas, A., Martínez, L., Poggio, R., Zielenski, J., Tsui, L.C. and Cardoso, H. (2002) Cystic fibrosis in Uruguay. Genet Mol Res 1, 32-38
- Mickle JE, Cutting GR. (1998) Clinical implication of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations. Clin Chest Med 19, 443-458
- Nielsen K B, Sørensen S, Cartegni L, Corydon T J, Doktor T K, Schroeder L D, Reinert L S, Elpeleg O, Krainer A R, Gregersen N, Kjems J, Andresen B S. (2007) Seemingly Neutral Polymorphic Variants May Confer Immunity to Splicing-Inactivating Mutations: A Synonymous SNP in Exon 5 of *MCAD* Protects from Deleterious Mutations in a Flanking Exonic Splicing Enhancer. Am J Hum Genet 80, 416-432.
- Pagani F, Buratti E, Stuani C, Romano M, Zuccato E, Niksic M, Giglio L, Faraguna D,
 Baralle FE (2000) Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon
 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. J Biol Chem 275, 21041–21047
- Pagani F, Stuani C, Tzetis M, Kanavakis E, Efthymiadou A, Doudounakis S, Casals T, Baralle FE. (2003) New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. Hum Mol Genet 12, 1111-1120.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S,
 Plavsic N, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui L-C. (1989)
 Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary
 DNA. Science 245, 1066-1073.

Steiner B, Truninger K, Sanz J, Schaller A, Gallati S. (2004) The role of common singlenucleotide polymorphisms on exon 9 and exon 12 skipping in nonmutated CFTR alleles. Hum Mutat 24, 120-129.

Figure legends:

Figure 1. DHPLC profile of the wild-type, and of c.743+40A>G polymorphism. The *top plot* detects the wild-type peak. The *bottom plot* detects the mutant peak of c.743+40A>G polymorphism. The result shows that this patient is a carrier for this polymorphism. The *middle plot* detects the mutant peak of *positive control*. (B) Direct sequencing of Intron 6a showed the c.743+40A>G polymorphism (filled arrow).

Figure 2. Phenotypic spectrum of c.743+40A>G in the analyzed patients.

Figure 3. (A) Amplification og genomic DNA from the index cases analysed in this study. (B) Linearization of different plasmids with *NdeI* shows the wild-type (pTB) minigene without *NdeI* cutting (lane2), with *NdeI* cutting (pTB/N, lane 3), the wild-type (C/WT) minigene harboring the c.743+40A>G(lane 4), and the construct harboring the c.743+40 A>G variant (C/MUT, lane 5). The used Marker is Lambda DNA/*HindIII*

Figure 4. (A) Schematic presentation of minigene splicing construct. (B) RT-PCR analysis of minigenes carrying the wild type sequence, WT, and c.743+40A>G polymorphism, MUT, in intron 6a mutations separated in a 1.5% agarose gel.

Table 1. Olignucleotides using in RT-PCR, and sequencing of inserted fragment.

Name	Sequence			
pTB2160Dir	5'-TATTCAGATATTTATGTCTAGG-3'			
pTB2270Rev	5'-CCCATGTGAGATATCTAGG-3			
2,3α*	5'-CAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTGC-3'			
BraRev*	5'-AGGGTCACCAGGAAGTTGGTTAAATCA-3'			

* indicate the sequence of RT-PCR olignucleotides

Patients	Identified	Other variations	Tn, TGm,	Clinical syptoms
	Mutations			
1	3007delG,	2694T>G, 4521G>A	7/7T, 10/12TG	DDB
2	-	2694T>G, 4404C>T,	7/7T, 10/11TG	Chronic diarrhea,
		4521G>A		asthma, pancreatitis
3	-	2694T>G, 4404C>T,	N/N	sweat test, asthma
		1540A>A		
4	-	2694T>G, 4404C>T,	N/N	hyperechogenecity
		4521G>A		
5	-	2694T>G, 4521G>A	5/7T, 11/11TG	infertility
6	D1152H,	2694T>G, 4521G>A	N/N	infertility
	G85E			
7	L206W	2694T>G, 4521G>A	N/N	infertility
8	S1235R,	2694T>G, 1540>G,	5/7T, 11/12TG	CBAVD
		4521G>A		
9	-	2694T>G, 4521G>A	7/7T, 10/12TG	infertility
10	-	2694T>G, 4521G>A	7/7T, 10/12TG	infertility
11	-	2694T>G, 4521G>A	7/7T, 10/12TG	infertility
12	-	2694T>G, 4521G>A	7/7T, 10/12TG	oligospermy
13	-	2694T>G, 4521G>A	7/7T, 10/12TG	oligospermy
14	-	2694T>G, 4521G>A,	7/7T, 10/12TG	sweat test
		1540A>A		positive
15	-	2694T>G, 4521G>A,	7/7T, 10/12TG	hyperechogenicity
		1540A>A		
16	-	1001+11C>T, 1540>G,	7/7T, 10/12TG	DDB
		2694T>G		

Table 2. Characterization of *CFTR* mutations in 16 patients carried the 875+40A>G polymorphism











Figure 3









(B)



Présentations orale et affichée au 4th European CF Young Investigator Meeting, 24-27

August 2010, Lille (France).



Study of the impact of c.743+40A>G polymorphism on CFTR mRNA splicing

Ayman El-Seedy,[†] Marie-Claude Pasquet,[‡] Emanuele Buratti⁸, Alain Kitzis,^{†,‡} and Véronique Ladevèze[†] Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires,[†] CNRS UMR 6187, Université de Poitiers, Poitiers; Service de Génétique, CHU de Poitiers,[‡] Poitiers, France. ICGB, § Triest, Italy.

> HYBRID MINIGENE SPLICING ASSAY Both oligonucleotides carry an NdeI restriction enzyme site in their 5' ends, used to clone the product into a modified version of the alpha-globin-fibronectin

> EDB minigene in which the alternatively-spliced EDB exon has been removed to generate a site for the

sults of PCR

pTB pTB/N C/WT C/MU

PAT1

insertion of exons under study (Pagani et al., 2000)

TRANSIENT EXPRESSION ANALYSIS

INTRODUCTION

The cystic fibrosis, that encodes the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) appears highly The cystic fibrosis, that encodes the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CF1R) appears highly susceptible to mutations due to its large size and misprocessing errors (Riordan *et al.*, 1989). More than 1700 genetic alterations have been so far described in the CFTR gene (*www.genet.sickkid.on.ca/cftr/*). About 13% of CFTR mutations are classified as "splicing mutation" but for almost 40% of these, their role in affecting the pre-mRNA splicing of the gene is not yet defined (Faa *et al.*, 2009). Silent or missense mutations and intronic mutations could play a role on mRNA splicing, but very few data about mutation incidence on mRNA splicing have been described (Pagani *et al.*, 2004). However, there are many single nucleotide polymorphisms which showed strongly influence gene expression at the splicing level (Steiner *et al.*, 2004). Furthermore, functional CFTR polymorphisms may also affect the expression of the CFTR protein (Chang *et al.*, 2008).

OBJECTIVE: In this study, we report the clinical features and mutational data of patients, who had the c.743+40 A>G polymorphism in the CFTR gene. We characterized this variant *in vitro* using cultured cell-line (HeLa cells) exposed to the desired constructs to examine the effect of c.743+40A>G polymorphism at mRNA level in minigene expression as potential sensitive tool of alternative splicing.

MATERIALS AND METHODS

CFTR MUTATION DETECTION

Blood samples (5mL) were collected in tubes containing EDTA. All genomic DNA samples were extracted from peripheral blood cells using the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) according to the supplier's protocol. All subjects were screened for mutations within the CFTR gene by commercial tor mutations within the CFTR gene by commercial diagnostic kits and by DHPLC or DGGE. After this initial screening, mutated amplicons were subjected to direct sequencing using dye terminator chemistry and capillary electrophoresis on an ABI 310 genetic analyser (Applied Biosystems).

RESULTS

Clinical Investigation

During the period April 2007- January 2010, 640 patients French origin were referred to CHU of Politiers for genetic counseling of CF analysis. Of these, 293 participants were examined for intron 6a in CFTR gene

Thirty of 293 were carried the c.743+40A>G variant in the intron 6a. Subjects were initially screened on the basis of complete medical symptoms and they carried c.743+40A>G.

The screening of the c.743+40A>G variant has been performed by Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) analysis followed by direct sequencing.



Conclusion and Prospectives

Genetic studies have found that functional polymorphisms in the *CFTR* gene can alter the expression of CFTR (Cuppens *et al.*, 1998). So, this work aims to characterize c.743+40A>G polymorphism by a minigene-based approach to increase the identification of this variant. These experiments demonstrate that this polymorphism do not result in aberrant splicing of CFTR mRNA as predicted from the change in genomic. This finding could be helpful for mutation diagnosis and detection in the CFTR gene. Finally, we will try to investigate how this polymorphism effect on CFTR gene in association with other variants. Beside that, we will study the expression of constructs in other cell types.

9416 bp 6557 bp

-

ACKNOWLEDGEMENT _____ We thank Dr. Franco Pagani, Erika Bussani, Elisa Goina for providing pTB plasmid and related sequences



DHPLC profile of the wild-type and of c.743+40A>G polymorphism. The DIFFLC prome of the wind-type and of $C_1^{A_3+A_0A_3}$ polymorphism. The top plot detects the wiid-type peak. The bottom plot detects the mutant peak of $c_1^{A_3+40A_3}$ G polymorphism. The result shows that this patient is a carrier for this polymorphism. The middle plot detects the mutant peak of positive control. (B) Direct sequencing of Intron 6a showed the $c_1^{A_3+40A_3}$ G polymorphism (blue arrow).

MINIGENE CONSTRUCTION



- 1. Chang et al., Clin Chem 2008, 54: 131-138 2. Cuppens et al., J Clin Invest 1998, 15: 487-496 3. Faa et al., J Biol Chem 2009, 284: 30024-30031 4. Pagani et al., J Bio Chem 2000, 245: 1073-1080 5. Pagani et al., Cell 2004, 67: 775-784 6. Steiner et al., Hum Mutat 2004, 24: 120-129 7. Riordan JR *et al.*, Science 1989, 245: 1066-1073

III-4- Annexes

4-1 Annexe 1 :

La figure 37 présente l'arbre généalogique de la famille avec deux individus atteints de CFTR-RD, et portant le polymorphisme 875+40A>G (intron 6a), avec l'association 2694T>G (exon 14a), et le polymorphisme 4521G>A (exon 24) sur le même allèle.

Le père a d'importants problèmes de santé sans toutefois être atteint de mucoviscidose. Il s'agit d'un patient aux antécédents de diarrhée chronique évoluant depuis l'enfance, mais pouvant aboutir actuellement à un nombre de selles extrêmement important (40 à 50 par jour), et ceci alors que les gènes spécifiques des pancréatites sont normaux (testés au CHU de Brest). De plus, il y a une suspicion d'asthme depuis l'enfance en rapport avec une dyspnée sifflante et la présence d'épisodes dyspnéiques nocturnes.

La mère présente un allèle normal, et sur l'autre 2694T>G (exon 14a) et 4521G>A (exon 24), elle ne présente aucun signe pathologique.

Ce couple a 2 enfants, tous les 2 portent l'allèle du père 875+40A>G. L'un des enfants porte l'allèle normal de la mère, et est en bonne santé. L'autre porte l'allèle muté de la mère 2694T>G (exon 14a) et 4521G>A (exon 24). Il présente une pathologie de type CFTR-RD, mais de moindre gravité que son père. Figure 37 : arbre généalogique de la famille avec deux individus atteints de CFTR-RD, et portant le polymorphisme 875+40A>G. Les mutations sont écrites en couleur.



4-2 Résultats complémentaires

La mutation c.1392G> T (K464N) est une mutation de transition d'une thymidine en une guanosine dans l'exon 9 (figure 38D), ce qui provoque une modification du dernier nucléotide de l'exon 9 avec un changement de la lysine en asparagine en position 464 de CFTR. Cette substitution de part sa position serait capable de réduire l'efficacité d'épissage. L'effet de cette mutation putative d'épissage a été analysé par l'analyse bioinformatique en utilisant les programmes Delta-G, l'entropie maximale et Senepathy. Ces programmes comparent les séquences normales et mutées, et déterminent un score très différent entre les deux. Cette

mutation devrait affecter la solidité du site d'épissage 5'. Ce variant a été identifié chez un patient CF porteur de cette mutation sous forme hétérozygote et d'une mutation grave CF (c.3659delC) sur l'autre chromosome, ce qui conduit sur cet allèle à un décalage du cadre de lecture à partir de codon 1220 et donc absence de la protéine (Bieth E, communication personnelle).

De plus, nous avons envisagé à partir du minigène cloné des mutagenèses dirigées pour modifier le site d'épissage en 5' de l'intron 9 en créant deux nouvelles mutations (c.1392+1G>C et c.1392+1G>T, figure 38) qui devraient provoquer aussi une erreur d'épissage et nous permettre d'avoir des exemples de défaut d'épissage.



Figure 38 : Structure du minigène hybride utilisé dans les expériences de transfection.

(A) Les flèches indiquent les amorces utilisées (α -globine et fibronectine EDB) sont indiquées ainsi que le site *Nde*l.

- (B) L'insertion de la séquence mutée (c.1392G>T),
- (C) Le produit de PCR de la région amplifiée et la migration sur gel d'agarose 1,5%
- (D) L'insertion de la séquence mutée (c.1392+1G>C ou c.1392+1G>T).

Conclusions Générales et perspectives

Conclusions Générales & **Perspectives**

I - CONCLUSIONS GENERALES

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies héréditaires sévères transmises sur le mode autosomique récessif dans les populations caucasiennes. En France, son incidence est estimée à une naissance sur 4500, variant de 1/2913 en Bretagne (Scotet *et al.*, 2000) à 1/8885 dans les régions Méditerranéennes (Des Georges *et al.*, 2004). La mucoviscidose est caractérisée par une anomalie du transport épithélial des électrolytes dans les tissus exocrines. Le dysfonctionnement de la protéine CFTR altère de nombreux tissus, entraînant l'apparition de diverses manifestations notamment : maladie pulmonaire obstructive chronique, insuffisance pancréatique exocrine, infertilité masculine et modification de la concentration saline de la sueur. Toutefois, les variations concernant le mode et l'âge d'apparition des premiers symptômes, l'évolution de l'atteinte pulmonaire, les valeurs du test de la sueur ou les atteintes pancréatiques montrent une extrême hétérogénéité clinique (Boyle *et al.*, 2003). La maladie est due à des mutations du gène *CFTR* (Riordan *et al.*, 1989) qui altèrent les fonctions de la protéine CFTR, un canal à chlorures AMPc-dépendant (Anderson *et al.*, 1991).

Le travail décrit dans ce mémoire a été entrepris en vue d'une étude plus précise des mutations du gène *CFTR* chez l'homme. Nous avons d'abord déterminé l'impact des duplications de l'exon 9 et de ses régions adjacentes sur la détection de mutations. Dans la seconde partie de notre travail, nous avons mené une étude sur les allèles complexes dans la population française et tenté de relier leurs profils d'expression à la physiopathologie de ces mutations. Dans la troisième partie, nous avons recherché l'effet d'un polymorphisme sur l'épissage alternatif de *CFTR*.

L'analyse des mutations par ces trois techniques peut être ainsi particulièrement intéressante et utile dans le cadre du diagnostic moléculaire ou du diagnostic prénatal dans les familles étudiées.

I-1 Nouveau diagnostic des mutations de la région de l'exon 9 du gène CFTR

Comme nous l'avons déjà présenté, le dépistage des mutations de l'exon 9 de *CFTR* est difficile en raison du polymorphisme de la séquence (TG)m (T)n répétée située à l'extrémité de l'intron 8. L'utilisation des techniques basées sur la PCR ou la DHPLC pour la détection de mutations dans cette région est donc peu appropriée. En effet, si la DHPLC est réalisée, il est nécessaire d'utiliser des amorces qui sont en 3' du site polymorphe (Le Marechal *et al.*, 2000). Toutefois, comme cette séquence du gène *CFTR* a été dupliquée dans plusieurs régions du génome, nous avons démontré que l'utilisation de ces amorces classiques pourrait conduire à une mauvaise identification des mutations.

Aucune étude présentant l'impact des homologies de séquences entre l'exon 9 de *CFTR* et des séquences homologues n'avait été réalisée. Étant donné que les méthodes traditionnelles pour l'amplification de cette séquence seraient réalisées sur plusieurs copies extragéniques et extrachromosomiques, nous avons défini de nouvelles conditions de PCR (nouvelles amorces, et température d'hybridation), qui doivent être utilisées pour étudier exclusivement cette région du gène *CFTR*. Notre objectif est de fournir la preuve que les mutations décrites dans les bases de données sont soit des pseudomutations dans des régions dupliquées du génome, soit des mutations réellement présentes dans le gène.

L'analyse des alignements de séquences homologues à l'exon 9 de *CFTR* a révélé que cinq mutations enregistrées au sein d'un consortium international d'étude des mutations du gène *CFTR* (CFMDB, http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr) sont présentes dans ces régions dupliquées. En utilisant de nouvelles conditions de PCR qui permettent l'amplification spécifique de l'exon 9 de *CFTR* et de ses régions voisines, nous avons démontré que deux mutations précédemment décrites (1524+6 insC; 1524+12 G> A) sont absentes du gène, mais présentes dans des pseudogènes dupliqués (El-Seedy *et al.*, 2009). Par contre, les trois autres

mutations, 1367delC, 1379A> G, 1524G> T ont été confirmées comme présentes sur l'exon 9 de *CFTR* (cf article soumis *–short communication*).

I-2 L'impact des différentes substitutions dans le gène *CFTR* (associées ou non)

La mucoviscidose est une pathologie due à des dysfonctionnements de la protéine CFTR. La multitude de mutations et de groupes de mutations identifiées dans ce gène rend le diagnostic difficile. Il est donc important de corréler le génotype avec le phénotype pour assurer un bon diagnostic, en particulier le diagnostic prénatal. L'étude clinique, dans un premier temps, nous a permis de déterminer les complexes de mutations possibles, impliqués dans différentes pathologies, des plus légères aux plus graves. Toutes ces associations sont présentes chez les patients étudiés sous forme hétérozygote avec, comme autre allèle, l'information délétère F508del. L'ensemble des données cliniques nous a permis de mettre en évidence 3 allèles complexes induisant des phénotypes différents. L'allèle G576A-R668C, l'allèle D443Y-G576A-R668C et l'allèle G149R-G576A-R668C induisent respectivement une pancréatite, une stérilité et/ou une pancréatite, et enfin la mucoviscidose.

Les protéines portant une seule mutation D443Y (dans le domaine NBD1), G576A (dans le domaine NBD1), et R668C (dans le domaine R), sont localisées au niveau de la membrane et glycosylées comme la protéine sauvage. Par contre, la mutation mutée G149R (dans la première boucle intracytoplasmique du domaine transmembranaire) semble avoir un effet délétère, c'est-dire une localisation strictement périnucléaire (RE), un défaut de glycosylation (absence de bande C) et une non fonctionnalité.

Conclusions Générales et perspectives

L'hypothèse de départ était que la mutation G149R seule avait de faibles conséquences (Mercier *et al.* 1995), alors que le complexe porteur des trois mutations provoque un effet délétère (la mucoviscidose). Or nos résultats indiquent un effet délétère identique, confirmé aussi bien par la localisation des protéines en microscopie confocale que par Western blot ou par l'étude de la fonctionnalité. En effet, comme F508del, la mutation G149R seule est responsable d'un défaut de glycosylation (absence de bande C) et de ciblage de la protéine à la membrane. Ces résultats semblent être contradictoires avec ceux de la littérature (Mercier *et al.*, 1995; Chillón *et al.*, 1995; De Braekeleer et Ferec 1996; Feldmann *et al.*, 2003). Cependant, il se peut que l'ensemble du gène n'ait pas été étudié dans ces études antérieures et que la présence d'allèles complexes explique ces différences.

Toutefois, tous nos résultats sont cohérents avec les phénotypes observés : les protéines possédant les trois mutations en cis G149R-G576A-R668C sont immatures, non membranaires et non fonctionnelles et sont présentes chez un patient atteint de mucoviscidose, les protéines possédant les deux mutations en cis G576A-R668C sont matures, membranaires et fonctionnelles et sont présentes chez un patient atteint de pancréatite.

Les différences de maturation observées par Western Blot pour les protéines doublement mutées G576A-R668C, et triplement mutées D443Y-G576A-R668C concordent avec les localisations cellulaires proches de ces deux protéines. Cette étude permet d'une part une meilleure compréhension de la mucoviscidose et des mutations qui sont mises en jeu. D'autre part, celle-ci permet d'apporter un diagnostic sûr pour chaque complexe de mutations, aussi bien dans le cadre d'un conseil génétique que dans celui d'un diagnostic prénatal.

190

I-3 Influence des mutations sur l'épissage des pré-ARNm chez les patients atteints de mucoviscidose ou de CFTR-RD

Le polymorphisme génétique est défini par la présence de variants au niveau de l'ADN. Ce sont des changements sans conséquence apparente se retrouvant chez 1% de la population générale. Chaque individu possède une combinaison unique de différents traits polymorphes qui modifient la susceptibilité à développer certaines pathologies ou leurs complications, mais aussi qui modulent le type de réponse à un médicament ou à une agression. L'analyse fine du gène *CFTR* a montré l'importance d'une séquence nucléotidique polypyrimidique polymorphe (polyT) située dans l'intron 8 (extrémité 3'), au cœur d'une séquence critique pour le processus d'épissage, et constituée selon le cas de 5, 7 ou 9 thymidines. Ce polymorphisme se comporte comme une mutation à effet délétère modéré, susceptible d'aggraver l'effet d'une autre mutation du gène *CFTR*. Les polymorphismes de nucléotide peuvent aussi influencer fortement l'expression des gènes au niveau de l'épissage (Nielson *et al.,* 2007).

En outre, il existe de nombreuses mutations qui ont été identifiées comme des mutations putatives d'épissage. Toutefois, elles n'ont pas encore été entièrement examinées et de ce fait leur impact sur l'épissage n'est pas démontré. Notre étude vise à détecter de nouvelles mutations d'épissage par des études de minigènes construits pour valider ce test. Dans notre étude, nous rapportons les caractéristiques cliniques et moléculaires de patients, en testant le polymorphisme 875+40A>G. Après construction d'un minigène et transfection dans différents types cellulaires (cellules HeLa, HT29, HEK293), nous avons montré clairement que ce variant n'avait pas d'impact sur l'épissage *in vitro* alors que cette variation est fréquente chez les patients CFTR-RD. Cette nouvelle méthode mise en place dans le laboratoire permet de visualiser l'effet de variations sur l'épissage du transcrit et d'avoir un outil pour étudier les défauts d'épissage.

Conclusions Générales et perspectives

En résumé, les résultats obtenus à partir de ces trois études nous ont permis de mieux comprendre l'impact des mutations étudiées et ainsi d'émettre un diagnostic moléculaire documenté.

II- PERSPECTIVES

Les résultats de l'analyse génétique permettront l'orientation des familles à risque et l'établissement d'un véritable conseil génétique afin de faire comprendre aux personnes la nature du risque de transmission de mucoviscidose.

Notre travail ne représente que des approches sur l'étude moléculaire et cellulaire de quelques mutations du gène *CFTR*.

En ce qui concerne la première partie, il reste à comprendre l'origine des duplications. Etaient-elles présentes avant le gène *CFTR* ou au contraire proviennent-elles de ce gène ? Nous pourrions amplifier avec les conditions spécifiques et non spécifiques la région autour de l'exon 9 à partir d'ADN de différentes espèces (primates, autres mammifères, ...).

Les résultats présentés dans la seconde partie pourraient être complétés par des expériences de co-localisation des protéines grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents des différents compartiments cellulaires ou par co-immunoprécipitation avec des protéines spécifiques de ces compartiments (appareil de Golgi, réticulum endoplasmique lisse ou rugueux). Des transfections dans des cellules polarisées permettraient de localiser plus précisément les protéines, ce modèle cellulaire étant plus proche de la réalité. De plus, des co-transfections avec un plasmide porteur de CFTR-F508del d'une part et de CFTR avec les

Conclusions Générales et perspectives

mutations complexes d'autre part pourraient nous donner des résultats plus proches de ceux des patients doubles hétérozygotes. Des résultats préliminaires ont montré des produits de dégradation beaucoup plus importants qu'avec des mutations homozygotes dans nos conditions expérimentales.

Quant à l'étude de l'épissage initiée depuis peu, nous n'avons pas démontré l'impact de la mutation 875+40A>G sur l'épissage, et ceci de façon répétée dans trois modèles cellulaires différents. Toutefois, il faudrait réaliser une RT-PCR quantitative sur des cellules issues de patients pour déterminer si la quantité d'ARNm est identique entre les informations sauvage et mutée. De plus, il serait judicieux de créer un minigène portant l'ensemble des polymorphismes afin d'être plus proche de la réalité. En effet, une variation seule n'a peutêtre pas d'effet alors que l'association en cis de plusieurs polymorphismes pourrait être la cause d'un épissage modifié.

De plus, des mutations silencieuses, faux sens ou encore introniques pourront être testées afin d'étudier leur impact sur l'épissage et leurs conséquences physiopathologiques. En particulier, la mutation K464N (variation de dernier nucléotide de l'exon 9) est en cours d'étude. Selon une analyse bioinformatique, cette mutation devrait affecter la solidité du site d'épissage 5'de l'intron 9. L'étude clinique indique que cette mutation a été identifiée chez un patient atteint de mucoviscidose hétérozygote pour cette mutation et porteur d'une mutation grave sur l'autre allèle.

A plus long terme, nous espérons obtenir, grâce à ces différentes techniques, une meilleure connaissance des mutations et de leur impact physiopathologique.

193

Références Bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABRAMOWICZ MJ, DESSARS B, SEVENS C, GOOSSENS M, BOULANDET EG. Fetal bowel hyperechogenicity may indicate mild atypical cystic fibrosis: a case associated with a complex CFTR allele. *J Med Genet*. 2000, 37, 8-15.
- ALEKSANDROV L, ALEKSANDROV AA, CHANG XB, RIORDAN JR. The first nucleotide binding domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a site of stable nucleotide interaction, whereas the second is a site of rapid turnover. *J Biol Chem.* 2002, 277, 15419-15425.
- ALEKSEYENKO AV, KIM N, LEE CJ. Global analysis of exon creation versus loss and the role of alternative splicing in 17 vertebrate genomes. *RNA* 2007, 13, 661-670.
- ANDERSON MP, GREGORY RJ, THOMPSON S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991, 253, 202-205.
- ANNEREAU JP, STOVEN V, BONTEMS F, BARTHE J, LENOIR G, BLANQUET S, LALLEMAND JY. Insight into cystic fibrosis by structural modelling of CFTR first nucleotide binding fold (NBF1). *CR Acad Sci Paris*. 1997a, 20, 113-121.
- ANNEREAU JP, WULBRAND U, VANKEERBERGHEN A, CUPPENS H, BONTEMS F, TÜMMLER B, CASSIMAN JJ, STOVEN V. A novel model for the first nucleotide binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett.* 1997b, 407, 303-308.
- AUGERON C, LABOISSE CL. Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* 1984, 44, 3961-3969.
- AZNAREZ I, CHAN EM, ZIELENSKI J, BLENCOWE BJ, TSUI LC. Characterization of disease-associated mutations affecting an exonic splicing enhancer and two cryptic splice sites in exon 13 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Mol Genet*. 2003, 12, 2031-2040.

- BAUKROWITZ T, HWANG T-C, NAIRN AC, GADSBY DC. Coupling of CFTR Cl channel gating to an ATP hydrolysis cycle. *Neuron*. 1994, 12, 473-482.
- BECQ F. CFTR and transepithelial ionic transport abnormalities in CF. *Archives de pédiatrie* 2003, 10, 325-332.
- BLACK DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*. 2003, 72, 291-336.
- BOMBIERI C, BENETAZZO MG, SACCOMANI A, BEPINATI F, GILÈ LS, LUISETTI M, PIGNATTI PF. Complete mutational screening of the CFTR gene in 120 patients with pulmonary disease. *Hum Genet*. 1998, 103, 718-722.
- BOMBIERI C, GIORGI S, CARLES S, DE CID R, BELPINATI F, TANDOI C, PALLARES-RUIZ N, LAZARO C, CIMINELLI BM, ROMEY MC, CASALS T, POMPEI F, GANDINI G, CLAUSTRES M, ESTIVILL X, PIGNATTI PF, MODIANO G. A new approach for identifying non-pathogenic mutations: an analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. *Hum Genet*. 2000, 106, 172-178.
- BOUCHER RC, STUTTS MJ, KNOWLES MR, CANTLEY L, GATZY JT. Sodium transport in cystic fibrosis epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest*. 1986, 78, 1245-1252.
- BOYLE MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Curr Opin Pulm Med.* 2003, 9, 498-503.
- BROWN CR, HONG-BROWN LQ, BIWERSI J, VERKMAN AS, WELSH WJ. Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the deltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones* 1996, 1, 117-125.

- BURATTI E, STUANI C, DE PRATO G, BARALLE FE. SR protein-mediated inhibition of CFTR exon 9 inclusion: molecular characterization of the intronic splicing silencer. *Nucl Acids Res.* 2007, 35, 4359-4368.
- CAHILL P, NASON MW, AMBROSE C, YAO TY, THOMAS P, EGAN ME. Identification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator domains that are important for interactions with ROMK2. *J Biol Chem.* 2000, 75, 16697-16701.
- CARSON MR, TRAVIS SM, WELSH MJ. The two nucleotide binding domains of CFTR have distinct functions in controlling channel activity. *J Biol Chem.* 1995, 270, 1711-1717.
- CARTEGNI L, CHEW SL, KRAINER AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*. 2002, 3, 285-298.
- CASALS T, BASSAS L, EGOZCUE S, RAMOS MD, GIMENEZ J, SEGURA A, GARCIA F, CARRERA M, SLARRIBA A, SARQUELLA J, ESTIVILL X. Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Human Reproduction* 2000, 15, 476-1483.
- CASALS T, BASSAS L, RUIZ-ROMERO J, CHILLON M, GIMENEZ J, RAMOS MD, TAPIA G, NARVAEZ H, NUNES V, ESTIVILL X. Extensive analysis of 40 infertile patients with congenital absence of the vas deferens: in 50% of cases only one CFTR allele could be detected. *Hum Genet*. 1995, 95, 205-211.
- CASTELLANI C, CUPPENS H, MACEK M JR, CASSIMAN JJ, KEREM E, DURIE P, TULLIS E, ASSAEL BM, BOMBIERI C, BROWN A, CASALS T, CLAUSTRES M,
 CUTTING GR, DEQUEKER E, DODGE J, DOULL I, FARRELL P, FEREC C,
 GIRODON E, JOHANNESSON M, KEREM B, KNOWLES M, MUNCK A,
 PIGNATTI PF, RADOJKOVIC D, RIZZOTTI P, SCHWARZ M, STUHRMANN M,
 TZETIS M, ZIELENSKI J, ELBORN JS. Consensus on the use and interpretation of
 cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*. 2008, 7, 179-196.
- CHANG MC, CHANG YT, WEI SC, TIEN YW, LIANG PC, JAN IS, SU YN, WONG JM. Spectrum of mutations and variants/haplotypes of CFTR and genotype-phenotype correlation in idiopathic chronic pancreatitis and controls in Chinese by complete analysis. *Clin Genet*. 2007, 71, 530-539.
- CHENG SH, GREGORY RJ, MARSHALL J, PAUL S, SOUZA DW, WHITE GA, O'RIORDAN CR, SMITH AE. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990, 63, 827-834.
- CHILLON M, CASALS T, MERCIER B, BASSAS L, LISSENS W, SILBER S, ROMEY MC, RUIZ-ROMERO J, VERLINGUE C, CLAUSTRES M. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med.* 1995, 332, 1475-1480.
- CLAIN J, FRITSCH J, LEHMANN-CHE J, BALI M, AROUS N, GOOSSENS M, EDELMAN A, FANEN P. Two mild cystic fibrosis associated mutations result in severe cystic fibrosis when combined in cis and reveal a residue important for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing and function. *J Biol Chem.* 2001, 276, 9045-9049.
- CLAIN J, LEHMANN-CHE J, GIRODON E, LIPECKA J, EDELMAN A, GOOSSENS M, FANEN P. A neutral variant involved in a complex CFTR allele contributes to a severe cystic fibrosis phenotype. *Hum Genet*. 2005, 116, 454-460.
- CLAUSTRES M, GUITTARD C, BOZON D, CHEVALIER F, VERLINGUE C, FEREC C, GIRODON E, CAZENEUVE C, BIENVENU T, LALAU G, DUMUR V, FELDMANN D, BIETH E, BLAYAU M, ET AL. Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mutat*. 2000, 16, 143-156.
- COSTES B, GIRODON E, GHANEM N, FLORI E, JARDIN A, SOUFIR JC, GOOSSENS M. Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)n 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Europ J Hum Genet*. 1995, 3, 285-293.

- CÔTÉ J, GARNIER A, MASSIE B, KAMEN A. Serum-Free Production of Recombinant Proteins and Adenoviral Vectors by 293SF-3F6 Cells. *Biotechnol Bioeng*. 1998, 59, 567-575.
- COTTEN JF, OSTEDGAARD LS, CARSON MR, WELSH MJ. Effect of cystic fibrosisassociated mutations in the fourth intracellular loop of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* 1996, 271, 21279-21284.
- CUPPENS H, LIN W, JASPERS M, COSTES B, TENG H, VANKEERBERGHEN A, JORISSEN M, DROOGMANS G, REYNAERT I, GOOSSENS M, NILIUS B, CASSIMAN JJ. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes: the polymorphic (TG) m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest*. 1998, 101, 487-496.

CYSTIC FIBROSIS MUTATION DATABASE. www.genet.sickkids.on.ca/cftr/.

- DAVIDSON DJ, DORIN JR. The CF mouse: an important tool for studying cystic fibrosis. Expert Rev Mol Med. 2001, 1-27.
- DAVIS PB, DRUMM ML, KONSTAN MW. State of the art: cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996, 154, 1229-1256.
- DE BRAEKELEER M, DAIGNEAULT J, AUBIN G, SIMARD F, ALLARD C, FUJIWARA M. MORGAN K. Phenotypic heterogeneity in CF sibs compound heterozygous for the G85E and 621 + IG-T mutations. Clin Genet 1995, 47, 110-111.
- DE BRAEKELEER M, FEREC C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod.* 1996, 2, 669-677.
- DELANEY SJ, RICH DP, THOMSON SA, HARGRAVE MR, LOVELOCK PK, WELSH MJ, WAINWRIGHT BJ. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Nat Genet.* 1993, 4, 426-430.

- DENNING GM, OSTEDGAARD LS, CHENG SH, SMITH AE, WELSH MJ. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secreting epithelia. *J Clin Invest.* 1992, 89, 339-349.
- DES GEORGES M, GUITTARD C, ALTIERI JP, TEMPLIN C, SARLES J, SARDA P, CLAUSTRES M. High heterogeneity of CFTR mutations and unexpected low incidence of cystic fibrosis in the Mediterranean France. *J Cyst Fibros.* 2004, 3, 265-72.
- DORK T, WULBRAND U, RICHTER T, NEUMANN T, WOLFES H, WULF B, MAASS G, TUMMLER B. Cystic fibrosis with three mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Hum Genet*. 1991, 87, 441-446.
- EL-SEEDY A, DUDOGNON T, BILAN F, PASQUET MC, REBOUL MP, IRON A, KITZIS A, LADEVEZE V. Influence of the Duplication of CFTR Exon 9 and Its Flanking Sequences on Diagnosis of Cystic Fibrosis Mutations. J Mol Diagn. 2009, 11, 488-493.
- ESTIVILL X. Complexity in a monogenic disease. Nat Genet. 1996, 12, 348-350.
- FAÀ V, INCANI F, MELONI, CD, MASALA M, BAFFICO A. M, SEIA M, CAO A, ROSATELLI M. C .Characterization of a Disease-associated Mutation Affecting a Putative Splicing Regulatory Element in Intron 6b of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene. J Biol Chem. 2009, 284, 30024-30031.
- FANEN P, CLAIN J, LABARTHE R, HULIN P, GIRODON E, PAGESY P, GOOSSENS M, EDELMAN A. Structure-function analysis of a double-mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein occurring in disorders related to cystic fibrosis. *FEBS Lett.* 1999, 452, 371-374.
- FARINHAA CM, MENDES F, ROXO-ROSAA M, PENQUE D, AMARAL MD. A comparison of 14 antibodies for the biochemical detection of the cystic fibrosis

transmembrane conductance regulator protein Molecular and Cellular Probes 2004, 18, 235-242.

- FAUSTINO NA, COOPER T. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev.* 2003, 17, 419-437.
- FELDMANN D, COUDERC R, AUDRÉZET MP, FEREC C, BIENVENU T, DESGEORGES M, CLAUSTRES M, MITTRE H, BLAYAU M, BOZON D, MALINGE MC, MONNIER N, BONNEFONT JP, IRON A, BIETH E, DUMUR V, CLAVEL C, CAZENEUVE C, GIRODON E. CFTR genotypes in patients with normal or borderline sweat chloride levels. *Human Mutation* 2003, 654-660.
- FU, XD. Towards a splicing code. Cell 2004, 119, 736-738.
- FULMER SB, SCHWIEBERT EM, MORALES MM, GUGGINO WB, CUTTING G. Two cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations have different effects on both pulmonary phenotype and regulation of outwardly rectified chloride currents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995, 92, 6832–6836.
- GADSBY D.C. AND NAIRN A.C. Regulation of CFTR channel gating. *TIBS*. 1994, 19, 513-518.
- GHIGNA C, VALACCA C, BIAMONTI G. Alternative Splicing and Tumor Progression. *Current Genomics* 2008, 9, 556-570.
- GILBERT A, JADOT M, LEONTIEVA E, WATTIAUX-DE CS, WATTIAUX R. ΔF508 CFTR localizes in the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment in cystic fibrosis cells. *Exp Cell Res*. 1998, 242, 144-152.
- GRAVELEY BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends in Genetics* 2001, 17(2), 100-107.
- GROMAN JD, HEFFERON TW, CASALS T, BASSAS L, ESTIVILL X, DES GEORGES M, GUITTARD C, ET AL. Variation in a repeat sequence determines whether a

common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet*. 2004, 74, 176-179.

- HOLSCLAW DS, PERLMUTTER AD, SHWACHMAN H. Genital abnormality in male patients with cystic fibrosis. *J Urol.* 1971, 106, 568-574.
- HONIG SC, LAMONT J, OATES RD. Ultrasonographic renal and seminal vesicle anomalies in patients with bilateral congenital absence of the vas deferens. J Urol Suppl. 1991, 145-326a.
- HUNG LW, WANG IX, NIKAIDO K, LIU PQ, AMES GF, KIM SH. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 1998, 396, 703-707.
- JARVI K, ZIELENSKI J, WILSCHANSKI M, DURIE P, BUCKSPAN M, TULLIS E, MARKIEWICZ D, TSUI LC. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and obstructive azoospermia. *Lancet.* 1995, 345, 1578.
- JOHNSTON JA, WARD CL, KOPITO RR. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 1998, 143, 1883-1898.
- KAUFMAN DG, SCHULMAN LL, NAGLER HM. Cystic fibrosis presenting in a 45-yearold man with infertility. *J. Urol.* 1986, 136, 1081-1082.
- KEREM B, KEREM E. The molecular basis for disease variability in cystic fibrosis. *Eur J Hum Genet*.1996, 4, 65-73.
- KEREM B, ROMMENS JM, BUCHANAN JA, MARKIEWICZ D, COX TK, CHAKRAVARTI A, BUCHWALD M, TSUI LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989, 245, 1073-1080.
- KEREN H, LEV-MAOR G, AST G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature Reviews Genetics* 2010, 11, 345-355.

- KIESEWETTER S, MACEK M, JR, DAVIS C, CURRISTIN SM, CHU CS, GRAHAM C, SHRIMPTON AE, CASHMAN SM, TSUI LC, MICKLE J, AMOS J, HIGHSMITH WE, SHUBER A, WITT DR, CRYSTAL RG, CUTTING GR. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet*. 1993, 5, 274–278.
- KIM E, GOREN A, AST G. Alternative splicing: current perspectives. *Bioessays*. 2008, 30, 38-47.
- KNOWLES MR, STUTTS MJ, SPOCK A, FISCHER N, GATZY JT, BOUCHER RC. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 1983, 221, 1067-1070.
- KOCH C, CUPPENS H, RAINISIO M, MADESSANI U, HARMS HK, HODSON ME, MASTELLA G, NAVARRO J, STRANDVIK B, MCKENZIE SG. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): Comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Ped Pulmon*. 2001, 31, 1-12.
- KOLESAR P, MINARIK G, BALDOVIC M, FICEK A, KOVACS L, KADASI L. Mutation analysis of the CFTR gene in Slovac cystic fibrosis patients by DHPLC and sequencing: identification of four novel mutations. *Gen Physiol Biophys.* 2008, 27, 299-305.
- KRISTIDIS P, BOZON D, COREY M, MARKIEWICZ D, ROMMENS J, TSUI LC, DURIEP. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet.* 1992, 50, 1178-1184.
- LABRADOR M, CORCES VG. Extensive exon reshuffling over evolutionary time coupled to *trans*-splicing in *Drosophila*. *Genome Res.* 2003, 13, 2220-2228.
- LAEMMLI UK, BEGUIN F, GUJER-KELLENBERGER G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol.* 1970, 227, 680-685.

- LARRIBA S, BASSAS L, GIMENEZ J, RAMOS MD, SEGURA A, NUNES V, ESTIVILL X, CASALS T. Testicular CFTR splice variants in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Mol Genet*. 1998, 7, 1739-1743.
- LARSEN WJ. Human embryology. 1993, Churchill-Livingstone, New York.
- LE MARECHAL C, AUDREZET MP, QUERE I, RAGUENES O, LANGONNE S, FEREC
 C. Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counselling. *Hum Genet*. 2001, 108, 290-288.
- LIM LP, BURGE CB. A computational analysis of sequence features involved in recognition of short introns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98, 11193-11198.
- LIU X, LI X, LI M, ACIMOVIC YJ, LI Z, TSHUI LC. Characterization of the segmental duplication LCR7-20 in the human genome. *Genomics* 2004, 83, 262-269.
- LOUMI O, FEREC C, MERCIER B, CREFF J, FERCOT B, DENINE R, GRANGAUD JP. CFTR mutations in the Algerian population. *J Cyst Fibros*. 2008, 7, 54-59.
- LUCARELLI M, NARZI L, PIERANDREI S, BRUNO SM, STAMATO A, D'AVANZO M, STROM R, QUATTRUCCI S. A new complex allele of the CFTR gene partially explains the variable phenotype of the L997F mutation. *Genetics in Medicine* 2010, 12, 548-555.
- LUO J, PATO MD, RIORDAN JR, HANRAHAN JW. Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am J Physiol*. 1998, 274, 1397-1410.
- LUZARDO G, AZNAREZ I, CRISPINO B, MIMBACAS A, MARTÍNEZ L, POGGIO R, ZIELENSKI J, TSUI LC, CARDOSO H. Cystic fibrosis in Uruguay. *Genet Mol Res.* 2002, 1, 32-38.

- MATLIN AJ, CLARK F, SMITH CW. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005, 6, 386-398.
- MCNICHOLAS CM, GUGGINO WB, SCHWIEBERT EM, HEBERT SC, GIEBISCH G, EGAN ME. 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*. 1996, 93, 8083-8088.
- MERCIER B, VERLINGUE C, LISSENS W, SILBER SJ, NOVELLI G, BONDUELLE M., AUDRÉZET MP, AND FÉREC C. Is congenital bilateral absence of vas deferens a primary form of cystic fibrosis? Analyses of the CFTR gene in 67 patients. *Am J Hum Genet.* 1995, 56, 272-277.
- MEREDITH FN, DIANE EG, DOUGLAS MC. The Use of Small Molecules to Correct Defects in CFTR Folding, Maturation, and Channel Activity. *Current Chemical Biology* 2009, 3, 420-431.
- NIELSEN K B, SØRENSEN S, CARTEGNI L, CORYDON T J, DOKTOR T K, SCHROEDER L D, REINERT L S, ELPELEG O, KRAINER A R, GREGERSEN N, KJEMS J, ANDRESEN B S. Seemingly Neutral Polymorphic Variants May Confer Immunity to Splicing-Inactivating Mutations: A Synonymous SNP in Exon 5 of MCAD Protects from Deleterious Mutations in a Flanking Exonic Splicing Enhancer. Am J Hum Genet 2007, 80, 416-432.
- NISSIM-RAFINIA M, KEREM B. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet.* 2002, 18, 123-127.
- NOONE PG, PUE CA, ZHOU Z, FRIEDMAN KJ, WAKELING EL, GANESHANANTHAN M, SIMON RH, SILVERMAN LM, KNOWLES MR. Lung disease associated with the IVS8 5T allele of the CFTR gene. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000, 162, 1919-1924.

- OLSON JR, WEAVER DK. Congenital mesonephric defects in male infants with mucoviscidosis. *J Clin Path.* 1969, 22, 725-730.
- OSBORNE L, ALTON EWFW, TSUI LC. CFT'R intron 9 poly-T tract length in men with congenital bilateral absence of vas deferens. *Pediatr Pulmonol Suppl.* 1994, 10,125.
- PAGANI F, BURATTI E, STUANI C, ROMANO M, ZUCCATO E, NIKSIC M, GIGLIO L, FARAGUNA D, BARALLE FE. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. *J Biol Chem.* 2000, 275, 21041-21047.
- PAGANI F, STUANI C, TZETIS M, KANAVAKIS E, EFTHYMIADOU A, DOUDOUNAKIS S, CASALS T, BARALLE FE. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Hum Mol Genet.* 2003, 12, 1111-1120.
- PATRIZIO P, ZIELENSKI J. Congenital absence of the vas deferens: A mild form of cystic fibrosis. *Mol Med Today*. 1996, 2, 24-31.
- PEDEMONTE N, SONAWANE ND, TADDEI A, HU J, ZEGARRA-MORAN O, SUEN YF, ROBINSLI, DICUS CW, WILLENBRING D, NANTZ MH, KURTH MJ, GALIETTA LJ, AND VERKMAN AS. Phenylglycine and sulfonamide correctors of defective delta F508 and G551D cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride-channel gating. *Mol Pharmacol.* 2005a, 67, 1797-1807.
- PRINCE LS, WORKMAN JR, MARCHASE RB. Rapid endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994, 91, 5192-5196.
- RADPOUR R, GOURABI H, GILANI MA, DIZAJ AV. Correlation between CFTR gene mutations in Iranian men with congenital absence of the vas deferens and anatomical genital phenotype. *J Androl.* 2008, 29, 35-40.

- RAVE-HAREL N, KEREM E, NISSIM-RAFINIA M, MADJAR I, GOSHEN R, AUGARTEN A, RAHAT A, HURWITZ A, DARVASI A, KEREM B. The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*. 1997, 60, 87-94.
- RIORDAN JR, ROMMENS JM, KEREM B, ALON N, ROZMAHEL R, GRZELCZAK Z, ZIELENSKI J, LOK S, PLAVSIC N, CHOU JL, DRUMM ML, IANNUZZI MC, COLLINS FS, TSUI LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989, 245, 1066-1073.
- RIORDAN JR. Cystic fibrosis as a disease of misprocessing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator glycoprotein. *Am J Hum Genet*. 1999, 64, 1499-504.
- ROHLFS EM, ZHOU Z, SUGARMAN EA, HEIM RA, PACE RG, KNOWLES MR, SILVERMANLM, AND ALLITTO BA. The I148T CFTR allele occurs on multiple haplotypes: a complex allele is associated with cystic fibrosis. *Genet Med.* 2002, 4, 319-323.
- ROMEY M, GUITTARD C, CHAZALETTE J, FROSSARD P, DAWSON K, PATTON M, CASALS T, ET AL. Complex allele [-102T>A+S549R (T>G)] is associated with milder forms of cystic fibrosis than allele S549R (T>G) alone. *Hum Genet*.1999, 105, 145-150.
- ROMEY MC, PALLARES-RUIZ N, MANGE A, METTLING C, PEYTAVI R, DEMAILLE J, CLAUSTRES M. A naturally occurring sequence variation that creates a YY1 element is associated with increased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression. *J Biol Chem.* 2000, 275, 3561-3567.
- ROMMENS JM, IANNUZZI MC, KEREM BS, DRUMM ML, MELMER G, DEAN M, ROZMAHEL R, COLE JL, KENNEDY D, HIDAKA N, ZSIGA M, BUCHWALD M, RIORDAN JR, TSUI L-C, COLLINS FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989, 245, 1059-1065.

- ROWNTREE RK, HARRIS A. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Annals of Human Genetics* 2003, 67, 471-485.
- ROZMAHEL R, HENG HHO, DUNCAN AMV, SHI XM, ROMMENS JM, TSHUI LC. Amplification of CFTR exon 9 sequences to multiple locations in the human genome. *Genomics*.1997, 45, 554-561.
- SAKABE NJ, DE SOUZA, SJ. Sequence features responsible for intron retention in human. BMC Genomics 2007, 8, 59.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1977, 24, 104-108.
- SATO S, WARD CL, KROUSE ME, WINE JJ, KOPITO RR. Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem.* 1996, 271, 635-638.
- SAVOV A, ANGELICHEVA D, BALASSOPOULOU A, JORDANOVA A, NOUSSIA-ARVANITAKIS S, KALAYDJIEVA L. Double mutant alleles: are they rare? *Hum Molec Genet.* 1995, 4, 1169-1171.
- SCHWIEBERT EM, BENOS DJ, EGAN ME, STUTTS MJ, GUGGINO WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev.* 1999, 79, 145-166.
- SCOTET V, DE BRAEKELEER M, ROUSSEY M, RAULT G, PARENT P, DAGORNE M, JOURNEL H, LEMOIGNE A, CODET JP, CATHELINE M, DAVID V, CHAVENTRÉ A, DUGUÉPÉROUX I, VERLINGUE C, QUÉRÉ I, MERCIER B, AUDRÉZET MP, FÉREC C. Neonatal screening for cystic fibrosis in Brittany, France. Assessment of 10 years' experience and impact on prenatal diagnosis. *Lancet* 2000 ; 356 : 789-94.

- SEIBERT FS, LINSDELL P, LOO TW, HANRAHAN JW, RIORDAN JR, CLARKE DM. Cytoplasmic loop three of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator contributes to regulation of chloride channel activity. *J Biol Chem.* 1996, 271, 27493-27499.
- SEIBERT FS, LOO TW, CLARKE DM, RIORDAN JR. Cystic fibrosis: channel, catalytic, and folding properties of the CFTR protein. *J Bioenerg Biomembr*. 1997, 29, 429-441.
- SEROHIJOS AW, HEGEDUS T, ALEKSANDROV AA, HE L, CUI L, DOKHOLYAN NV, RIORDAN JR. Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc Nat Acad Sci.* 2008, 105, 3256-3261.
- STEINER B, TRUNINGER K, SANZ J, SCHALLER A, GALLATI S. The role of common single-nucleotide polymorphisms on exon 9 and exon 12 skipping in nonmutated CFTR alleles. *Hum Mutat*. 2004, 24, 120-129.
- STEM RC, BOAT TF, DOERSHUK, CF. Obstructive azoospermia as a diagnostic criterion for the cystic fibrosis syndrome. *Lancet*. 1982, 320, 1401-1403.
- STERN RC. The diagnosis of cystic fibrosis. N Engl J Med. 1997, 336, 487-491.
- STRONG TV, SMIT LS, TURPIN SV, COLE JL, TOM HON C, MARKIEWICZ D, PETTY TL, CRAIG MW, ROSENOW EC III, TSUI L-P, IANNUZZI MC, KNOWLES MR, COLLINS FS. Cystic fibrosis gene mutation in two sisters with mild disease and normal sweat electrolyte levels. *N Engl J Med.* 1991, 325, 1630-1634.
- STRONG TV, WILKINSON DJ, MANSOURA MK, DEVOR DC, HENZE K, YANG Y, WILSON JM, COHN JA, DAWSON DC, FRIZZELL RA. Expression of an abundantly alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene is not associated with a cAMP-activated chloride conductance. *Hum Mol Genet.* 1993, 2, 225-230.

- STUTTS MJ, CANESSA CM, OLSEN JC, HAMRICK M, COHN JA, ROSSIER BC, BOUCHER RC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 1995, 269, 847-850.
- SUGNET CW, KENT WJ, ARES MJR, HAUSSLER D. Transcriptome and genome conservation of alternative splicing events in humans and mice. *Pac Symp Biocomput.* 2004, 9, 66-77.
- SUN H, CHASIN L.A. Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol Cell Biol.* 2000, 20, 6414-6425.
- TAULAN M, GIRARDETA, GUITTARD C, ALTIERI JP, TEMPLIN C, BEROUD C, DES GEORGES M, CLAUSTRES M. Large genomic rearrangements in the CFTR gene contribute to CBAVD. *BMC Medical Genetics* 2007, 8, 1-6.
- TENG H, JORISSEN M, VAN POPPEL H, LEGIUS E, CASSIMAN JJ, CUPPENS H. Increased proportion of exon 9 alternatively spliced CFTR transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet.* 1997, 6, 85-90.
- THOMAS PJ, SHENBAGAMURTHI P, SONDEK J, HULLIHEN JM, PEDERSEN PL. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Effects of the most common cystic fibrosis-causing mutation on the secondary structure and stability of a synthetic peptide. *J Biol Chem.* 1992, 267, 5727-5730.
- TIZZANO E, BUCHWALD M. CFTR expression and organ damage in cystic fibrosis. *Ann Intern Med.* 1995,123, 305-308.
- TRAVIS SM, BERGER HA, WELSH MJ. Protein phosphatase 2C dephosphorylates and inactivates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci* USA. 1997, 94, 11055-11060.
- TSUI LC. The cystic fibrosis transmembrane regulator gene. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995, 151, 47-53.

- VAN GOOR F, STRALEY KS, CAO D, GONZALEZ J, HADIDA S, HAZLEWOOD A, JOUBRAN J, KNAPP T, MAKINGS LR, MILLER M, NEUBERGER T, OLSON E, PANCHENKO V, RADER J, SINGH A, STACK JH, TUNG R, GROOTENHUIS PD, NEGULESCU P. Rescue of delF508 CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary culture by small molecule. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006, 290, 1117-1130.
- VANKEERBERGHEN A, CUPPENS H, CASSIMAN JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions, *J Cyst Fibros*. 2002, 1, 13-29.
- VANKEERBERGHEN A, WIE L, JASPERS M, CASSIMAN JJ, NILIUS B, CUPPENS H. Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum Mol Genet*. 1998, 7, 1761-1769.
- WARD CL, ŌMURA S, KOPITO RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 1995, 83, 121-127.
- WELSH MJ, RAMSEY BW, ACCURSO F, CUTTING GR. Cystic Fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. Eighth ed. McGraw-Hill, Inc. New York, 2001, 5121-5188.
- WELSH MJ, SMITH AE. Molecular Mechanisms of CFTR Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. *Cell* 1993, 73, 1251-1254.
- XIE J, DRUMM ML, MA J, DAVIS PB. Intracellular loop between transmembrane segments IV and V of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is involved in regulation of chloride channel conductance state. J Biol Chem. 1995, 270, 28084-28091.
- ZIELENSKI J. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. Respiration 2000, 67, 117-133.

- ZIELINSKI J, TSUI LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annual Review* of Genetics 1995, 29, 777-807.
- ZUCCATO E, BURATTI E, STUANI C, BARALLE FE, PAGANI F, BURATTI E, STUANI C, BARALLE FE, PAGANI F, STUANI C, BARALLE FE, PAGANI F, BARALLE FE, PAGANI F, PAGANI F. An intronic polypyrimidine-rich element downstream of the donor site modulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 alternative splicing. *J Biol Chem.* 2004, 279, 16980-16988.

Curriculum vitae

EL-SEEDY Ayman, M.Sc

Né à Alexandrie (Egypte), 01/01/1977 Nationalité Egyptienne Célibataire

Adresse professionnelle :

Laboratoire de Recherche de Cytogénétique Département de Génétique Faculté d'Agriculture, Université d'Alexandrie, El Shatby -21545, Aflaton St., Alexandrie, Egypte Courriel: el_seedyus@yahoo.com Adresse personnelle : Résidence Rabelais, 38 Avenue du Recteur Pineau, Bat B, Ch. 523, Poitiers, France.

Position actuelle:

Doctorant dans le laboratoire de Pathologie Moléculaire de l'Adressage et de la Signalisation, Institut de Physiologie et de Biologie cellulaire (UMR 6187 CNRS), Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées, Université de Poitiers, BP577, 86021 Poitiers cedex, France.

CERTIFICATS UNIVERSITAIRES ET DIPLOMES : INSTITUTIONS, DATES, TITRES:

- 1999- Université d'Alexandrie, Faculté d'Agriculture, Département de Génétique, B.Sc, sur base de 4 ans d'études.
- **2004-** Université d'Alexandrie, Faculté d'Agriculture, Département de Génétique, spécialiste en Cytogénétique (Le degré de Magistère en Génétique, M.Sc aout 2004), (titre thèse de Magistère : *«Altérations Cytogénétiques et Induction des Tumeurs dans la souris par l'Uréthane & l Indoxan »).*
- 2005- Je me suis inscrit en Ph.D dans l'Université d'Alexandrie, Faculté d'Agriculture, Département de Génétique, spécialiste en Cytogénétique (titre thèse de doctorat : Screening mutants affecting the neural system in Zebra fish). En 2007, J'ai obtenu une bourse de Ministère de l'enseignement supérieur et la recherche scientifique en Egypte pour faire mon doctorat en France
- **2007** Doctorant à laboratoire de Pathologie Moléculaire de l'Adressage et de la Signalisation, Institut de Physiologie et de Biologie cellulaire, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées, Université de Poitiers, BP577, 86021 Poitiers cedex, France.
- 2008 Changement de directeur de thèse, avec un nouveau sujet de thèse.

EXPERIENCE PROFESSIONNELLE :

Mai 2000 - Août 2004 : **Démonstrateur (Demonstrator)** au Département de Génétique, Faculté d'Agriculture, Université de Alexandrie, Alexandrie, Egypte.

Octobre 2002 - Janvier 2003 : J'ai obtenu une bourse du gouvernement de la Grèce pour étudier une partie du

diplôme **DSPU** au Département de l'horticulture génétique et de la biotechnologie, Institut Agronomique Méditerranéen de Chania, Crète, Grèce.

Septembre 2004 - Jusqu'à présent : **Maitre assistant d'enseignement (Assistant lecturer**) au Département de Génétique, Faculté d'Agriculture, Université de Alexandrie, Alexandrie, Egypte.

DOMAINES DE COMPETENCE :

Biologie cellulaire

Culture cellulaire, Transfections de cellules eucaryotes, Analyse Cytogénétique (en particulier le caryotype).

Biochimie des protéines

Electrophorèses (SDS-PAGE / gradients), Western blot, Immunoprécipitation.

Biologie moléculaire

purification et production d'ADN, d'ARN, PCR et RT-PCR, clonage, construction de plasmides, utilisation de plasmides, Mutagenèse dirigée, construction de minigène hybride.

Immunologie

Immunofluorescence, détection immunologique de protéines, immunoprécipitations.

Logiciels

Word, Excel, Powerpoint, Paintbrush, WordArt, utilisation d'internet (e-mail, Netscape...).

Langues

Arabe (langue maternelle), anglais, français.

DISTINCTIONS

Membre du centre pour les études spéciales et les programmes (CSSP) de la Bibliothèque Alexandrina. Membre du journal d'Alexandrie « Echanges sur la Science ». Membre de la Société égyptienne de génétique.

LISTE DE PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

<u>El-Seedy</u>, A.S. (2004) "Cytogenetic Alteration and Tumour Induction in Mice by Urthane and Indoxan "Thesis of Master of Science (Genetics).

El-Seedy, A.S., El-Mahdy A. R., EL-Seehy M.A, Maklouf A. A. "Phosphatase activites and tumour formation in mice treated with Urthane and Indoxan". Alex. J. Agric. Res. 2005, 50(2): 95-105.

El-Seedy, A.S., EL-Seehy, M.A., Hafez, A. M., Maklouf A. A." Sister Chromatid Exchange frequencies and tumour induction in mice by Urthane and Indoxan". Alex.Sci.Exch.J. 2005, 26(4): 363-372.

El-Seedy, A.S., Taha, T. A., EL-Seehy M.A, Maklouf A. A.. "Ultrastructure sperm defects in male mice during carcinogenicity of urethane and indoxan" Arab.J. Biotech. 2006, 9(1): 27-40.

EL-Seedy, A.S., El-Seehy M.A., Hafez A.M., Maklouf A.A."Cytogenetic effects of urethane and indoxan in mammalian in vivo test system. The Bulletin of the High Institute of public Health 2006, 29: 120-126.

<u>El-Seedy A.S.</u>, Dudognon T., Bilan F, Pasquet M.C., Reboul M.P., Iron A., Kitzis A., Ladeveze V." Influence of the Duplication of CFTR Exon 9 and Its Flanking Sequences on Diagnosis of Cystic Fibrosis Mutations "J. Mol. Diagn. 2009, 11: 488-493.

COMMUNICATIONS À DES CONGRÈS

•Amina T.F., <u>El-Seedy, A.S.</u>, Naglaa G., Mancee A., Shaaban N. "Genotoxic effects of permethrin insecticide in the F0 and F1 mice generations". 21st Congress of Egyptian Society of Toxicology "Environmental factors and gene interactions", Cairo, April 12- 13 2006.

•<u>EL-Seedy</u>, <u>A.S.</u>, El-Seehy M.A, Hafez A.M., Maklouf A.A. "Cytogenetic effects of urethane and indoxan in mammalian in vivo test system". 2nd International conference on Health, Environment and Development", Alexandria, November 28-30, 2006.

•Bilan F., Nacfer M., Fresquet F., <u>EL-Seedy</u>, A., Norez C., Kitzis A., Thoreau V. "Endosomal SNARE proteins and CFTR apical targeting in polarized LLC-C PK1". European CF Young Investigator meeting, Lille, August 29-31, 2007

•<u>El-Seedy</u>, <u>A.S.</u>, Dudognon T., Bilan F., Pasquet M.C., Reboul M.P., Iron A., Kitzis A., and Ladeveze V "<u>Incidence of the CFTR exon 9 and its flanking sequence duplication on the mutation diagnosis in CF patients</u>". 32nd European Cystic Fibrosis conference, Brest, June 10-13, 2009

•<u>El-Seedy A.</u>, Pajaud J., Pasquet M.C., Norez C., Becq FGirodon E., Fanen P, .Kitzis A., Ladeveze V." Molecular and Functional characterization of frequent associated CFTR mutants in French families". 11^{ème} Colloque des jeunes chercheurs sur la mucoviscidose, 8 Mars 2010, Institut Pasteur, Paris (France).

• <u>El-Seedy A.</u>, Pasquet M.C., .Kitzis A., Ladeveze V. "Study of the impact of c.734+40G>T on CFTR mRNA splicing". 4th European CF Young Investigator Meeting, 24 -27 August 2010, Lille (France).

WORKSHOPS

•Participation au 6th International Workshop on Application of Advanced Molecular Methods for Diagnosis of Human Genetics Diseases Tehran, Iran, Mai 13-16, 2008

•Participation au French workshop on RNA splicing and genetic diseases. Institute Pasteur, Paris, France, 1Octobre 2009

•Participation à International Workshop on "RNA Structure and Function" 29 March- 1April 2010, Trieste, Italy

Etudes moléculaire et cellulaire des mutations du gène *CFTR* : de la génétique à la fonctionnalité de la protéine

La mucoviscidose est la maladie génétique grave à transmission autosomique récessive la plus fréquente dans les populations d'origine européenne. Cette pathologie est due au dysfonctionnement de la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), canal chlorure présent à la membrane apicale des cellules épithéliales. La gravité de la pathologie dépend de la ou des mutations du gène CFTR. L'objectif de nos travaux est de comprendre l'impact des mutations du gène CFTR afin d'établir un conseil génétique avisé. Pour cela, nous avons dans un premier temps déterminé quelles sont les mutations présentes sur l'exon 9 du gène. A cause de la présence de copies de cette région, nous avons établi de nouvelles conditions expérimentales pour étudier exclusivement le gène, et ainsi deux pseudomutations ont été détectées. Dans un second temps, nous avons étudié trois allèles complexes contenant des mutations fréquentes de CFTR (D443Y, G576A, R668C) et une mutation rare, G149R. In vitro nous avons mis en évidence l'effet délétère de G149R seule ou en complexe, et la diminution de la quantité de la protéine mature lorsque les autres allèles complexes sont présents. Dans la dernière partie de ce travail, nous avons mis en place au laboratoire les techniques d'étude de l'épissage. Pour cela, nous avons construit un minigène hybride qui nous permet de définir le rôle exact des substitutions nucléotidiques sur l'épissage alternatif. Les résultats obtenus à partir de ces trois études nous ont permis de mieux comprendre l'impact des mutations étudiées et ainsi d'émettre un diagnostic moléculaire documenté.

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Mots clés : mutants *CFTR*, diagnostic moléculaire, allèle complexe, analyses fonctionnelles, minigène hybride, épissage

Molecular and cellular studies of *CFTR* gene mutations: from genetics to the functionality of the protein

Cystic fibrosis is a serious genetic disease autosomal recessive most frequent in populations of European origin. This pathology is due to dysfunction of the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) chloride channel present in the apical membrane of epithelial cells. The severity of the disease depends on mutations in the CFTR gene. The objective of our work is to understand the impact of CFTR mutations in order to establish a genetic counseling notified. For this, we initially determined which mutations are present in exon 9 and its flanking regions of the gene. As this region is duplicated in the genome, we established new experimental conditions to study exclusively the gene, and thus two pseudomutations were detected. In the second step, we examined complexes containing three frequent CFTR mutations (D443Y, G576A, R668C) and a rare mutation, G149R. In vitro we have demonstrated the deleterious effect of G149R alone or in complex and the decrease the amount of the mature protein complex when other alleles are present. In the last part of this work, we developed the laboratory techniques for the study of splicing. For this, we constructed a minigene hybrid that allows us to define the exact role of nucleotide substitutions on splicing. The results obtained from these three studies allowed us to better understand the impact of the studied mutations and thus to make a molecular diagnosis documented.

Keywords : *CFTR* mutants, molecular diagnostics, complex allele, functional analysis, hybrid minigene, splicing

Résumé :

La mucoviscidose est la maladie génétique grave à transmission autosomique récessive la plus fréquente dans les populations d'origine européenne. Cette pathologie est due au dysfonctionnement de la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), canal chlorure présent à la membrane apicale des cellules épithéliales. La gravité de la pathologie dépend de la ou des mutations du gène CFTR. L'objectif de nos travaux est de comprendre l'impact des mutations du gène CFTR afin d'établir un conseil génétique avisé. Pour cela, nous avons dans un premier temps déterminé quelles sont les mutations présentes sur l'exon 9 du gène. A cause de la présence de copies de cette région, nous avons établi de nouvelles conditions expérimentales pour étudier exclusivement le gène, et ainsi deux pseudomutations ont été détectées. Dans un second temps, nous avons étudié trois allèles complexes contenant des mutations fréquentes de CFTR (D443Y, G576A, R668C) et une mutation rare, G149R. In vitro nous avons mis en évidence l'effet délétère de G149R seule ou en complexe, et la diminution de la quantité de la protéine mature lorsque les autres allèles complexes sont présents. Dans la dernière partie de ce travail, nous avons mis en place au laboratoire les techniques d'étude de l'épissage. Pour cela, nous avons construit un minigène hybride qui nous permet de définir le rôle exact des substitutions nucléotidiques sur l'épissage alternatif. Les résultats obtenus à partir de ces trois études nous ont permis de mieux comprendre l'impact des mutations étudiées et ainsi d'émettre un diagnostic moléculaire documenté.

Mots clés: mutants *CFTR*, diagnostic moléculaire, allèle complexe, analyses fonctionnelles, minigène hybride, épissage

Summary:

Cystic fibrosis is a serious genetic disease autosomal recessive most frequent in populations of European origin. This pathology is due to dysfunction of the CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) chloride channel present in the apical membrane of epithelial cells. The severity of the disease depends on mutations in the CFTR gene. The objective of our work is to understand the impact of CFTR mutations in order to establish a genetic counseling notified. For this, we initially determined which mutations are present in exon 9 and its flanking regions of the gene. As this region is duplicated in the genome, we established new experimental conditions to study exclusively the gene, and thus two pseudomutations were detected. In the second step, we examined complexes containing three frequent CFTR mutations (D443Y, G576A, R668C) and a rare mutation, G149R. In vitro we have demonstrated the deleterious effect of G149R alone or in complex and the decrease the amount of the mature protein complex when other alleles are present. In the last part of this work, we developed the laboratory techniques for the study of splicing. For this, we constructed a minigene hybrid that allows us to define the exact role of nucleotide substitutions on splicing. The results obtained from these three studies allowed us to better understand the impact of the studied mutations and thus to make a molecular diagnosis documented.

Keywords: CFTR mutants, molecular diagnostics, complex allele, functional analysis, hybrid minigene, splicing

Travaux réalisés au sein de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaires, CNRS, UMR 6187 40 avenue du recteur Pineau 86022 Poitiers cedex