THÈSE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées Diplôme National – Arrêté du 7 août 2006

École Doctorale : Bio-santé

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par :

Arnaud BILLET

Relations structure-fonction du CFTR : Étude de l'influence de l'extrémité C-terminale du NBD1 et de son environnement moléculaire sur l'adressage, l'activité et la pharmacologie des canaux

Directeur de Thèse : Pr. Frédéric BECQ

Soutenue le 26 Novembre 2010 Devant la Commission d'Examen

JURY

M. VIVAUDOU P. LORY P. DELMAS I. CALLEBAUT C. COGNARD F. BECQ

Directeur de Recherche CEA, GrenobleRaDirecteur de Recherche CNRS, MontpellierRaDirecteur de Recherche CNRS, MarseilleExDirectrice de Recherche CNRS, ParisExDirecteur de Recherche CNRS, PoitiersExProfesseur des Universités, PoitiersEx

Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Examinateur Examinateur

Table des matières

troduction	12
I. La protéine CFTR	12
1. CFTR : transporteur ABC et protéine multifonctionnelle	
A. La superfamille des transporteurs ABC	
a) Généralités	
b) Topologie générale des transporteurs ABC	
c) Pathologies et transporteurs ABC	
B. La protéine CFTR et les tissus épithéliaux	
a) CFTR : un canal chlorure	
b) Fonction de CFTR au sein des épithéliums	
c) CFTR : également une protéine régulatrice	
d) Résumé	
2. Structure de la protéine CFTR	25
A. Structure générale des protéines	25
a) Les quatre niveaux de structuration des protéines	
b) Modélisation moléculaire tridimensionnelle	
B. Structure de la protéine CFTR	
a) Topologie générale	
b) Structure quaternaire de la protéine	
c) Modélisation tridimensionnelle du CFTR	
C. Des différents domaines à la fonction de CFTR	41
a) Les domaines transmembranaires	
b) Les boucles extracellulaires	
c) Les boucles intracellulaires	
d) Les domaines de liaison aux nucléotides	
e) Le domaine régulateur R	
f) Les extrémités de la protéine	49
3. Régulation de l'activité du canal CFTR	

A. Les processus de phosphorylation	
a) Implication des protéines kinases	
b) Conséquences structurales de la phosphorylation	54
B. Fixation et hydrolyse de l'ATP : rôle dans les processus d'ouverture	/fermeture du
canal	
a) Cycle de l'ATP	54
b) Conséquences structurales de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP	56
c. Résumé de la régulation de l'activité du canal	57
C. Régulation pharmacologique	58
a) Inhibiteurs de CFTR	
b) Activateurs de CFTR	60
II. Contexte physiopathologique : la mucoviscidose	63
1. Historique	63
2. Du gène à la protéine	65
A. Le gène CFTR	65
B. Biosynthèse et maturation de la protéine CFTR	66
C. Classes de mutations	68
3. Physiopathologie	70
A. Les différentes atteintes	70
a) Atteintes pulmonaires	
b) Atteintes digestives.	
c) Autres atteintes	
B. Traitements	74
a) Traitements disponibles	
b) La recherche thérapeutique	
sition du problème et objectifs	77
I. Contexte de l'étude	77

II. Les composés Benzo[c]quinolizinium	77
III. Projet de recherche	
Matériels et Méthodes	80
I. Système d'expression hétérologue	
1. Vecteurs d'expression	
A. Plasmide pEGFP-C1	
B. Mutagenèse dirigée	
a) Principe	
b) Matériel utilisé	
c) Amorces de mutagénèse dirigée	
d) Phase expérimentale	
C. Extraction plasmidique	
a) Principe	
b) Protocole	
c) Dosage et vérification de l'ADN plasmidique	
D. Séquençage des plasmides	
a) Principe	
b) Phase expérimentale	
E. Réalisation d'un souchier	
2. Système d'expression	
A. Culture cellulaire	
a) Type cellulaire	93
b) Culture Cellulaire	
B. Transfection transitoire	
a) Duinaine de la turnefection	07
a) r rincipe de la transjection	
<i>b)</i> 1 1010cole de lipojection	

1	
A. Préparation des échantillons	••••••
a) Lyse cellulaire	
b) Dosage protéique	
c) Dénaturation	
B. Western blot	••••••
a) Electrophorèse sur gel	
b) Électrotransfert	
c) Immunodétection	
d) Analyse par densitométrie	
C. Localisation des protéines : technique de microscopie	••••••
a) Microscope confocale	
a) Microscope confocale b) Protocole 2. Techniques de physiolologie cellulaire	
 a) Microscope confocale b) Protocole 2. Techniques de physiolologie cellulaire A. Mesure de courants transmembranaires : la technique de la la	patch-clamp
 a) Microscope confocale b) Protocole 2. Techniques de physiolologie cellulaire A. Mesure de courants transmembranaires : la technique de a) Principe 	patch-clamp
 a) Microscope confocale	patch-clamp

I. La glycine 622 et son environnement moléculaire	120
II. Résultats	122
1. Article scientifique	
2. Résumé des principaux résultats	
3. Résultats complémentaires	
A. Expériences complémentaires sur H620	
a) Détermination des EC_{50} de la Fsk pour le mutant CFTR-H620Q et la protéi	ine sauvage CFTR-
wt b) Effet d'autres mutations de l'histidine 620	
B. Expériences complémentaires sur G622D	
III. Discussion	141
 Implication de l'extrémité C-terminale dans l'adressage de CFT Implication de l'extrémité C-terminale dans la régulation de l'a CFTR 	^C R 141 ctivité de 142
3. Implication de l'extrémité C-terminale dans le mécanisme d'act composés benzo[c]quinolizinium Chapitre II. Exploration de l'environnement moléculaire de	ion des 144 <u>l'extrémité</u>
C-terminale du NBD1	<u>146</u>
I. Étude des résidus à proximité de H620	146
1. Analyse structurale	
2. Résultats	
A. Étude de la maturation	
B. Étude de la fonctionnalité	150
a) Enregistrement des courants chlorure	151
b) Analyse des courants enregistrés	
c) Étude de la sensibilité des mutants S459A et F640A à la Fsk - Calcul de l'E	C_{50} Fsk 155

C. Résumé des résultats	156
3. Discussion	
II. Étude des résidus à proximité d'E621	164
1. Analyse structurale	
2. Résultats	
A. Étude de la maturation	166
B. Étude de la fonctionnalité	
a) Enregistrement des courants chlorure	
b) Analyse des courants enregistrés	
C. Résumé des principaux résultats	172
3. Discussion	
III. Étude de l'effet des composés MPB	
1. Résultats	
2. Discussion	
Chapitre III. Exploration de l'entrée cytoplasmique du CFT	<u>R 187</u>
I. Contexte scientifique	
II. Résultats	
1. Analyse structurale	
2. Étude de deux résidus : E267 et V1056	190
A. Étude de la maturation	190
B. Étude de la fonctionnalité des mutants E267A et E267R	191
a) Enregistrements des courants chlorure	
b) Étude de la localisation cellulaire des mutants E267	
C. Étudo do la fonctionnalitó du mutant V1056U	103

III. Discussion	
Conclusions et perspectives	
Annexes	
Références bibliographiques	
Liste des publications	
Liste des communications	
Curriculum Vitae	224
Résumé	

Liste des abréviations

A		
r	7	

	A
ABC	ATP binding cassette : « boite » de liaison de l'ATP
ADN	Acide Désoxyribonucléique
	Adaposina Dinhosnhata
	Adénosine Diphosphate
AMPC	Adenosine-5,5-monophosphale cyclique
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messager
ASL	Airway Surface Liquid ou liquide de surface des voies aériennes
ATP	Adenosine Triphosphate
	D
	D
BHK	Baby Hamster Kidney
	С
CF	Cystic Fibrosis: Mucoviscidose
CETD	Cystic Fibrosis Transmombrane conductores Degulator
CLIK	Cystic Fibrosis Transmemorane conductance Regulator
	D
Domaine R	Domaine régulateur de CFTR
DTM	Domaine Transmembranaire
DIM	
	E
ECL	Extracellular Loop
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ENaC	Epithelial Na ⁺ Channel
EROC	FR Quality Control
Litte	Lit Quality Control
	Г
	F
F508del	Délétion d'une phénylalanine en position 508
Fsk	Forskoline
	G
CED	Graan Eluorasaant Dratain
OFF	
Gst	Genisteine
	Н
HEK	Human Embryonic Kidney
Hen	Heat Shock Protein
Tish	
	Ŧ
	I
ICL	Intracellular Loop
IP3	Inositol trisphosphate
	1 1

	Μ
MPB MRP	Sels de benzo[c]quinolizinium (<i>Marseille Poitiers Benzo</i> [c]quinolisinium) Multidrug Resistant Protein
MSD	Membrane Spanning Domain
	Ν
NBD	Nucleotide Binding Domain : domaine de liaison aux nucléotides
	0
ORCC	Outwardly Rectifying Chloride Channel
	Р
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Periciliary liquid / liquide péricilaire
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiésterase
Pi	Phosphate inorganique
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
Ро	Probabilité d'ouverture
	R
RE	Réticulum Endoplasmique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROMK	Renal Outer Medullary K ⁺ Channel
	Т
TM	Transmembranaire
TMD	TransMembrane Domain : domaine transmembranaire
TNP-ATP	2'-(ou-3')-O-(2, 4, 6-trinitrophényl)-adénosine 5'-triphosphate
	\mathbf{W}
wt	wild type ou protéine sauvage, non mutée

Introduction

Au cours de ce chapitre nous exposerons dans une première partie les différentes fonctions de la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), ainsi que sa structure et la régulation de son activité (physiologique et pharmacologique). Nous aborderons ensuite le contexte physiopathologique de l'étude, la mucoviscidose, afin de comprendre dans quel environnement se placent ces travaux et les implications que les éléments mis en relief par ce travail pourraient avoir.

I. La protéine CFTR

<u>1. CFTR : transporteur ABC et protéine multifonctionnelle</u></u>

Les recherches sur la structure moléculaire et l'activité de la protéine CFTR apparaissent techniquement difficiles de part sa taille et son poids moléculaire important (1480 acides aminés, 170 kDa). Cependant, suite à l'identification de la séquence de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène CF en 1989 (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989), l'analyse de la séquence en acides aminés de CFTR a été déduite et comparée à celles de protéines déjà connues. Ces comparaisons de séquences ont montré que la protéine CFTR appartenait à la superfamille des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*). Cette analogie avec les autres ABC transporteurs a donc permis et permet encore de mieux appréhender la structure et le fonctionnement de CFTR.

A. La superfamille des transporteurs ABC

a) Généralités

Les transporteurs ABC forment une des plus importantes superfamilles de protéines. Ces protéines sont des transporteurs transmembranaires dont des membres sont retrouvés dans toutes les espèces aussi bien eucaryotes que procaryotes, animales et végétales.

La caractéristique prédominante de ces protéines membranaires est leur capacité à lier et hydrolyser l'ATP via deux sites spécifiques, les NBDs (*Nucleotide Binding Domain*). En utilisant l'hydrolyse de l'ATP, ces transporteurs sont capables de faire transiter, au travers des membranes cellulaires, une grande variété de substances tels que des acides aminés, des peptides, des protéines, des ions organiques et inorganiques, certaines toxines ou encore certains antibiotiques (Higgins, 1992).

L'analyse de séquence ainsi que les éléments communs semblent indiquer que les différents transporteurs ABC sont issus d'une protéine ancestrale commune (Saurin et al., 1999).

La classification des transporteurs ABC comporte sept classes majeures notées ABCA à ABCG. Chez l'homme, on dénombre actuellement 49 transporteurs ABC (Dean et al., 2001).

b) Topologie générale des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC possèdent deux domaines transmembranaires hydrophobiques (DTM) et deux domaines de liaisons aux nucléotides (NBD) liés sur la face cytosolique de la protéine (Figure 1 *a*) (Higgins, 1992; Locher, 2004).

Les régions transmembranaires sont la plupart du temps composées de 6 segments transmembranaires. Cependant certains transporteurs font exception, comme le transporteur à l'histidine HisQ qui possède 5 segments par DTM (Kerppola and Ames, 1992) ou encore le transporteur de la vitamine B12 BtuC qui possède 10 segments par DTM (Locher et al., 2002). La nature des segments transmembranaires détermine le type de molécules transportées.

Les domaines de liaison aux nucléotides, les NBD, caractéristiques des transporteurs ABC, contiennent trois séquences très conservées par les membres de cette famille.

- Les séquences Walker A et B correspondant aux sites de liaison de l'ATP. Ces séquences ne sont pas spécifiques des transporteurs ABC mais sont retrouvées dans beaucoup de protéines ayant une activité ATPasique.
- Une séquence dite « signature » : la séquence C située entre les motifs Walker
 A et B. Elle est spécifique aux transporteurs ABC.

Outre les séquences impliquées dans la liaison de l'ATP au niveau des NBDs, de nombreuses homologies de séquences sont retrouvées entre les différents membres. Par exemple, il est retrouvé 22 % d'homologie de séquence entre les DTM des transporteurs Sav1866 et MsbA et 51 % d'homologie entre les séquences de leur NBD (Mornon et al., 2009). Ces homologies de séquences peuvent alors servir de base pour modéliser la structure moléculaire de protéines plus complexes telles que CFTR.



Figure 1 : Topologie générale des transporteurs ABC

a) Représentation des grands domaines constituant les protéines de la famille des ABC (DTM : domaines transmembranaires, *NBD* : Nucleotide Binding Domain : domaine de liaisons aux nucléotides). *b)* Exemple de domaines accessoires ou d'organisation particulière. D'après *www.icsn.cnrs.fr*

La translocation des diverses molécules à travers les membranes se fait principalement grâce à l'énergie d'hydrolyse de l'ATP sur les domaines NBD. Cependant, pour certain transporteurs, d'autres domaines appelés « domaines accessoires » peuvent être présents et influencer le processus de translocation (Figure 1 *b*)) (Biemans-Oldehinkel et al., 2006). C'est le cas de la protéine CFTR (ABCC7) qui en plus d'être le seul membre de la famille des ABC à être un canal ionique, est le seul à posséder un large domaine globulaire cytoplasmique : le domaine régulateur ou domaine R. Ce domaine, codé par un exon unique (le $13^{\text{ème}}$ exon), possède de nombreux sites de phosphorylation et est impliqué dans la régulation du fonctionnement de la protéine. Certains transporteurs présentent également une topologie légèrement différente de leurs homologues avec une sous unité régulatrice indépendante (ex : MRP1) ou encore formés par deux monomères ayant chacun un DTM et un NBD (ex : TAP) (Figure 1 *b*)).

c) Pathologies et transporteurs ABC

Chez l'homme, quinze maladies génétiques graves, dont la mucoviscidose, sont dues au dysfonctionnement de transporteurs ABC. Ces protéines peuvent aussi être responsables de certaines résistances des microorganismes aux antibiotiques ou induire des phénotypes de résistance des cellules tumorales à l'encontre de drogues anticancéreuses utilisées en chimiothérapie.

On peut citer comme exemples caractéristiques :

- Les protéines de type MDR (*Multi Drug Resistance*) comme la P-glycoprotéine ou les MRP (*Multidrug Resistance associated Protein*). Les protéines MDR sont impliquées dans la détoxification des cellules et sont donc capables de transporter un grand nombre de drogues cytotoxiques. Cependant, elles sont aussi impliquées dans le rejet de drogues anticancéreuses et sont donc impliquées dans les résistances aux chimiothérapies.

- Les récepteurs des sulfonylurées (SUR1 et SUR2), associés aux canaux potassiques Kir 6 pour former les canaux potassiques régulés par l'ATP. Dans ce cas, la sous unité SUR est l'élément régulateur de l'ensemble. Au niveau des cellules β pancréatiques, les sulfonylurées induisent la sécrétion d'insuline via ce complexe SUR/Kir. Des mutations de SUR peuvent alors provoquer une hypersécrétion d'insuline, pathologie appelée hypoglycémie hyperinsulinémique infantile persistante (Thomas et al., 1995) ou encore le devellopement de diabète.

- La protéine Vga(A) de *Staphylococcus aureus*. Cette protéine ABC confère la résistance aux composants streptogramines A et B utilisés en thérapie et dont certains sont

réservés à un usage hospitalier. Actuellement, on ne connait ni les structures ni les mécanismes d'action vis-à-vis des antibiotiques de la famille «MLS» (macrolides, lincosamides et streptogramines). La recherche des mécanismes de régulation de cette protéine servirait donc à combattre les agents pathogènes possédant cette résistance.

- Le canal chlorure CFTR : impliqué dans la mucoviscidose. Ce canal et la pathologie seront plus détaillés par la suite.

B. La protéine CFTR et les tissus épithéliaux

Les connaissances actuelles prouvent que la mucoviscidose a pour cause la déficience de la protéine CFTR. Cependant le rôle exact de cette protéine reste très discuté : régulateur d'une conductance chlorure ou canal chlorure membranaire à part entière.

a) CFTR : un canal chlorure

Dès 1990, des études d'expression hétérologue de CFTR dans différents modèles cellulaires permettent de proposer un rôle de la protéine CFTR dans la sécrétion d'ions chlorure des épithéliums.

Une première étude montre que, dans des cellules mucoviscidosiques (cellules CF) présentant un défaut de sécrétion chlorure AMPc (adénosine-3',5'-monophosphate cyclique) dépendante, l'expression d'un CFTR fonctionnel rétablit cette régulation (Drumm et al., 1990). En parallèle, il est mis en évidence que l'expression d'une protéine CFTR sauvage (wt-CFTR) dans des cellules épithéliales de voies aériennes CF rétablit la sécrétion chlorure (Rich et al., 1990). En revanche lorsque la protéine mutée CFTR-F508del (mutation la plus fréquente dans la mucoviscidose voir partie II. 2. C.) est exprimée, le défaut de régulation n'est pas corrigé (Rich et al., 1990). Il apparaît donc clairement que la cause de la pathologie est un défaut d'une conductance chlorure régulée par CFTR.

Par la suite, de nombreux travaux utilisant l'expression de la protéine dans différents modèles cellulaires n'exprimant pas de manière endogène de canaux chlorure régulés par l'AMPc vont conforter cette hypothèse et proposer la protéine CFTR comme canal chlorure à part entière. Citons entre autres, des travaux de Bear *et al* qui montrent que l'expression de protéines CFTR dans des ovocytes de Xénope génère une conductance

chlorure en présence d'AMPc (Bear et al., 1991). Par la suite, il est montré que l'incorporation de CFTR purifié en bicouche lipidique engendre un courant chlorure activé par l'AMPc (Bear et al., 1992).

Des résultats similaires sont publiés la même année par Rommens et son équipe montrant que l'expression de protéines CFTR sauvages dans des fibroblastes murins induit une conductance chlorure AMPc dépendante. Il montrent également que la transfection du même type cellulaire par un ADNc de la protéine CFTR portant la mutation F508del n'induit pas cette sécrétion de chlorure (Rommens et al., 1991).

D'autres travaux similaires sont réalisés sur différents modèles de cellules épithéliales montrant la relation entre mutation CF et défaut de conductance chlorure AMPc dépendant (White et al., 1990; Dean et al., 1990; Rommens et al., 1991; Zielenski et al., 1991).

Par ailleurs en 1991, grâce à des techniques d'électrophysiologie en canal unitaire, les équipes de Hanrahan et Welsh font des progrès majeurs concernant le fonctionnement de la protéine. La première équipe montre que l'activité du canal est régulée par des processus de phosphorylation/déphosphorylation de la protéine. Ils précisent que l'activation AMPc dépendante passe par la phosphorylation des canaux via les protéines kinases A et C (PKA et PKC) et que cette activité peut être inhibée en présence de phosphatases (Tabcharani et al., 1991). L'équipe de Welsh confirme le rôle des PKA et ajoute que l'activation de CFTR est dépendante de l'ATP. Ils notent également que cette activation ne dépend pas du voltage imposé à la membrane (relation courant-potentiel linéaire) et que le canal possède une faible conductance (10,4 + 0,2 pS) (Berger et al., 1991; Anderson et al., 1991a).

Cependant, malgré toutes les preuves sur la nature de la protéine, l'hypothèse de CFTR comme régulateur d'un transporteur chlorure est encore présente. Une nouvelle étude d'Anderson la même année montre que la mutation de deux acides aminés supposés être localisés dans le pore de la protéine CFTR induit une altération de la sélectivité de CFTR visà-vis des anions (Anderson et al., 1991b). En effet, la séquence de sélectivité de la protéine sauvage est : Bromure > Chlorure > Iodure > Fluorure. Lorsque deux lysines du pore (K95 et K335) sont mutées en acides aminés acides (respectivement acide aspartique et acide glutamique) alors la séquence de sélectivité devient Iodure > Bromure > Chlorure > Fluorure.

Depuis ces études, il est désormais admis que la protéine CFTR est un canal chlorure, voltage et temps indépendant, AMPc dépendant (régulé par phosphorylation via des PKA et PKC), utilisant l'hydrolyse de l'ATP comme énergie et ayant une faible conductance.

b) Fonction de CFTR au sein des épithéliums

Les épithéliums sont des tissus constitués de cellules jointives et solidaires les unes des autres grâce à des jonctions intercellulaires, les jonctions serrées. Ces tissus interviennent dans la constitution d'une barrière continue entre deux compartiments et permettent d'isoler le milieu interne de l'environnement extérieur et de délimiter des espaces spécialisés. Les cellules épithéliales sont polarisées avec une face apicale en vis-à-vis avec la lumière de l'organe et une face basale accolée à la lame basale sur laquelle le tissu repose.

Il existe différents types d'épithéliums (simple, stratifié ou pseudo-stratifié) formés de cellules pavimenteuses, cuboïdes, cylindriques (prismatiques) ou polymorphes. L'épithélium des voies aériennes est, par exemple, un épithélium pseudo-stratifié de cellules prismatiques.

Les épithéliums ne sont pas vascularisés, l'apport des nutriments et l'export des déchets se fait donc en relation avec le tissu conjonctif sous-jacent par l'intermédiaire de la lame basale. Les concentrations ioniques à l'intérieur des cellules sont régulées par des protéines de transports membranaires telles que des pompes, des transporteurs et des canaux ioniques.

La sécrétion des ions chlorure fait intervenir différents acteurs (Figure 2). Les ions chlorure pénètrent dans la cellule au niveau de la membrane basale via le co-transporteur Na/K/Cl (NKCC). L'activité de la pompe Na/K ATPase, localisée face basale également, permet de réguler les concentrations intracellulaires de sodium et de créer un gradient favorable à l'accumulation intracellulaire de chlorure. Les ions potassium ressortent de la cellule via des canaux potassiques basolatéraux. La sécrétion des ions chlorure se fait par des canaux présents sur la face apicale. Lorsque l'épithélium n'est pas situé dans un environnement pathologique, les canaux retrouvés sur la membrane apicale sont notamment le CFTR le canal ClC-2, le canal chlorure Cl_{vol} régulé par le volume cellulaire ou encore l'ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*), un canal chlorure rectifiant sortant.



<u>Figure 2 : Représentation schématique des sécrétions chlorure au travers d'un épithélium</u> <u>sécréteur</u> Modifié d'après http://www.jle.com/fr

La protéine CFTR est donc un canal chlorure localisé sur la face apicale des cellules épithéliales. Son expression tissulaire est large puisqu'on la retrouve dans la majorité des épithéliums sécréteurs (Crawford et al., 1991). CFTR permet la sortie des ions chlorure hors des cellules épithéliales. Cette sortie d'ions induit par osmose un appel d'eau qui passe alors dans le compartiment muqueux par la voie paracellulaire (voir Figure 2). Ces échanges permettent l'hydratation des sécrétions muqueuses dont la fluidité est indispensable au bon fonctionnement du système ciliaire des cellules épithéliales.

Dans le cas de la mucoviscidose, l'absence ou l'altération du fonctionnement de ce canal ionique, conduisent, entre autre, à un déficit en chlorure extracellulaire et par le biais d'un défaut d'hydratation, à une augmentation de viscosité du mucus qui va s'accumuler dans les voies respiratoires et digestives pour aboutir à des lésions de divers organes, tels que les poumons mais aussi le pancréas, le foie et le tube digestif. L'accumulation de mucus au sein des épithéliums va également favoriser le développement des infections bactériennes.

Il est à noter que ce phénomène de sécrétion et de diffusion est inversé au niveau des glandes sudoripares, les ions chlorure entrant dans les cellules épithéliales. L'absence de CFTR fonctionnel à la membrane engendre une accumulation de Cl⁻ extracellulaire expliquant la forte teneur en sels dans la sueur des malades.

Introduction

c) CFTR : également une protéine régulatrice

Comme il a été décrit précédemment, la protéine CFTR a longtemps été considérée comme un régulateur de conductance ionique avant qu'il soit admis que cette protéine était un canal chlorure à part entière. Cependant, la démonstration est maintenant faite que CFTR est aussi une protéine régulatrice de courant chlorure (ORCC) et d'autres protéines diverses telles que le canal sodique ENaC (*Epithélial Na*⁺ *Channel*), le canal potassique ROMK (*Renal Outer Medullar K*), les aquaporines ou certaines connexines.

CFTR et ORCC

L'ORCC, présent dans les cellules épithéliales, est un des canaux participant à la sécrétion des ions chlorure. Il est régulé par les PKA et présente une anomalie de régulation dans les cellules CF (Hwang et al., 1989).

La complémentation de CFTR sauvage dans des cellules CF rétablit le défaut de régulation de l'ORCC par la PKA (Egan et al., 1992). De plus, une étude sur des cellules épithéliales nasales issues de souris dont le gène CFTR a été invalidé (souris Knockout -KO-cftr-/-) a montré que le courant porté par la protéine ORCC était enregistrable malgré l'absence de CFTR. En revanche dans ces conditions, la régulation de cette conductance par les PKA n'était plus observée (Gabriel et al., 1993). Ces différents résultats apportent les preuves de la régulation de l'ORCC par le CFTR.

• CFTR et ENaC

L'une des premières observations faites chez les malades atteints de mucoviscidose était un taux élevé de sels (NaCl) dans la sueur. Il fut rapidement démontré que dans les épithéliums pulmonaires et nasaux CF, un courant sodique sensible à l'amiloride (dérivé de guanidine inhibiteur de certaines conductances sodiques) était plus important en absence d'augmentation intracellulaire d'AMPc (Knowles et al., 1983; Boucher et al., 1986).

En 1993, le canal sodique ENaC est cloné (Canessa et al., 1993) et il est montré alors comme un des acteurs majeurs de l'homéostasie sodique. Il existe une régulation fine de l'activité de cette protéine, mettant en jeu des systèmes hormonaux ou non hormonaux pouvant affecter son expression, son adressage ou sa fonction. C'est un canal amiloride sensible ce qui en fait une cible putative du partenaire sodique de CFTR mis en évidence précedemment.

En 1995, Stutts *et al.* montrent que dans un système hétérologue, la co-transfection de CFTR et du canal ENaC diminue le courant sodique amiloride sensible en comparaison avec des cellules n'exprimant que la protéine ENaC (Stutts et al., 1995). Par la suite cette inhibition d'absorption sodique est corrélée avec l'activation de CFTR endogène dans de nombreux systèmes cellulaires (Ling et al., 1997; Letz and Korbmacher, 1997).

De nombreux mécanismes possibles ont été proposés pour expliquer cette inhibition d'ENaC par le canal CFTR mais pour le moment aucune hypothèse n'explique entièrement cette régulation. Toutefois des études ont montré que le flux et l'accumulation d'ions chlorure dans le cytoplasme semblaient essentiels pour que cette inhibition ait lieu (Briel et al., 1998; Konig et al., 2001). De plus, des études suggèrent qu'une interaction physique existe, interaction directe (Kunzelmann et al., 1997; Ji et al., 2000) ou via un réseau de protéines adaptatrices associées au domaine PDZ de CFTR (Qi et al., 1999; Naren and Kirk, 2000; Boucherot et al., 2001).

Quoi qu'il en soit, il est bien démontré que la protéine CFTR régule négativement le canal ENaC et que son absence, dans le cadre de la pathologie, entraîne une hyperabsorption de Na⁺, favorisant notamment la déshydratation du mucus.

• CFTR et ROMK

Les canaux ROMK sont des canaux potassiques à rectification entrante, activés par l'ATP et inhibés par le glibenclamide (molécule de la classe des sulfonylurées (McNicholas et al., 1996b).

Il est maintenant avéré que les protéines CFTR et ROMK sont co-exprimées à la membrane apicale du tube collecteur du rein (Devuyst et al., 1996). Une étude réalisée dans des ovocytes de Xénope montre que ROMK a une sensibilité accrue au glibenclamide lorsque ce canal est exprimé avec CFTR (McNicholas et al., 1996a). Cependant, le premier domaine transmembranaire et le NBD1 du canal CFTR fonctionnel seraient nécessaires à l'interaction CFTR/ROMK (McNicholas et al., 1997). Plus tard une autre étude ajoute que le domaine R de CFTR serait aussi impliqué dans la régulation de l'inhibition de ROMK par le glibenclamide (Cahill et al., 2000).

Par la suite, des travaux ont démontré que, chez des souris présentant un phénotype mucoviscidosique sévère (F508del/F508del), la sensibilité du canal ROMK à

l'ATP était perdue (Lu et al., 2006). Cette étude a donc démontré que la présence de CFTR fonctionnel à la membrane était requise pour une régulation de ROMK par l'ATP. Récemment il a été montré que cette régulation était unidirectionnelle et que l'absence de ROMK n'influençait pas la régulation de CFTR (Lu et al., 2010).

• CFTR et jonctions communicantes

De nombreuses observations suggèrent que l'expression de la protéine canal CFTR peut avoir une implication dans le maintien de l'homéostasie cellulaire de nombreux types cellulaires humains, et cela via une régulation de la communication cellulaire.

L'une des premières évidences d'un rôle de la communication intercellulaire dans les cellules CF provient d'expériences cherchant à faire exprimer la protéine CFTR sauvage dans des cellules n'en exprimant pas de façon endogène. Des expériences ont montré qu'il suffisait de transfecter 6 à 10 % des cellules CF pour restaurer des propriétés normales de transport dans des lignées cellulaires (Johnson et al., 1992). Plus récemment il a été montré par des expériences de co-culture primaire de cellules épithéliales bronchiques humaines, que 10 % de cellules non-CF cultivées avec des cellules CF suffisait à restaurer des propriétés normales de transport (Dannhoffer et al., 2009).

Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que le transport d'ions et de métabolites étaient amplifiés par les jonctions communicantes. Par la suite, plusieurs études ont montré que la protéine CFTR régulait la communication intercellulaire via les jonctions communicantes.

En effet, en 1999, il est mis en évidence que la régulation des jonctions communicantes par l'AMPc était défaillante dans les cellules canalaires pancréatiques CF et que l'expression de CFTR sauvage au sein de ces cellules restaurait un bon niveau de communication jonctionnelle (Chanson et al., 1999). Dans cette étude, il est montré que l'effet de l'AMPc sur la communication jonctionnelle était dû à l'augmentation de la conductance unitaire de CFTR et non au changement de la conductance unitaire de la connexine 45 (Cx45), protéine participant fortement à la communication jonctionnelle dans ces cellules. Ces observations ont suggéré une interaction entre CFTR et la connexine 45, interaction confirmée par des expériences de co-expression de CFTR et de connexine Cx45 dans des ovocytes de Xénope (Kotsias and Peracchia, 2005).

Par la suite, il est montré que CFTR interagissait avec d'autres connexines telles que la Cx40, Cx32 ou Cx50. Cette interaction se ferait via des protéines d'échafaudage du cytosquelette et/ou des intermédiaires cytoplasmiques (Kotsias et al., 2006)

• CFTR et aquaporines

Les aquaporines sont des protéines membranaires formant des pores dans les membranes cellulaires. Elles permettent ainsi le passage de l'eau de part et d'autre de la membrane tout en empêchant les ions de pénétrer dans la cellule.

Parmi les 200 aquaporines découvertes dans le règne végétal et animal, 10 isoformes sont retrouvées chez l'homme.

Une étude menée dans un système d'expression hétérologue révèle une régulation positive de CFTR sur l'AQP3. Il a été montré que les ovocytes de Xénope utilisés dans cette étude présentaient une perméabilité à l'eau accrue en présence de CFTR (Schreiber et al., 2000). Cette régulation positive des aquaporines par CFTR pourrait aussi participer à l'hydratation du mucus et par conséquent l'absence de CFTR entraînerait une diminution de la perméabilité à l'eau via les aquaporines chez les patients CF.

d) Résumé

Pour résumé, CFTR est de par ses multiples fonctions, un élément central de la régulation de l'homéostasie des cellules épithéliales.

Bilan

- CFTR est un canal chlorure AMPc dépendant localisé à la membrane apicale des cellules épithéliales et dont l'activité est régulée par l'ATP.
- CFTR est aussi un régulateur de nombreuses fonctions de transport dans les épithéliums :
 - Transport de Na⁺ par l'interaction CFTR-ENaC.
 - Transport de Cl⁻ par l'interaction CFTR-ORCC.
 - Transport de K⁺ par l'interaction CFTR-ROMK.
 - Transport d'H₂O par l'interaction CFTR-aquaporines.
 - Transport de certains métabolites par l'interaction CFTR-connexines.

CFTR semble également être un régulateur d'autres protéines et conductances :

- Régulateur de conductances calciques par interaction avec les canaux TRPV4 (Arniges et al., 2004) et TRPC6 (Antigny et al., 2010).

- Régulateur de la sécrétion d'HCO₃⁻ par interaction avec la protéine SLC26 (Ko et al., 2002).

- Régulateur de la sécrétion de glutathion (Kogan et al., 2003)

Introduction

2. Structure de la protéine CFTR

Notre étude portant sur les relations structure/fonction de la protéine CFTR, il convient de donner ici quelques rappels sur la structure des protéines.

A. Structure générale des protéines

La structure des protéines correspond à la composition en acides aminés et la conformation en trois dimensions. Une protéine est un enchaînement linéaire d'acides aminés (liés entre eux par des liaisons peptidiques) organisé en trois dimensions selon un repliement qui lui est propre et dépendant de la nature des acides aminés. De la séquence linéaire à l'organisation cellulaire de la protéine, il existe quatre niveaux de structuration (Bränden et al., 1996).

a) Les quatre niveaux de structuration des protéines

o Structure primaire et acides aminés

La structure primaire de la protéine correspond à l'enchaînement linéaire des acides aminés la constituant. Cette structure est le fruit de la traduction d'ARN messager (ARNm) en séquence protéique par les ribosomes.

Les acides aminés sont composés de deux chaînes (Figure 3) : une chaîne principale invariable (groupement NH_2 , COOH et atome de carbone C) et une chaîne latérale « R » de nature différente conférant une propriété particulière à l'acide aminé qui la porte.

25

Introduction



Figure 3: Structure commune à tous les acides aminés

C : atome de carbone, O : atome d'oxygène, H: atome d'hydrogène, N : atome d'azote, R : chaîne latérale. *http://www.science-et-vie.net*

Il existe une vingtaine d'acides aminés possédant donc des caractéristiques de taille, de charge et de polarités différentes. Les 20 acides aminés naturels sont regroupés sur la Figure 4.



Figure 4 : Récapitulatif des 20 acides aminés naturels.

Les parties grisées représentent la chaîne principale. Les acides aminés sont regroupés selon leur polarité et/ou charge.

La structure primaire d'une protéine peut donner des indications sur les séquences secondaires et tertiaires mais ne donne pas accès à la structure tertiaire tridimensionnelle.

• <u>Structure secondaire et motifs structuraux</u>

La structure secondaire décrit le repliement local de la chaîne principale. La conformation de la protéine est stabilisée par des liaisons hydrogènes intramoléculaire entre les groupements amide (-NH) et carbonyle (-CO) du squelette carboné. La liaison entre deux acides aminés étant une liaison plane, il est à noter qu'il existe deux degrés de liberté de rotation notés angles φ et Ψ (Figure 5). La conformation du squelette d'une chaîne peptidique peut donc être déterminée à partir de ces deux angles dits « angles dièdres ».



Figure 5: Illustration des angles dièdres φ-Ψ.R représente une chaîne latérale alors que Ca correspond aux carbones principaux portant
cette chaîne.D'après : http://www.chusa.jussieu.fr

Le repliement des liaisons peptidiques est caractérisé par trois motifs structuraux : les hélices α , les feuillets β et les coudes.

<u>Hélices</u> α (Figure 6): structure périodique caractérisée par un repliement hélicoïdal périodique. Dans ce cas cette conformation implique des liaisons hydrogènes répétitives entres atomes de la chaîne principale des résidus i et i+4. Cette conformation très stable permet de séparer les résidus hydrophiles et hydrophobes sur chaque côté de l'hélice.



Figure 6 : Représentation d'un enchaînement d'acides aminés organisés en hélices α R représente une chaîne latérale. Les pointillés représentent les interactions entre atomes. Source : *http://www.chusa.jussieu.fr*

<u>Feuillets</u> β (Figure 7): structure formée de brin β (structure périodique étendue dont les chaînes latérales sont situées alternativement au dessus et en dessous du plan du feuillet). Les liaisons hydrogènes stabilisant les brins β se font entre résidus distants contrairement aux hélices α . Un brin β seul n'est pas stable, il est donc nécessaire qu'il y ait formation de liaisons hydrogènes avec d'autre brins β , l'ensemble formant alors un feuillet β . Les brins β ont une polarité du N-terminal de la chaîne peptidique vers le C-terminal. Lors de l'agencement en feuillets, deux topologies sont possibles : les deux brins ont la même orientation, on parle de brins parallèles ou les deux brins ont des orientations opposées, il s'agit de brins antiparallèles.



Figure 7 : Représentation d'un enchaînement d'acides aminés organisés en feuillet βR représente une chaîne latérale. Les pointillés représentent les interactions entre atomes.A. Représentation de brins β vue de face (gauche) et de côté (droite)B. Représentation en feuillet β vue du haut
Source : http://www.chusa.jussieu.fr

<u>Coudes β et γ </u>: ce ne sont pas des structures périodiques mais des repliements particuliers du squelette carboné permettant la liaison et l'inversion de la chaîne principale. Ce sont des structures à 3 (γ) ou 4 résidus (β)

o <u>Structure tertiaire</u>

La structure tertiaire d'une protéine correspond au repliement polypeptidique tridimensionnel, c'est-à-dire à l'organisation spatiale des hélices α et des feuillets β . La protéine acquiert sa fonction lorsque sa structure tertiaire est réalisée. Lorsque la protéine est dénaturée, par des agents dénaturants comme le triton ou le SDS, la structure tertiaire est cassée, la protéine perd alors sa fonction.

Cette structure tertiaire dépend de la structure primaire de la protéine. Deux protéines différentes mais avec une forte homologie de séquence présenteront des structures

tertiaires très proches. Cette caractéristique d'homologie de séquence est l'un des outils les plus utiles dans la détermination des modèles moléculaires.

La structure tertiaire est maintenue par différentes interactions entre les résidus de la chaîne d'acides aminés :

- Interactions hydrophobes
- Interactions covalentes : ponts disulfures entre cystéines
- Interactions électrostatiques : liaisons ioniques ou hydrogènes
- Forces de Van der Waals (interactions dipolaires temporaires de faible force)

La séquence d'une protéine comporte une certaine proportion d'acides aminés polaires (hydrophiles) et non polaires (hydrophobes). Le repliement tertiaire de la chaîne polypeptidique se fait donc également en fonction de l'environnement de la protéine. Une protéine soluble se repliera de sorte à avoir un cœur hydrophobe au centre de la structure tandis que les résidus polaires resteront plutôt en surface de la protéine. Dans le cas des protéines transmembranaires, les résidus polaires se situeront préférentiellement au cœur des portions membranaires alors que les acides aminés apolaires resteront en contact avec la membrane qui est globalement hydrophobe.

L'étude du profil d'hydrophobicité permet donc de cibler des zones hydrophobes / hydrophiles le long de la séquence et donc de prédire la structure tertiaire de la protéine.

o <u>Structure quaternaire</u>

La structure quaternaire des protéines regroupe l'association de plusieurs chaînes polypeptidiques identiques ou différentes. Chacune des chaînes est appelée monomère ou sous unité et l'ensemble oligomère ou protéine multimérique (dimère, trimère, etc.).

b) Modélisation moléculaire tridimensionnelle

La topologie d'une protéine est obtenue grâce à l'étude des structures primaires et secondaires de la protéine mais également du profil d'hydrophobicité qui en est déduit. Cependant si cette représentation nous renseigne sur la forme générale de la protéine et les connexions de ses structures secondaires, elle ne donne aucune indication sur la structure tertiaire, c'est-à-dire l'aspect tridimensionnel de l'élément étudié. Or la vue en 3 dimensions des protéines apporte de multiples renseignements sur le fonctionnement de cette dernière :

interactions entre les différents domaines, les conséquences de modifications d'acides aminés ou encore les sites possibles d'interaction avec des agents pharmacologiques.

Pour réaliser la modélisation 3D d'une molécule plusieurs techniques sont utilisées. Cependant cette modélisation peut être plus ou moins difficile selon les cas :

 la protéine étudiée n'a pas ou très peu d'homologie de séquence avec d'autre protéine. Dans ce cas, l'étude structurale par cristallographie à rayon X et/ou la spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) est indispensable.

- La protéine étudiée a une grande homologie de séquence avec des protéines de structures déjà connues. Dans ce cas sont utilisées des méthodes d'alignement de séquences, de modélisation comparative ou encore de reconnaissance de repliements.

La suite de ce chapitre décrira brièvement ces différentes approches. Les informations décrites par la suite sont issus du livre de Ghale Rhodes : *Crystallography Made Crystal Clear* (Rhodes, 2006) de documents du CEA (Commissariat à l'énergie atomique) ou de cours en ligne de polytech Nice-Sophia et de l'université de Jussieu.

• Cristallographie

La cristallographie de rayon X est une technique qui peut indiquer les positions tridimensionnelles précises de la plupart des atomes dans une molécule de protéine. Les protéines sont cristallisées (pour que toutes les molécules soient orientées avec précision) puis soumis à des rayons X. Le mouvement processionnel du cristal a comme conséquence une photographie de rayon X se composant d'un alignement régulier de taches appelées les réflexions.

L'intensité de chaque réflexion est mesurée puis une image est reconstruite à partir des intensités observées par application de transformations telles que des transformations de Fourier (Rhodes, 2006).

• La spectroscopie RMN

Le principe de la résonance magnétique nucléaire consiste à plonger une protéine en solution dans un champ magnétique intense (entre 10 et 20 teslas). Les spins des noyaux atomiques composant la protéine s'orientent le long de l'axe principal du champ magnétique. L'état d'équilibre de ces spins est alors perturbé par une série d'impulsions électromagnétiques puis le courant induit lors du retour à l'équilibre est enregistré. Le signal RMN enregistré contient la combinaison de l'ensemble des contributions des différents atomes en solution. Sa transformée de Fourier fournit les différentes fréquences de résonnances de spins observées.

La détermination de la structure des protéines à partir des données RMN passe par deux étapes. La première consiste à établir la liste des déplacements chimiques de tous les noyaux observables de la protéine, 1H, 15N, 13C. La seconde étape comprend l'analyse des corrélations résultant de la proximité spatiale des différents noyaux. Celles-ci sont attribuées à des couples de noyaux et sont introduites sous forme de contraintes de distance dans une procédure de modélisation moléculaire. D'autres données expérimentales issues de mesures RMN (déplacements chimiques, constantes de couplage), sont exploitées lors de la modélisation.

• Alignements de séquences et modélisation comparative

Analyse réalisée lorsque la protéine étudiée présente une homologie de séquence avec d'autres protéines (de la même famille par exemple). Cette méthode est basée sur l'utilisation d'une structure connue expérimentalement comme référence pour construire un modèle. Elle comporte quatre grandes étapes : la reconnaissance du repliement (sélection du support homologue), l'alignement optimal des séquences, la construction du modèle 3D puis sa validation.

Il est à noter que l'homologie est une notion qualitative, deux protéines sont homologues si elles ont un ancêtre commun. Il n'existe pas de pourcentage d'homologie. En revanche il est question de pourcentage d'identité qui correspond à la proportion de paires de résidus identiques entre deux séquences.

Donc lorsque les séquences présentent un taux d'identité supérieur à 40 %, l'alignement des séquences peut être automatisé grâce à des programmes informatiques tels que Swiss-Model ou BLAST. A partir de cet alignement, les structures secondaires sont prédites informatiquement.

Toutes ces informations ajoutées au profil d'hydrophobicité servent ensuite à construire un modèle 3D qui sera validé par calcul des contraintes spatiales et énergétiques.

B. Structure de la protéine CFTR

a) Topologie générale

Dès le clonage du gène *CFTR* la relation structure/fonction de la protéine a été étudiée. Après l'identification de la séquence primaire, l'appartenance de la protéine CFTR à la famille des transporteurs ABC a servi de base pour créer l'ébauche de sa structure.

Grâce à l'étude de la structure primaire et du profil d'hydrophobicité il a pu être réalisé une topologie générale de la protéine canal. D'après ces études, il a été montré que 4% de la protéine représentaient des domaines extracellulaires, 19% des domaines transmembranaires et 77% des domaines cytoplasmiques (Chang et al., 1994). Dans la famille des transporteurs ABC, CFTR possède la plus grande proportion de domaines protéiques cytoplasmiques, rapport pouvant s'expliquer par la présence d'un domaine accessoire particulier, le domaine R.

L'analyse de la séquence et les homologies avec les autres membres de la famille ABC montrent une topologie générale du CFTR similaire à celle de la plupart des transporteurs de la famille : deux parties comportant les mêmes structures et reliées entre elles.

Chaque partie est composée d'un domaine transmembranaire (DTM ou MSD pour *Membrane Spanning Domain*) et un domaine intracellulaire : un domaine de liaison aux nucléotides (NBD). Les deux parties sont reliées entre elles par un troisième domaine intracellulaire, le domaine régulateur R, particularité du CFTR au sein de la famille des ABCs. Les extrémités terminales (NH₂ et COOH) sont cytoplasmiques (Tusnady et al., 1997; Akabas et al., 1997). La Figure 8 représente une illustration de la topologie de la protéine CFTR.



Figure 8 : Schéma de la topologie membranaire du canal CFTR MSD : *Membrane Spanning Domain*, NBD : *Nucleotide Binding Domain*, MP : Membrane Plasmique.

b) Structure quaternaire de la protéine

Alors que les données sont de plus en plus nombreuses et précises quant à la structure tertiaire du canal CFTR, la structure quaternaire de la protéine reste un élément irrésolu.

Des études biochimiques et fonctionnelles montrent que l'activité du canal peut être portée par une forme monomérique de la protéine (Chen et al., 2002; Ramjeesingh et al., 2003). Ces expériences utilisant des protéines purifiées exprimées dans des liposomes reconstitués ont montré que des monomères de CFTR étaient capables de transporter du chlorure et possédaient les caractéristiques électrophysiologiques connues du canal CFTR. Ces données se trouvent confortées par l'homologie structurale et biochimique avec certains transporteurs ABC comme MsbA (Chang and Roth, 2001) et BtuCD (Locher et al., 2002). Elles sont confortées aussi par la présence de tous les composants essentiels à une protéine fonctionnelle dans un polypeptide simple de CFTR.

Cependant il a aussi été montré la présence de dimères de CFTR à la membrane plasmique (Ramjeesingh et al., 2003). Deux protéines s'associeraient mais fonctionneraient indépendamment l'une de l'autre. Ces dimères ne seraient présents qu'à la membrane plasmique. En effet, ils ne sont détectables que dans des échantillons enrichis de membranes plasmiques, les homogénats de cellules entières ne montrant que la présence de monomères. Il y aurait donc un faible taux de dimérisation, expliquant la non détection de ces complexes dans certaines conditions expérimentales. Récemment une étude a montré par microscopie électronique que les protéines CFTR pouvaient former un dimère « queue à queue » en structure ellipsoïdale (Mio et al., 2008).

Il y aurait donc présence de plusieurs structures quaternaires de la protéine : monomère et dimère. Toutefois, le domaine de contact de deux monomères tout comme les conséquences d'une dimérisation restent encore inconnus même si certains éléments de réponses sont mis en lumière.

Concernant le point d'ancrage de deux monomères, on retrouve un motif de dimérisation de type glycophorine (protéine retrouvées dans la membrane des érythrocytes) GXXXG dans certains segments des DTMs et dans le second NBD (Kidd et al., 2004).

Concernant les conséquences de la dimérisation, une des hypothèses proposées serait que la dimérisation permettrait de révéler certains motifs structuraux particuliers nécessaires à l'activation des canaux via des molécules de signalisation particulières. De plus, une étude électrophysiologique de dimères de CFTR a montré une coopération entre les protéines qui allonge le temps d'ouverture des canaux (Krouse and Wine, 2001).

c) Modélisation tridimensionnelle du CFTR

CFTR étant une protéine de grande taille (170 kDa), il s'avère difficile d'appliquer les techniques de modélisation moléculaire expérimentale afin d'obtenir un modèle de haute résolution. Les techniques d'alignement de séquences et de modélisation comparative ont donc été, et sont toujours, largement utilisées pour élucider la structure 3D de la protéine.

36
La modélisation de la protéine a été réalisée en plusieurs temps. Les domaines NBDs ont d'abord été étudiés puis les domaines transmembranaires et les boucles extra et intracellulaires ont été modélisés. Le domaine R de par son absence chez d'autres transporteurs ABC reste peu modélisé.

Un premier modèle de NBD1 est proposé en 1997 par comparaison avec les séquences des domaines F1-ATPase mitochondriaux ou encore la protéine RecA (Bianchet et al., 1997). Cette étude propose un déplacement des frontières des NBDs. Les premières séquences proposées étaient F433-S589 pour le NBD1 et Y1218-R1386 pour le NBD2 (Riordan et al., 1989). Suite à l'alignement de séquence réalisé par Bianchet *et al.*, les limites proposées deviennent L441-K684 pour le NBD1 et L1227-L1480 pour le NBD2. Toutefois ces dernières sont régulièrement affinées grâce notamment à des expériences de délétion de portion de protéine ou de mutagénèse dirigée.

Par la suite, un modèle de NBD1 murin est proposé en utilisant les techniques d'alignement de séquence et de cristallographie (Lewis et al., 2004). Les protéines ABC prises comme référence sont entre autre : la p-glycoprotéine (pgp), MRP1, HisP ou encore TAP1. Cette étude propose d'étudier les différences structurales du domaine en absence de ligand, en présence d'ADP ou d'ATP et avec ou sans phosphorylation. Dans cette étude, Lewis *et al.*, proposent également par homologie un modèle d'hétérodimère NBD1/NBD2.

La même année, Callebaut *et al.*, proposent un modèle d'hétérodimère NBD1/NBD2 humain grâce à une étude d'alignement de séquence avec les protéines BtuD, MsbA, HisP et TAP1 et de reconnaissance de repliements en utilisant les données expérimentales de la protéine MJ0796 (Figure 9) (Callebaut et al., 2004). Cette étude prend aussi en compte les nouvelles données concernant les différences de fonctionnement et de séquence des deux NBDs (Nagel, 1999; Schmitt and Tampe, 2002) et montre l'implication de certains résidus des sites actifs dans l'activation et la possible dimérisation des domaines.



Figure 9 : Modélisation en 3 dimensions de l'hétérodimère NBD1/NBD2 humain Vue de face. *N* représente les extrémités NH₂ de chaque NBD ; *C* représente les extrémités COOH de chaque NBD. L'étoile grise représente l'insertion régulatrice (RI) du NBD1. D'après *Callebaut et al., 2004*

Par la suite, une étude de cristallographie propose un modèle basse résolution de la protéine CFTR entière (Rosenberg et al., 2004). Cependant, il faut attendre 2007 pour que soit proposé la structure complète du transporteur Sav1866 (Dawson and Locher, 2007), ce qui permettra de proposer par homologie des modélisations de la protéine CFTR entière. Deux modèles sont ainsi proposés (Figure 10) (Mornon et al., 2008; Serohijos et al., 2008).

Il s'agit de la protéine en configuration dite « outward-facing » c'est-à-dire en position ouverte avec présence de molécules d'ATP liées sur les sites catalytiques des NBDs. Les deux modèles s'intéressent plus particulièrement aux liaisons entre les DTMs et les NBDs, notamment aux contacts qui se créent entre les boucles intracellulaires et les domaines NBDs et l'implication de la mutation F508del.

Ces deux modèles ne sont pas identiques et présentent notamment une localisation différente de l'extension régulatrice reliant le NBD1 au DTM2 (structure colorée en blanc) et une organisation différente des DTM, avec des distances et des orientations des segments transmembranaires différentes.



Figure 10 : Vues des deux modélisations différentes de la protéine CFTR entière basées sur le modèle de Sav1866.

- A. Modélisation de la protéine entière sans domaine R. *Gauche* : modèle proposé par Mornon *et al., 2009* ; *Droite* : modèle proposé par Serohijos *et al., 2008*.
 - B. Zoom des deux parties encadrées montrant les différences de proximité entre les deux domaines. Exemple des acides aminés K95 et S1141.

Afin de faire la distinction entre les deux modèles proposés pour définir un modèle de plus en plus exact, il est indispensable de confronter ces représentations théoriques à des données expérimentales.

Concernant les acides aminés mis en lumière sur la Figure 10, la lysine K95 et la sérine S1141, il apparaît que sur le modèle de Serohijos ces deux résidus sont trop éloignés pour qu'il y ait une liaison qui se crée entre eux. Or dans une récente étude il est montré par des expériences de « *crosslinking* » que ces deux résidus pouvaient être liés, reflétant une grande proximité des deux acides aminés (Zhou et al., 2010). A ce niveau, il semble donc que le modèle proposé par Mornon *et al.*, soit plus proche de la structure véritable du CFTR.

Récemment, plusieurs structures corrigées de transporteurs MsbA obtenues expérimentalement (Ward et al., 2007) ont été utilisées comme bases d'homologie de séquence et de repliements. Il a été utilisé des structures en absence d'ATP permettant de proposer un modèle de structure sans liaison d'ATP (hétérodimère NBD non formé) donc en configuration canal en position fermée (Mornon et al., 2009).

C. Des différents domaines à la fonction de CFTR

a) Les domaines transmembranaires

La protéine CFTR, comme la plupart des transporteurs ABC, est une structure enchâssée dans la membrane plasmique cellulaire. L'organisation et le rôle des DTM ne sont pas encore complètement élucidés mais de nombreuses études portent sur ces deux aspects. Il apparaît que les DTM forment le pore par lequel les ions transitent et que certains acides aminés présents dans le pore ont une fonction de filtre de sélectivité.

o Structure

La protéine comporte deux domaines transmembranaires chacun formé de 6 segments transmembranaires. Dès le clonage du gène en 1989, les études s'intéressant à la structure de la protéine CFTR ont prédit 12 segments transmembranaires (TM) organisés en hélices α et reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques ou extracellulaires. Les données structurales de basse résolution obtenues expérimentalement (Rosenberg et al., 2004) ainsi que les récentes modélisations ont confirmé la structure secondaire hélicoïdale de ces domaines (représentation des TM Figure 11) (Mornon et al., 2008; Serohijos et al., 2008).

• Formation du pore et perméabilité chlorure

Le pore est supposé être composé d'une région étroite dans laquelle se situe le filtre de sélectivité anionique (Linsdell, 2006). Il posséderait à ses extrémités des vestibules intracellulaires et extracellulaires utilisant une charge fixe positive pour attirer les ions CI (Smith et al., 2001; Linsdell, 2006; Aubin and Linsdell, 2006). Des expériences de mutagénèse dirigée et de SCAM (*substituted cysteine accessibility mutagenesis*) ont permis de mettre en évidence la participation de certains acides aminés dans la formation du pore ou encore leur rôle essentiel dans la perméabilité chlorure, la sélectivité anionique ou les propriétés électrophysiologiques de CFTR.

Parmi les 12 TMs, il est bien démontré que le TM6 joue un rôle dominant dans la formation et le fonctionnement du pore (McCarty, 2000; Smith et al., 2001). Bien que controversé (Mansoura et al., 1998), il est maintenant montré que le TM1 joue un rôle dans la

formation du pore (Ge et al., 2004). Plus récemment il a été suggéré que les TMs 11 et 12 seraient aussi impliqués dans la formation du pore (Fatehi and Linsdell, 2009).

Par analogie de nature entre les segments TM5 et 11, Fatehi et Linsdell proposent également que le pore soit constitué par les hélices α des domaines TM1-TM5-TM6-TM11 et TM12.

Concernant le fonctionnement du pore, quatre acides aminés apparaissent indispensables. L'arginine R334 localisée dans le TM6, participerait au vestibule extérieur et attirerait les anions du milieu extracellulaire vers le pore (Smith et al., 2001). De la même manière, la lysine K95 (TM1), les arginines R303 (TM5) et R352 (TM6) participant au vestibule interne du pore, attireraient les anions du milieu intracellulaire vers le pore (Aubin et al., 2006).

Les récentes études de modélisation ont mis en relief d'autres résidus qui seraient critiques dans la formation du pore et la modulation de la perméabilité chlorure (Mornon et al., 2009). La Figure 11 présente une modélisation de l'organisation des DTM et de l'architecture du pore ainsi que la localisation des résidus impliqués dans la modulation du flux ionique.



Figure 11 : Modélisation de l'organisation des segments transmembranaire.

Représentation configuration canal ouvert (conformation « outward-facing ») Les segments transmembranaires sont représentés par les rubans gris, les résidus critiques pour la formation du pore et la modulation de la perméabilité. A. Vue de côté ; B. Vue de dessus. D'après *Mornon et al.*, 2009

b) Les boucles extracellulaires

Les boucles extracellulaires (ECL pour *Extra Cellular Loops*) sont constituées d'acides aminés de nature hydrophile tels que l'arginine, la sérine ou l'acide glutamique.

La fonction première des ECL est de relier les segments transmembranaires entre eux, il y a donc 6 ECL dans la protéine CFTR : ECL1 à 6. Outre ce rôle physique, les ECL participeraient à la modulation de l'activité du canal et de son adressage.

o Implication des ECL dans la modulation de la perméabilité

Comme vu précédemment, le pore de CFTR est formé par l'association de certains domaines transmembranaires (TM 1-5-6-11-12). Des résidus localisés au sein de ces TM modulent la perméabilité chlorure du canal. Cependant, les ECLs participent aussi à la modulation de l'activité du CFTR.

Une mutation d'ECL1 (R117H) induit une diminution de la conductance unitaire ainsi qu'une réduction de la sensibilité au pH extracellulaire sans toutefois modifier la sélectivité (Sheppard et al., 1993). Ces résultats suggèrent que l'ECL1 participerait à la modulation de la perméabilité au niveau du vestibule externe. Cette hypothèse est confortée par une nouvelle étude qui montre que la mutation des arginines R104 et R117, deux acides aminés chargés positivement et localisés dans le vestibule externe du pore, attireraient les ions Cl⁻ dans le pore (Zhou et al., 2008).

Deux autres études impliquent les ECL dans l'activité du canal, des mutations de résidus situés sur les ECL1, 2 et 4 provoqueraient une déstabilisation de l'état ouvert du canal (Hammerle et al., 2000; Hammerle et al., 2001).

Enfin, des résidus sur l'ECL4 (K892Q et R899Q) ont été montrés comme sites de liaison d'anions extracellulaires (Zhou and Linsdell, 2009), liaison pouvant modifier les propriétés du pore (Ge et al., 2004).

o Implication des ECL dans la maturation du CFTR

La boucle extracellulaire 4 contient les deux uniques sites consensus de Nglycosylation en positions 894 et 900. Les N-glycosylations sur N894 et N900 sont requises pour le passage de la protéine CFTR du réticulum endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi. Elles correspondent au signal de sortie du RE reconnu par les calnexines.

c) Les boucles intracellulaires

Les boucles intracellulaires (ICL pour *Intra Cellular Loops*) reliant les domaines transmembranaires sont au nombre de 4 dans la protéine CFTR : de ICL 1 à 4.

Comme pour les ECL, ces boucles semblent impliquées dans la fonction et l'adressage de la protéine.

• Implication des ICL dans la modulation de l'activité du canal

De nombreuses études font état de l'importance des ICL dans l'activité du canal.

En effet, il a été montré entre autres, que la délétion de 19 résidus (résidus 266 à 284) de l'ICL2 affectait la stabilité de l'état de conductance de CFTR (Xie et al., 1995), puis que la mutation de résidus de l'ICL3 S945 et G970 affectait la rectification du courant chlorure alors que la mutation de H949 augmentait la probabilité d'ouverture du canal (Seibert et al., 1996b), enfin que des mutations de résidus localisés dans l'ICL4 (F1052) altéraient drastiquement la fonction du canal (Cotten et al., 1996).

De plus, il semble que les ICL soient impliquées dans certaines régulations pharmacologiques. En effet, une étude montre que la substitution de la lysine 978 (chargée positivement) par un résidu non chargé altére la sensibilité de la protéine au Glibenclamide, inhibiteur du CFTR par blocage du pore (Melin et al., 2007).

En outre, les récentes études de modélisation du canal montrent de fortes interactions entre les ICL et les domaines NBD (Mornon et al., 2008; Serohijos et al., 2008). Ces boucles intracellulaires lieraient alors les DTM aux NBD, permettant une corrélation entre les mouvements des NBD et les phénomènes d'ouverture/fermeture du pore par déplacements des segments transmembranaires (Mornon et al., 2009). Ces interactions et leurs conséquences seront développées par la suite dans la partie **I. 3. B.**.

• Implication des ICL dans la maturation du CFTR

Les ICL participeraient à l'adressage et à la stabilité de la protéine à la membrane. En effet, une mutation CF N287Y localisée dans l'ICL2 augmente l'endocytose de la protéine, diminuant ainsi le temps présent à la membrane (Silvis et al., 2003). De plus il a été relevé plusieurs mutations de chaque ICL induisant une rétention de la protéine dans le RE : H139R et G149R dans l'ICL1 et R258G dans l'ICL2 (Seibert et al., 1997), S945L et H949Y dans IICL3 (Seibert et al., 1996b) et enfin H1054D ou L1077P dans IICL4 (Seibert et al., 1996a).

d) Les domaines de liaison aux nucléotides

La protéine CFTR comme tous les transporteurs ABC, possède deux domaines de liaison et d'hydrolyse de l'ATP : le NBD1 et NBD2. Comme nous le verrons par la suite cette activité ATPasique est le principal acteur du cycle d'ouverture/fermeture du canal.

• Frontières et séquences consensus

Comme présenté précédemment, les frontières des NBD sont encore discutées. Le NBD1 s'étendrait des résidus 432 à 634 (Chan et al., 2000) et le NBD2 des résidus 1178 à 1446 (www.genet.sickkids.on.ca).

Cependant, d'après la structure cristallographique du NBD1 (Lewis et al., 2004), le domaine comporterait deux régions similaires supplémentaires en extrémité NH-2 (résidus 404-435) et COOH (résidus 639-670). En effet, deux insertions d'une trentaine d'acides aminés spécifiques du CFTR, très flexibles, présentent des résidus sérines dans des séquences consensus phosphorylables par les PKA (S422 et S660). Le rôle de ces deux régions, nommées insertion régulatrice (RI) et extension régulatrice (RE), reste à déterminer.

Au sein des domaines NBD du CFTR comme dans ceux des autres transporteurs ABC, il y a présence de séquences consensus très conservées :

- les motifs Walker A : GxxGxGKS/T (x représentant n'importe quel acide aminé)
- les motifs Walker B : hhhhD (h représentant un acide aminé hydrophobe)
- une boucle Q : un seul acide aminé très conservé chez les ABC.
- la séquence signature ou peptide *linker* LSGGQ/H.

Ces séquences sont résumées Figure 12.

	Walker A	Q loop	Séquence Signature	Walker B
NBD1	⁴⁵⁸ GSTGAGKT ⁴⁶⁵	⁵ ⁴⁹³ Q	⁵⁴⁸ LSGGQ ⁵⁵² .	⁵⁶⁸ LYLLD ⁵⁷²
NBD2	¹²⁴⁴ GRTGSGKS ¹²⁵	5^{51}^{1291} Q	¹³⁴⁶ LSHGH ¹³⁵⁰ .	¹³⁶⁶ ILLLD ¹³⁷⁰

Figure 12 : Alignements des séquences des motifs Walker A , B, Q loop et de la séquence signature des transporteurs ABC de la protéine CFTR

Les positions des résidus sont indiquées en exposant. Alignement réalisé d'après l'alignement de séquence de *Mornon et al.*, 2009

• Structures et fonction des NBD

La structure secondaire des NBD consiste essentiellement en un feuillet β central (60 à 70 % du domaine), entouré par des hélices α (10 % du domaine) (Bianchet et al., 1997).

Concernant la structure tertiaire et surtout l'assemblage des NBD, deux hypothèses ont été longuement discutées : un fonctionnement indépendant en monomères ou un fonctionnement de concert entre les deux NBD avec formation d'un hétérodimère. Il est maintenant accepté que l'action des NBD nécessite leur dimérisation (voir Figure 9). Cette dimérisation se fait selon un modèle d'organisation spatiale «*head-to-tail* » ou tête-bêche, permettant la formation des deux sites de liaison et d'hydrolyse de nucléotides (Figure 13) :

- Site A dit « non canonique » formé par les domaines Walker A et B du NBD1 et la séquence signature du NBD2. Ce site n'aurait pas une activité catalytique aussi efficace que le site B.
- Site B dit « canonique » formé par les domaines Walker A et B du NBD2 et la séquence signature du NBD1. Ce site serait le lieu d'hydrolyse de l'ATP.



Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation « head-to-tail » des NBDs WA & WB: Walker A & B. S.S: Séquence Signature Les sites de liaisons et d'hydrolyse de l'ATP sont entourés par des pointillés.

Le rôle de ces deux sites ATP est de lier et d'hydrolyser les nucléotides et principalement l'ATP. Cette activité ATPasique est le moteur du *gating* du canal. Toutefois, le rôle des deux sites A et B dans le *gating* serait différent et complémentaire, ce point sera abordé dans la partie **I. 3. B.**.

Cependant pour les deux sites, il semble que le Walker A soit impliqué dans la synchronisation de la liaison des groupements β - et γ -phosphates de l'ATP (Higgins and Linton, 2004) alors que le Walker B serait plus impliqué dans la coordination de la fixation des ions Mg²⁺, cofacteur de l'hydrolyse de l'ATP (Payen et al., 2003).

e) Le domaine régulateur R

Le domaine régulateur est la particularité de CFTR au sein des transporteurs ABC. C'est le seul membre à posséder ce domaine accessoire globulaire.

o Structure

Le domaine R était à l'origine borné par les résidus 588 et 855 (Riordan et al., 1989). Cependant, bien que les frontières précises de ce domaine restent encore incertaines, les études récentes mentionnent un domaine allant des résidus 634 à 835 (Chan et al., 2000; Csanady et al., 2000).

Ce domaine est en fait composé de 2 sous-domaines RD1 et RD2.

Le RD1, allant des résidus 634 à 672 a une séquence très conservée dans les différentes espèces. Ce domaine serait impliquée dans la maturation de la protéine ainsi que dans l'ouverture du canal en modulant des interactions dynamiques entre le domaine NBD1 et les sites de phosphorylation du domaine R (Pasyk et al., 1998). Au vu des dernières structures cristallographiques (Lewis et al., 2004), ce domaine correspondrait à l'extension régulatrice du NBD1.

Le RD2, allant des résidus 672 à 835, correspondrait à une séquence très variable entre les espèces. Les résidus phosphorylables sont compris dans cette portion du domaine lui conférant un rôle important dans le fonctionnement du canal CFTR.

Le CFTR étant le seul membre de la famille ABC à posséder ce domaine R, il apparaît difficile de le modéliser en 3 dimensions puisqu'aucune structure connue n'existe empêchant la modélisation par homologie. De plus une étude essayant d'élucider les aspects structuraux du domaine a conclus que le domaine R n'avait pas de repliement précis mais possédait une structure « lâche » lui permettant ainsi d'interagir avec de multiples résidus d'autres domaines de la protéine (Ostedgaard et al., 2000).

• Sites de phosphorylation

La caractéristique principale du domaine R est de posséder de nombreux sites consensus potentiellement phosphorylables par des protéines kinases A. Il y a 9 séquences dibasiques de type R-R/K-X-S/T, le dernier résidu sérine ou thréonine étant phosphorylable, et 5 séquences monobasiques de type R/K-X-S/T (Riordan et al., 1989; Seibert et al., 1999). Ces résidus sont localisés tout le long du domaine RD2 (Figure 14)

Pour les séquences dibasiques les résidus sont en position : S660, S686, S700, S712, S737, S768, T788, S795 et S813.

Pour les séquences monobasiques les résidus sont en position : S670, S690, S753, T787 et S790.



Figure 14 : Localisation des sites de phosphorylation par les PKA Localisation des 15 sites de phosphorylation présent sur le NBD1 et le domaine R. • : sites dibasiques ; □ & ∆ : sites monobasiques. D'après Seibert et al., 1999

o Rôle alternatif du domaine R

Le rôle principal du domaine R est de moduler l'activation du canal (les mécanismes seront développés dans la partie I. 3. A.). Cependant le domaine R semble avoir un rôle alternatif : réguler l'adressage de la protéine. En effet, il semble qu'une région, appelée NEG2, localisée à l'extrémité C-terminale du domaine R permettrait la stabilisation de CFTR au sein d'un compartiment intracellulaire à partir duquel il serait envoyé à la membrane plasmique en réponse à une stimulation AMPc dépendante (Lewarchik et al., 2008).

f) Les extrémités de la protéine

Comme nous l'avons vu précédemment, les extrémités N et C terminales du CFTR sont cytoplasmiques (Tusnady et al., 1997; Akabas et al., 1997).

o <u>Extrémité NH₂-terminale</u>

D'après les modèles proposés, cette extrémité s'étendrait des résidus 1 à 80. Ce domaine de la protéine jouerait un rôle dans l'adressage et la fonction de CFTR.

En effet la délétion de l'ensemble de l'extrémité N-terminale ou de certains domaines de celle-ci empêche la maturation correcte de la protéine (Prince et al., 1999).

De plus, CFTR serait physiquement lié à des composants SNARE (Soluble Nethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor) dont la syntaxine 1a qui se lierait spécifiquement et directement à l'extrémité N-terminale de la protéine (Naren et al., 1997). L'expression de syntaxine 1a induit une diminution de l'activité du CFTR lorsque les deux protéines sont exprimées dans des ovocytes de Xénope (Naren et al., 1998). Cependant, la syntaxine 1a étant associée à l'adressage de protéines telles que CFTR ou ENaC cette diminution d'activité pouvait être expliquée en partie par un défaut d'adressage (Peters et al., 1999).

Ensuite, concernant ce domaine et l'activité de CFTR, une étude a montré que l'extrémité N-terminale de la protéine influençait le *gating* du canal en contrôlant la phosphorylation PKA dépendante du domaine régulateur R (Naren et al., 1999). De plus il y aurait présence d'un groupe d'acides aminés chargés négativement sur la queue N-terminale qui modulerait l'état d'ouverture du canal par interaction avec l'activité ATPase d'un des deux NBDs (Fu et al., 2001).

• Extrémité COOH-terminale

D'après les derniers modèles la queue C-terminale du CFTR s'étendrait des résidus 1380 à 1480. Tout comme l'extrémité C-terminale, elle semble jouer un rôle dans l'adressage et l'activité de la protéine CFTR mais en plus elle permettrait l'accrochage de protéines partenaires.

Certains travaux ont montré que le domaine C-terminal n'était pas absolument essentiel pour la biogénèse et la maturation du CFTR mais modulerait fortement ces dernières ainsi que le temps passé à la membrane (Gentzsch and Riordan, 2001). En effet par des expériences de délétions de portions C-terminales il a été mis en évidence trois régions régulatrices : deux régions modulant la stabilité de la protéine mature (aa 1413 à 1416) ou naissante (aa 1400 à 1404) lors de l'adressage et une région modulant la stabilité de la protéine à la membrane (1390 à 1394).

De plus cette extrémité contient un domaine de liaison PDZ permettant une interaction avec des protéines PDZ jouant un rôle important dans la fonction, la localisation et l'expression de la protéine (Guggino, 2004).

Une interaction de la queue C-terminale avec au moins quatre protéines à domaine PDZ a été mise en évidence (Cheng et al., 2010). L'interaction la plus caractérisée est l'interaction CFTR-NHERF-1. La protéine NHERF-1 (*Na/H exchange regulatory factor-1*) permet l'ancrage de CFTR au cytosquelette d'actine via un domaine ERM (erzin, radixin merlin) (Short et al., 1998), joue un rôle dans l'échafaudage liant CFTR à des protéines partenaire comme ROMK (Yoo et al., 2004), joue un rôle dans la polarisation de la protéine au sein des cellules épithéliales (Moyer et al., 1999) ou encore influence le *gating* et la probabilité d'ouverture du canal (Raghuram et al., 2001).

CFTR se lie aussi à une protéine appelée CAL (*CFTR associated Ligand*) grâce à son domaine PDZ. Cette liaison de CAL constitue un signal de rétention de CFTR dans le cytoplasme et promeut la dégradation de CFTR (Cheng et al., 2002; Cheng et al., 2004). Pour conforter cette hypothèse il a été montré que la suppression de cette interaction par une approche de siRNA augmentait la présence de protéines CFTR-F508del à la membrane (Wolde et al., 2007).

3. Régulation de l'activité du canal CFTR

L'activité du canal CFTR est physiologiquement régulée par l'action combinée de protéines kinases (PK) et l'interaction de molécules d'ATP sur les domaines NBD.

Cette partie détaillera dans un premier temps les phénomènes de phosphorylation ayant lieu principalement au niveau du domaine R. Puis les effets de la liaison et de l'hydrolyse des nucléotides sur les NBD seront abordés.

A. Les processus de phosphorylation

a) Implication des protéines kinases

Comme nous l'avons vu précédemment la séquence en acides aminés de CFTR a permis d'identifier une quinzaine de sites de phosphorylation, principalement au niveau du domaine R (voir Figure 14) (Riordan et al., 1989). Comme il sera montré, ces sites peuvent être phosphorylés par des protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA) ou de l'activation de la phospholipase C (PKC).

Il y a en fait un équilibre phosphorylation/déphosphorylation au niveau de ces sites qui permet une modulation dynamique selon les conditions cellulaires modifiant les taux d'AMPc ou de calcium intracellulaires dépendant des taux d'inositol trisphosphate (IP3) intracellulaire (Cheng et al., 1991; Seibert et al., 1999; Gadsby and Nairn, 1999).

• Implication de la PKA

Avant même l'identification de la protéine CFTR dans la pathologie CF, des études électrophysiologiques sur des cellules épithéliales CF et non-CF montraient une différence de conductance PKA dépendante. Cette conductance était enregistrée dans les tissus sains mais absentes des tissus CF (Schoumacher et al., 1987; Hwang et al., 1989).

Par la suite, l'identification de CFTR et des sites consensus de phosphorylation ont suggéré une régulation de la protéine par la phosphorylation. Afin d'en comprendre le rôle exact, il a été réalisé des études de fonctionnalité avec substitutions des résidus sérine en alanine au sein des séquences consensus (mutants SA). Ainsi une première étude concernant quatre sérines (S660, S737, S795 et S813), montre que la mutation d'un de ces quatre résidus ou encore de trois résidus sur quatre ne modifie pas l'activité du canal. En revanche cette étude montre que la mutation simultanée des quatre sérines (mutant 4SA) abolit complètement la réponse à la PKA (Cheng et al., 1991).

Cependant, il est montré par la suite que ce mutant 4SA pouvait être activé par les PKA mais avec une plus faible amplitude de réponse (Chang et al., 1993). De plus, cette étude montre que la mutation de 10 résidus (sérine ou thréonine) des sites de phosphorylation (mutant 10SA) n'empêche pas l'activation PKA dépendante du CFTR mais la réduit fortement avec notamment une probabilité d'ouverture diminuée.

Finalement Seibert *et al.*, découvrent des sites cryptiques de phosphorylation pouvant expliquer l'activité PKA dépendante du mutant 10SA (Seibert et al., 1995). La mutation des 15 sites de phosphorylation (mutant 15SA) entraînant l'abolition de la réponse PKA dépendante malgré la détection d'un état faiblement phosphorylé (Seibert et al., 1999).

• Implication de la PKC

Bien que la voie de l'AMPc/PKA soit considérée comme la principale voie dans la régulation de CFTR, la participation d'autres kinases est maintenant vérifiée (Tabcharani et al., 1991; Jia et al., 1997).

La PKC possède plusieurs sites consensus de phosphorylation dont certains résidus sont les mêmes que pour la PKA (Picciotto et al., 1992; Jia et al., 1997; Chappe et al., 2003).

L'application de PKC permet à elle seule d'activer des canaux CFTR (Tabcharani et al., 1991; Chang et al., 1993). Cette régulation serait directe puisque la mutation des 9 résidus phosphorylable par la PKC abolit cette activation du CFTR (Chappe et al., 2003).

De plus un effet de modulation de l'activité des PKA par la PKC est depuis longtemps décrit (Tabcharani et al., 1991; Jia et al., 1997; Chappe et al., 2003). En effet, ces études montrent que la réponse PKA dépendante du CFTR est largement augmentée après un traitement à la PKC.

Un troisième effet des PKC a été décrit. Deux séquences consensus de phosphorylation par la PKC seraient associées à un effet inhibiteur. La mutation des résidus de ces deux sites conduit à augmenter l'activation du canal par les PKC (Chappe et al., 2004).

Cependant, lorsque la voie de perméabilité chlorure n'est pas requise pour la sécrétion ou la réabsorption des sels, des phosphatases maintiennent le CFTR dans un état

déphosphorylé et inactif (Becq et al., 1994). Il y a donc une action de concert entre les protéines kinases et les phosphatases.

b) Conséquences structurales de la phosphorylation

L'importance de la phosphorylation dans l'activation du canal n'est plus à démontrer mais les conséquences de la phosphorylation sur le canal sont encore à élucider.

Alors que le domaine R s'est vu attribuer une fonction de « bouchon » qui empêche les ions de transiter à travers le pore lorsqu'il n'est pas phosphorylé (Rich et al., 1993; Ma et al., 1996), il apparaît que la fonction de ce domaine est plus complexe. En effet, l'état de phosphorylation du domaine R ainsi que des sites consensus phosphorylables localisés sur le NBD1, contrôleraient les interactions de l'ATP avec les NBD (Winter and Welsh, 1997), hypothèse confortée par l'étude d'Ostedgaard *et al.* qui montre que le degrés de phosphorylation du domaine R détermine la probabilité d'ouverture du canal (Ostedgaard et al., 2001).

Par la technique de dichroïsme circulaire d'un domaine R purifié il est démontré que la phosphorylation du domaine R change sa conformation spatiale (Dulhanty and Riordan, 1994). De plus la phosphorylation du domaine R par les PKA favorise son association aux autres domaines (Chappe et al., 2005), effet potentialisé par la phosphorylation du domaine par les PKC (Seavilleklein et al., 2008).

Le domaine R favoriserait donc la fixation des nucléotides sur les NBD par changement conformationnel suite à sa phosphorylation.

B. Fixation et hydrolyse de l'ATP : rôle dans les processus d'ouverture/fermeture du canal.

a) Cycle de l'ATP

Comme il a déjà été évoqué, le *gating* du canal dépend de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP au niveau des domaines NBD. Ces phénomènes de régulation par l'ATP ont fait l'objet d'une attention particulière depuis le début des recherches sur la compréhension du fonctionnement du canal.

En absence d'informations cristallographiques et parce que des mutations présentant un *gating* défectueux (comme G551D) sont localisées dans les motifs de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, le NBD1 est pendant longtemps suspecté d'être responsable de l'ouverture du canal. La réaction catalytique similaire sur le NBD2 est alors suspectée d'être responsable de la fermeture du canal (Anderson et al., 1991a; Carson et al., 1995; Gadsby et al., 1999). Cependant ces phénomènes ne sont pas clairs et largement discutés.

Grâce aux données structurales (cristallographie et modélisation), il apparaît que la première étape du *gating* est la dimérisation des NBD. Cette interaction entre les deux NBD serait sous la dépendance de la fixation d'ATP qui solidifierait l'interaction NBD1/NBD2 (Jones and George, 2002; Callebaut et al., 2004; Vergani et al., 2005b). En effet les sites de liaison ATP sont situés à l'interface NBD1/NBD2 et des études de domaine NBD procaryotes ont mis en évidence l'importance de l'ATP et en particulier de son γ -phosphate dans la stabilisation du dimère NBD (Hopfner et al., 2000). Il est alors proposé le modèle de cycle suivant : liaison d'ATP \rightarrow dimérisation forte des NBD \rightarrow hydrolyse de l'ATP/perte du γ -phosphate \rightarrow dissociation du dimère.

Or les deux sites de liaison (voir Figure 13) ne sont pas parfaitement identiques puisque dans le site A, il est retrouvé la séquence signature du NBD2 qui est dite dégénérée en comparaison à la séquence signature du NBD1 ou à celles des autres transporteurs ABC et du NBD1. Cette différence de composition induirait une interaction plus forte avec l'ATP mais une hydrolyse moins efficace (Aleksandrov et al., 2001; Basso et al., 2003).

Une récente étude montre d'ailleurs que l'ATP reste fixé longtemps (une dizaine de seconde) sur le site A alors qu'il est rapidement hydrolysé sur le site B (Tsai et al., 2010). Les auteurs émettent l'hypothèse d'un état partiellement dimérisé des NBD suite à l'hydrolyse sur le site B. Le canal adopterait cet état transitoire permettant un autre cycle liaison/hydrolyse sur le site B. Or il semblerait que l'activité catalytique du site B initie l'ouverture du canal (Zhou et al., 2006), donc la forte fixation de l'ATP sur le site A permettrait plusieurs cycles d'ouverture/fermeture du canal.

55

b) Conséquences structurales de la fixation et de l'hydrolyse de l'ATP.

Suite à la fixation de l'ATP sur les sites A et B, les NBD se dimérisent, induisant un grand changement structural. En effet, comme il est illustré sur la Figure 15, il y a une translation des deux domaines lors de la dimérisation.

Or il y aurait à l'interface de l'hétérodimère une « rainure » d'acides aminés aromatiques (parmi lesquels F508) réalisant des contacts critiques avec les boucles intracellulaires ICL2 (DTM1) et ICL4 (DTM2) tandis que l'ICL1 (DTM1) et l'ICL3 (DTM2) interagiraient avec les sites de liaisons de l'ATP sur les NBD (Mornon et al., 2008; Serohijos et al., 2008). Les ICL sont représentées en bleu pour les ICL1&2 et en rouge pour les ICL3&4 sur la Figure 15. D'après le modèle 3D, ces contacts sont maintenus mais le déplacement des NBD entraîne une translation de ces boucles.

Ces déplacements permettraient la transmission de l'information des domaines catalytiques aux domaines transmembranaires.



Figure 15 : Modélisation de l'hétérodimèreNBD1/NBD2

Représentation vue du haut lors du passage de la conformation *inward-facing* canal fermé (gauche) à la conformation *outward-facing* canal ouvert (droite). RI : *Regulatory Insertion*. D'après *Mornon et al., 2009*

c. Résumé de la régulation de l'activité du canal



La Figure 16 résume les différents événements régulant l'activité du canal CFTR :

Figure 16 : Représentation de la régulation ATP-dépendante du canal CFTR 1 représente le NBD1, 2 le NBD2 ; C0, C1 et C2 représente 3 états fermés du canal, O1 et O2 représentent les 2 états d'ouverture du canal. Pi : phosphate inorganique. D'après (Vergani et al., 2005a)

Bilan

1. Phosphorylation du domaine R \rightarrow changement conformationnel favorable aux interactions NBD/ATP.

2. Fixation d'ATP sur les NBD \rightarrow dimérisation des NBD \rightarrow changement conformationnel des segments transmembranaires \rightarrow ouverture du canal. État ouvert O1

3. Hydrolyse de l'ATP du site B. État ouvert O2

4. Perte du groupement γ phosphate de l'ATP hydrolysé \rightarrow dissociation partielle des NBD \rightarrow changement conformationnel des segments transmembranaires \rightarrow fermeture du canal. État fermé C1

5. Dissociation de l'ADP du site B et hydrolyse de l'ATP du site A \rightarrow dissociation complète des NBD. État fermé C0

Ou

5'. Nouvelle fixation d'ATP sur le site B \rightarrow ouverture du canal. État ouvert O1

C. Régulation pharmacologique

La recherche pharmacologique dans le domaine a pour objectif de permettre la stimulation des canaux CFTR mutés. Cette recherche tend à découvrir des molécules qui pourraient être utilisées en thérapeutique mais aussi en recherche fondamentale afin de produire des connaissances sur le mécanisme d'action des drogues et sur la structure de la protéine CFTR.

a) Inhibiteurs de CFTR

o Au niveau du pore

On retrouve principalement des inhibiteurs anioniques qui bloquent le pore de CFTR par la face interne du canal. Il s'agit de molécules dites bloqueurs de canaux ouverts et leur action est directement liée à la structure du pore de CFTR. Ces molécules vont être attirées vers le pore mais seront trop volumineuse pour le traverser et encombreront donc ce dernier. L'utilisation de ces drogues et surtout la recherche des mécanismes d'action de ces dremes a permis de faire émerger des connaissances sur le fonctionnement de la protéine.

Par exemple le blocage de CFTR par le DPC (acide diphénylamide-2carboxilique) et le FFA (acide flufénamique) est dépendant de l'ouverture du canal. Cette propriété suggère que les molécules se logent dans le pore en position ouverte et bloquent le passage des ions (McCarty et al., 1993). Cette inhibition est levée par l'introduction de la mutation S341A montrant l'implication du résidu sérine dans l'attraction du DPC mais également du chlorure (McDonough et al., 1994).

Plus récemment il a été mis en évidence un nouveau bloqueur de canaux ouverts, le $GlyH_{101}$ (N-(2-naphthalenyl)-[(3,5-dibromo-2,4-dihydroxyphenyl)methylène] glycine hydrazide). Ce bloqueur de canaux ouverts, contrairement aux autres est soluble dans l'eau et actif à faible concentration (Muanprasat et al., 2004). Son site d'action est encore inconnu.

• Au niveau du domaine R

Comme il a été vu précédemment, le *gating* du CFTR est modulé par une balance phosphorylation/déphosphorylation principalement au niveau de son domaine R. *In vivo*, ce domaine est phosphorylé par les protéines kinases PKA et PKC. *In vitro*, il est possible

d'inhiber ces PK et ainsi inhiber CFTR. Il peut donc être utilisé des molécules telles que l'H89 un inhibiteur de la PKA ou le chlorure de chélérythrine, inhibiteur de PKC, afin d'inhiber l'activité du canal.

o Au niveau des NBD

L'activité des NBD est essentielle pour l'activation du canal CFTR. Empêcher la liaison des nucléotides ou l'activité catalytique des NBD conduit à l'inhibition du canal.

La Génistéine (Gst) et la Phloxine B sont deux inhibiteurs allostériques du CFTR dans le sens où ces molécules activent la fonction de la protéine à faible dose mais l'inhibent à forte concentration (Wang et al., 1998; Bachmann et al., 2000). De plus il a été montré un effet direct par fixation des deux agents pharmacologiques sur les NBD (Bulteau-Pignoux et al., 2002; Cai and Sheppard, 2002). Le site d'action inhibiteur de ces molécules serait la glycine G551, résidu de la séquence signature du NBD1 participant au site B catalytique (site conventionnel). L'interaction des molécules avec ce résidu pourrait favoriser la dissociation de l'hétérodimère NBD1/NBD2 fermant ainsi le canal (Melin et al., 2005).

o Autres

De nouvelles molécules émergent avec de plus faibles concentrations efficaces et une solubilité dans des solvants moins toxiques que le DMSO, ce qui en fait de bons candidats pour l'expérimentation *in vivo*. C'est le cas des adduits α -Aminoazaheterocycle-Methylglyoxal qui présentent une EC₅₀ de l'ordre du picomolaire et une grande solubilité dans l'eau (Routaboul et al., 2007). De plus ces inhibiteurs présentent une grande affinité pour CFTR, augmentant ainsi leur spécificité. Le mécanisme d'action de ces adduits reste à être découvert.

Dans cette étude nous avons utilisé un inhibiteur différent de ceux déjà évoqués : l'inhibiteur thiazolidinone CFTR_{inh}-172 (Ma et al., 2002). Cette molécule joue sur la cinétique du canal impliquant que son effet passerait par une stabilisation de son état fermé (Caci et al., 2008). De plus la mutation du résidu R347 (TM6) induit une absence d'effet de l'inhibiteur, suggérant une interaction directe avec le CFTR.

Pour le moment le site d'action du $CFTR_{inh}$ -172 n'a pas été identifié, des études sont en cours pour savoir s'il se lie à des résidus localisés dans les DTM ou sur les NBD.

b) Activateurs de CFTR

o Au niveau du domaine R

Comme la phosphorylation du domaine R est nécessaire à l'activation du canal, des molécules conduisant à l'activation des voies métaboliques impliquant les PK vont entraîner l'activation de la conductance CFTR.

La voie physiologique d'activation *in vivo* de la conductance CFTR est sous la dépendance de l'AMPc. Les voies principales conduisant à l'augmentation d'AMPc sont la stimulation des récepteurs bêta adrénergiques ou encore la voie de l'adénylate cyclase (AC). L'AC est une enzyme membranaire catalysant la conversion de l'ATP en AMPc. L'activation de l'AC va donc entraîner une élévation des taux intracellulaires d'AMPc ayant pour conséquence l'activation des PKA qui vont alors phosphoryler le canal CFTR.

Une molécule très utilisée pour activer la fonction de CFTR *in vitro* est un activateur de l'AC, la forskoline (Fsk), molécule extraite de la plante *Coleus forskohlii*. C'est un activateur classique de CFTR-wt à des concentrations de 5 à 10μ M. A faible dose (1μ M), la Fsk permet l'action de drogues telles que la Gst sur des mutants de classe III (G551D, G1349D).

D'autres agents peuvent être utilisés comme la sous-unité catalytique de la PKA ou des formes d'AMPc synthétiques non hydrolysables par les phosphodiestérases (PDE) cellulaires comme le cpt-AMP.

De plus les PDE qui dégradent les nucléotides cycliques empêchent la phosphorylation PKA dépendante et donc diminuent l'activité du canal. Une inhibition de certaines PDE comme la PDE5 par le sildénafil, peut éviter la déphosphorylation du domaine R et donc la désactivation du canal CFTR (Cobb et al., 2003).

De la même manière, inhiber les phosphatases (PP) permet de maintenir l'activation du CFTR (Becq et al., 1994). L'utilisation de l'acide okadaïque et de la calyculine A permet d'inhiber la PP de type 2A, empêchant la désactivation du canal (Luo et al., 1998).

60

o Au niveau des NBD

Les principaux acteurs de l'activation du CFTR sont les nucléotides qui se fixent aux NBD puis y sont hydrolysés. Les nucléotides synthétiques (analogue hydrolysables ou non d'ATP et de GTP) modulent donc l'activité du canal. Cependant d'autres molécules sont connues pour avoir une action directe sur les NBD. C'est le cas des flavonoïdes et des xanthines.

Parmi les flavonoïdes, la génistéine, à faible concentration, prolonge les temps d'ouverture du CFTR (Wang et al., 1998). Le site de fixation activateur de cette molécule semble être situé au niveau de la glycine G1349 (Melin et al., 2005), résidu localisé au sein de la séquence signature du NBD2 participant au site A non catalytique des NBD. La fixation de la Gst favoriserait donc la formation de l'hétérodimère NBD1/NBD2.

Des dérivés de flavonnes, les benzoflavonnes, sont décrits comme activateurs puissants de CFTR. C'est le cas de l'UCcf-339 qui se fixerait sur les NBD mais dont les déterminants moléculaires n'ont pas encore été identifiés (Springsteel et al., 2003).

Parmi les xanthines, de nombreuses molécules ont montré un effet activateur sur le CFTR : l'IBMX (Drumm et al., 1991), le CPX (Eidelman et al., 1992), le X-33 (Bulteau et al., 2000) ou encore la théophylline (Chappe et al., 1998). Parmi ces molécules, certaines se fixeraient au NBD1 du CFTR mais les résidus impliqués ne sont pas encore connus.

• Autres

De nouvelles molécules activatrices aux propriétés différentes émergent de la recherche combinée entre chimistes et biologistes. Pour le moment les mécanismes d'action de ces molécules sont encore recherchés.

On peut citer les dérivés pyrrolo[2,3-b]pyrazines, activateur de haute affinité, capable d'activer les protéines CFTR-wt mais aussi les mutants -G551D et -F508del (Noel et al., 2006). D'autres molécules apparaissent non pas comme activateur mais comme potentiateur de la fonction de CFTR. C'est le cas du VX-770 qui est entré en phase II de test clinique et qui permet de potentialiser l'activation des canaux CFTR-wt, -G551D et -F508del (Van Goor et al., 2009).

Récemment il a été mis en évidence un nouveau dérivé d'adduit α -Aminoazaheterocycle-Methylglyoxal, n'ayant pas d'activité inhibitrice comme les autres membres de la famille mais bien un effet activateur de CFTR-wt et F508del (Bertrand et al., 2010). Pour finir, une nouvelle classe d'activateur a émergé depuis quelques années, les sels de benzoquinolizinium (composés MPB) (Becq et al., 1999). Ces composés sont des composés à double activité puisqu'ils activent CFTR mais sont également capable de corriger l'adressage de mutants de classe II tels que CFTR-F508del.

Le point de départ de ce travail ayant été la recherche du site d'action des MPB, les différentes études réalisées avec ces composés seront détaillées dans la partie III.

II. Contexte physiopathologique : la mucoviscidose

La mucoviscidose, appelée aussi fibrose kystique (cystic fibrosis en anglais), est une pathologie létale rare d'origine génétique. Il s'agit de la maladie génétique mortelle la plus répandue dans les populations de type « europoïde » c'est-à-dire les populations Européennes et Nord-Américaines dites « caucasiennes ». Cette maladie affecte en moyenne une naissance sur trois mille et il est recensé en France environ six mille patients et deux millions de porteurs sains (1 personne sur 25 est porteuse du gène défectueux). C'est une maladie à transmission autosomale récessive.

Cette seconde partie du manuscrit propose un bref historique des avancées majeures dans le domaine de la pathologie. Il y est également décrit le gène et la biogénèse de la protéine CFTR ainsi que les classes de mutations proposées à ce jour. Pour finir l'aspect physiopathologique (atteintes et traitements) est abordé.

1. Historique

Les premières observations de cette maladie remontent au moyen âge où il a été retrouvé dans la littérature du XVII^{ème} siècle des récits d'enfants dont la peau laissait un goût salé lorsqu'ils étaient embrassés. Ces enfants étaient considérés comme ensorcelés et ce « baiser salé » prédisait leur mort précoce et imminente. De nos jours, le dosage de sels (NaCl) dans la sueur est utilisé comme l'un des principaux tests diagnostiques de la maladie.

C'est en 1936, dans une thèse allemande présidée par le professeur Guido Fanconi que la première description scientifique de la maladie est faite. Il décrit la pathologie comme une fibrose kystique liée à des bronchiectasies (dilatation anormale des bronches) (Fanconi et al., 1936).

En 1938 le docteur Dorothy Andersen décrit de façon détaillée les caractéristiques de la pathologie et montre une anatomie anormale du pancréas ce qui la conduit à utiliser le terme de fibrose kystique du pancréas (Andersen, 1938).

Le terme mucoviscidose, créé à partir des termes « mucus » et « visqueux », est utilisé pour la première fois en 1943 par le docteur Sydney Farber, qui souhaite corriger la dénomination employée par Dorothy Andersen, centrée sur le pancréas. En effet, Farber affirme que la fibrose kystique n'atteint pas uniquement le pancréas mais se manifeste par une diffusion généralisée de mucus visqueux provoquant un désordre généralisé affectant de multiples organes (Farber, 1943).

C'est en 1946 suite aux travaux d'Andersen et Hodges que le caractère héréditaire et le mode de transmission récessif de la maladie sont suggérés (Andersen and Hodges, 1946).

L'une des grandes avancées dans la compréhension de la maladie est consécutive à une vague de chaleur en 1948 à New York. Lors de cet épisode, de jeunes patients souffrant de graves problèmes hydriques sont admis à l'hôpital Columbia. Parmi ces enfants cinq sont atteints de mucoviscidose. Le docteur Paul di Sant'Agnese pédiatre de cet hôpital décèle alors chez ces patients des anomalies électrolytiques dans leur sueur, avec une forte augmentation de sodium et de chlorure (di Sant'Agnese et al., 1953). Les observations de Paul di Sant'Agnese lui ont permis d'émettre l'hypothèse d'un lien entre mucoviscidose et dérèglement des glandes sudoripares, ce qui lui a permis de mettre au point le test de la sueur et de le proposer comme un diagnostic spécifique de la maladie.

Le lien physiopathologique entre l'anomalie de sécrétion de mucus (entraînant obstruction glandulaire et anomalies histologiques) et l'anomalie de la sueur (sécrétion riche en sels sans anomalie histologique) commence à apparaître au début des années 1980. En 1981 tout d'abord où Mickael Knowles et al découvrent que le potentiel électrique au niveau de la muqueuse nasale des patients mucoviscidosiques étaient plus électronégatifs que chez les sujets sains (Knowles et al., 1981). Ils émettent l'hypothèse que cette différence est due à une réabsorption massive de sodium entraînant une déshydratation de la surface des épithéliums. C'est en 1983 que Paul Quinton met en évidence que l'origine des anomalies électrolytiques rencontrées chez les patients est due à un défaut de transport chlorure (Quinton, 1983).

Grâce aux évolutions technologiques, et à la génétique moléculaire notamment, en 1989, trois équipes identifient le gène muté à l'origine de la maladie : le gène *CFTR* codant pour la protéine CFTR (Kerem et al., 1989; Riordan et al., 1989; Rommens et al., 1989).

2. Du gène à la protéine

A. Le gène CFTR

Le gène *CFTR* est localisé sur le locus 7q31.2, soit dans la région q31.2 du bras long du chromosome 7 (Figure 17). Il est constitué d'environ 250 kilobases (kb) réparties en 27 exons.

Ce gène est transcrit en un ARN messager de 6129 paires de bases, lui-même traduit en une glycoprotéine de 1480 acides aminés (environ 170 kD) : le canal chlorure CFTR.





Le locus du gène est représenté sur le chromosome 7 (schéma gauche). Les 27 exons du gène sont représentés en détail sur le schéma du milieu alors que les domaines de la protéine issus de la traduction/transcription du gène sont indiqués sur le schéma de droite.

TM : *TransMembranaire domain*, domaine transmembranaire ; NBD1 : *Nucleotide Binding Domain*, domaine de liaison aux nucléotides ; R : *Regulatory domain*, domaine régulateur. Chromosome 7 modifié d'après *NCBI map viewer* ; Gène et protéine CFTR modifiés d'après *Lap-Chee Tsui, www.science.ca*

B. Biosynthèse et maturation de la protéine CFTR

La protéine est très peu synthétisée dans les cellules épithéliales (moins de 1000 copies par cellule).

La biogénèse du CFTR (Figure 18) commence, par la traduction via les ribosomes, de l'ARN messager en une chaîne protéique. Cette chaîne est ensuite transloquée dans le Réticulum Endoplasmique (RE) par intégration des domaines transmembranaires de la protéine dans la membrane du RE. Une fois dans le RE, la protéine naissante est prise en charge par des protéines chaperonnes qui l'accompagnent lors des processus de maturation. Ces interactions réduisent les risques d'appariement entre des sous unités déficientes et/ou mal formées et favorisent donc la formation des protéines fonctionnelles, on parle de système de contrôle qualité du RE (ou ERQC). Dans ce compartiment cellulaire, la protéine néosynthétisée subit des modifications post-traductionnelles, en particulier des glycosylations, responsables d'une partie de sa maturation. Une fois la synthèse terminée, si la protéine est correctement repliée et maturée, elle quitte le RE vers l'appareil de Golgi où elle subit de nouvelles modifications (glycosylations).

Suite à ces dernières modifications la protéine mature transite vers la membrane apicale via un système vésiculaire. Une fois présente à la membrane apicale, le CFTR, dont la demi-vie est de 24h, est rapidement internalisé vers un endosome sous-membranaire afin d'être recyclée ou dégradée par les lysosomes en fonction des besoins cellulaires (Bertrand and Frizzell, 2003).

Durant sa maturation, la protéine CFTR acquiert différentes formes glycosylées répertoriées sous le nom de forme A, forme B et forme C (Cheng et al., 1990; Lukacs et al., 1994; Ko and Pedersen, 2001; Bertrand et al., 2003).

La forme A correspond à la forme non glycosylée, lorsque la protéine CFTR vient juste d'être synthétisée. Son poids moléculaire est de 130 kDa.

La forme B est obtenue par glycosylation du précurseur au niveau des asparagines N894 et N900. Son poids moléculaire est de 150 kDa et cette glycosylation rend la protéine sensible aux endoglucosidases H (EndoH). A ce niveau de maturation, seulement 20 % des protéines vont être correctement glycosylées et continuer la voie de maturation. Les 80 % restants seront reconnus par le système ERAD (ER associated Degradation) et dégradés par le système ubiquitine/protéasome.

66

La protéine partiellement glycosylée (forme B) quitte le RE vers l'appareil de golgi. C'est au sein de ce compartiment que la protéine acquiert sa forme pleinement glycosylée, la forme C mature de 170 kDa résistante aux EndoH. C'est cette forme C que l'on retrouve à la membrane apicale des cellules épithéliales.



Figure 18 : Schéma récapitulatif du chemin parcouru par la protéine CFTR de sa biogénèse <u>à sa dégradation</u>

- 1 : Traduction en chaîne protéique repliement co-traductionnel
- 2 : Repliement post-traductionnel transport vers l'appareil de Golgi
- 3 : Dégradation des protéines mal repliées par la voie ubiquitine/protéasome
- 4 : Transport vésiculaire de l'appareil de Golgi vers la membrane apicale
- 5 : Endocytose
- 6 : Recyclage
- 7 : Dégradation lysosomiale

Forme A, forme B et forme C sont les trois formes de maturation de la protéine Modifiée d'après *Bertrand et Frizzel* ; 2003

C. Classes de mutations

Comme vu précédemment, la mucoviscidose est provoquée par la mutation du gène *CFTR*. A la fin de l'année 2009 il a été recensé 1722 mutations différentes du gène *CFTR* (http://www.genet.sickkids.on.ca). Il s'agit pour la plupart des cas de mutations ponctuelles ne concernant que quelques nucléotides. On retrouve tous les types de mutations : délétion d'un nucléotide ou d'un codon entier, insertion d'un ou plusieurs nucléotides, substitution d'un ou plusieurs nucléotides. Les conséquences sur la protéine peuvent donc être aussi multiples et variées : absence ou blocage de la synthèse de la protéine, perte ou modification d'un acide aminé induisant un changement de la structure de la protéine ou des propriétés physiques d'une région de celle-ci.

Les mutations sont regroupées en six classes selon les désordres entraînés sur la molécule CFTR (Kerem, 2006). Les classes I, II et III sont des mutations graves car elles sont associées à des phénotypes mucoviscidosiques sévères alors que les autres classes apparaissent plus modérées.

Les mutations de classe I provoquent un arrêt de la synthèse de la protéine par apparition d'un codon stop ou d'une mutation faux-sens.

Les mutations de classe II affectent les processus de maturation et d'adressage de la protéine. Cette classe inclut la mutation F508del présentant une délétion de la phénylalanine en position 508. Il s'agit de la mutation la plus répandue puisque 90 % des patients possèdent au moins un allèle portant cette mutation et 70 % des patients sont homozygotes F508del/F508del.

Les mutations de classe III affectent la régulation de l'activité de la protéine. Le CFTR est correctement localisé à la membrane apicale des cellules mais présente des défauts de régulation.

Les mutations de classe IV diminuent la conductance unitaire et la sélectivité au chlorure du canal. En général il s'agit de mutations situées dans les domaines transmembranaires ou les boucles extracellulaires participant au pore et au filtre de sélectivité du canal.

Les mutations de classe V influencent la quantité d'ARN messager. Dans ce cas, les mutations modifient l'épissage alternatif ou induisent la synthèse d'une protéine inefficace. Les mutations de classe VI affectent la stabilité de la protéine mature à la membrane. Dans ce cas les protéines CFTR seraient fonctionnelles mais ne resteraient pas suffisamment longtemps à la membrane pour remplir leur fonction.

La Figure 19 représente la localisation des mutations les plus fréquemment rencontrées.



Figure 19 : Localisation des mutations les plus fréquentes.

Les mutations sont localisées sur le schéma de la topologie de CFTR. Chaque couleur de rond représente une classe de mutations.

On peut remarquer la localisation des mutations :

- Les mutations de classe I au niveau de l'extrémité N-terminale et des NBDs.

- Les mutations de classe II, III et V au niveau des NBDs.

- Les mutations de classe IV au niveau des hélices transmembranaires formant le pore et des ICLs.

- Les mutations de classe VI principalement au niveau de l'extrémité C-terminale.

3. Physiopathologie

A. Les différentes atteintes

La mucoviscidose est une maladie des tissus épithéliaux sécréteurs. Ce tissu est retrouvé dans de nombreux organes au sein des grands systèmes de l'organisme : respiratoire, digestif et génital.

a) Atteintes pulmonaires.

Les manifestations pulmonaires sont la cause majeure de la morbidité et de la mortalité chez les patients mucoviscidosiques.

Alors que les voies aériennes CF semblent morphologiquement normales *in utero* et dans les premiers mois de la vie (De Rose, 2002), il apparaît rapidement des bouchons de mucus épais et visqueux, des bronchiolectasies, une augmentation de l'épaisseur de la paroi bronchiolaire et une diminution de leur densité (Hamutcu et al., 2002; Long et al., 2004). L'ensemble de ces complications induit une gêne de la respiration et favorise le développement d'infections pulmonaires et d'inflammations chronique des bronches.

De plus, il est important de noter que de récentes études montrent des anomalies de la morphologie de la trachée chez la souris CF (Bonvin et al., 2008) ou le cochon CF (Meyerholz et al., 2010). Il est donc probable que ces observations anatomiques se retrouvent également chez certains jeunes patients.

Il existe au sein du poumon, un système de défense qui permet la filtration des particules inhalées (poussières, micro-organismes), leur captation et leur destruction. En effet, l'épithélium bronchique est recouvert d'un liquide : l'ASL (Airway Surface Liquid ou liquide de surface des voies aériennes) constitué d'éléments sécrétés par les cellules épithéliales et sous-épithéliales, ou apportés par la circulation sanguine et les alvéoles pulmonaires. Ce film est constitué de deux phases : une phase aqueuse (le liquide périciliaire ou PCL) et une phase muqueuse (Figure 20).



Figure 20 : Représentation schématique du liquide de surface des voies aériennes Modifié d'après http://www.unc.edu

Le liquide périciliaire baigne les cils dont les mouvements permettent le déplacement du mucus flottant sur le PCL. Ce mouvement de mucus permet l'élimination des particules inhalées. L'efficacité du battement ciliaire se trouve compromise en cas de modification de viscosité du mucus sous dépendance des propriétés physico-chimiques de la sécrétion. Or un défaut de sécrétion d'ions chlorure entraîne une diminution de l'hydratation du mucus et par conséquent une augmentation de la phase muqueuse de l'ASL. On retrouve donc chez les patients CF une clairance muco-ciliaire altérée, favorisant l'accumulation de mucus dans les voies aériennes et conduisant à l'obstruction de celles-ci.

De plus, la diminution de la clairance muco-ciliaire ainsi que l'accumulation de mucus créent un environnement favorable à l'implantation et à la multiplication des pathogènes. On retrouve donc des infections à différents pathogènes tels que *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* et surtout *Pseudomonas aeruginosa*.

Les infections broncho-pulmonaires à *P. aeruginosa* marquent un tournant évolutif péjoratif dans l'évolution de la maladie puisqu'elles entraînent une inflammation locale intense avec libération de cytokines et d'enzymes destructrices telles que l'élastase neutrophile. Ces enzymes protéolytiques destinées à lutter contre les pathogènes lèsent également les cellules épithéliales bronchiques détruisant les tissus pulmonaires. Il y a alors formation de bronchectasie et à un stade ultime, évolution vers l'insuffisance respiratoire conduisant au décès (Chinet, 1999). Il est à noter que cette bactérie est extrêmement résistante aux antibiotiques et provoque 80 à 95% des décès des sujets atteints (Lyczak et al., 2002).

b) Atteintes digestives.

Le tractus digestif est composé de nombreux organes sécréteurs. Les patients atteints de mucoviscidose peuvent donc développer de nombreuses complications digestives.

<u>Au niveau du foie</u> :

Cet organe secrète la bile qui permet la digestion des lipides. Le mucus des malades peut obstruer les canaux biliaires empêchant la circulation de la bile et donc la digestion des graisses. Les lipides non digérés ne sont plus absorbés par l'organisme mais restitués tels quels sous forme de diarrhées graisseuses. Cette atteinte hépatique est retrouvée chez 5 % des patients.

Au niveau de l'intestin grêle :

Dès les premiers jours du nouveau-né atteint de mucoviscidose il apparaît un iléus méconial. Il s'agit d'une occlusion intestinale due à l'impossibilité d'expulser le méconium de l'intestin en raison de l'aspect trop épais du mucus.

L'iléus méconial constitue la manifestation initiale de la maladie dans 10 % des cas. Il entraîne, 48 heures après la naissance, l'apparition de vomissements et de ballonnements. Dans la plupart des cas l'occlusion peut être levée par des lavements hyperosmolaires.

Au niveau du pancréas :

Environ 90 % des patients présentent une insuffisance pancréatique exocrine. Dans ce cas les sécrétions pancréatiques sont visqueuses et semi solides obstruant alors les canaux pancréatiques. Les enzymes digestifs pancréatiques ne peuvent plus être déversés dans l'intestin induisant une malabsorption des nutriments à l'origine de déficience nutritionnelle et de retard pondéral chez l'enfant. Cette malabsorption de nutriments s'accompagne de carences secondaires en vitamines liposolubles (A, D, E, K, et parfois hydrosoluble comme la vitamine B12) et en oligoéléments (Davis et al., 1996).

Le pancréas se fibrose progressivement aboutissant à sa destruction par une autodigestion consécutive à l'accumulation d'enzymes digestives. Lors de cette fibrose, le pancréas endocrine peut également être atteint, provoquant l'apparition de diabète insulinodépendant vers l'adolescence.
Les patients présentant une atteinte pancréatique sont dits « pancréas insuffisant (PI) » et présentent une pathologie plus grave que les patients dits « pancréas suffisant (PS) » qui présentent même en cas d'atteinte pulmonaire une maladie plus légère. Chez les patients PI on retrouve surtout des mutations de classe I, II et III.

c) Autres atteintes.

Atteintes génitales :

Les manifestations génitales de la mucoviscidose atteignent l'homme par une aplasie des canaux déférents (voies excrétrices des spermatozoïdes) entraînant une azoospermie (Heaton and Pryor, 1990). Il ne s'agit pas d'une anomalie de développement mais d'un processus de dégénérescence résultant d'obstructions similaires à celles des canaux pancréatiques. La composition du sperme est aussi modifiée.

Chez la femme, l'appareil génital est anatomiquement normal. Toutefois, une hypofertilité est observée s'expliquant par des modifications physico-chimiques de la glaire cervicale. Cette dernière est épaisse et pauvre en eau ce qui gène la migration des spermatozoïdes dans l'utérus (Kopito et al., 1973). Cependant, l'insémination endo-utérine permet de pallier ce problème.

Atteintes des glandes sudoripares.

Alors que les atteintes décrites précédemment sont la conséquence d'un mucus trop épais, les sécrétions de la peau comme la sueur font exceptions. Chez les patients mucoviscidosiques, la consistance et la quantité de sueur sécrétée sont normales mais sa teneur en sel est trop élevée (> 60 mEq/L pour le Cl⁻).

L'orientation des flux d'ions est inversée dans l'épithelium des glandes sudoripares, les ions chlorure ne sortent pas de la cellule mais y pénètrent grâce à la protéine CFTR. Physiologiquement cette absorption de chlorure réduit la perte en chlorure de sodium (NaCl) contenu dans la sueur prévenant ainsi la déshydratation de l'organisme. Chez les patients CF, les ions chlorure ne sont plus réabsorbés, ce qui provoque une accumulation de NaCl dans la sueur (d'où le baisé salé) pouvant être responsable de déshydratation aiguë.

Introduction

B. Traitements

a) Traitements disponibles

A ce jour il n'existe pas de traitement curatif mais il existe des traitements symptomatiques améliorant le profil évolutif de la maladie. Même s'ils sont extrêmement contraignants et doivent être poursuivis durant toute la vie du malade, ces traitements ont permis d'allonger l'espérance de vie des patients. En effet pour les enfants qui naissent en 2008, l'espérance de vie est de 46 ans, alors qu'elle n'était que de 7 ans en 1965. Cependant l'âge moyen de décès de l'ensemble des patients n'est que de 27 ans (source chiffres : http://www.vaincrelamuco.org).

Les traitements actuels sont donc symptomatiques et tentent d'agir sur les différentes atteintes de la pathologie.

- Soulager la respiration des patients. Avec tout d'abord la kinésithérapie respiratoire, qui aide à évacuer les sécrétions épaisses, mais aussi l'administration de mucolytiques et de bronchodilatateurs. Ces médicaments pouvant être administrés à l'aide de nébulisateurs pour une meilleure efficacité.

- Ralentir ou empêcher les infections et l'inflammation des voies aériennes. Pour combattre les bactéries, les médecins tentent de développer des approches d'antibiogrammes combinés afin de réduire les problèmes de résistance des bactéries aux traitements. L'inflammation des voies aériennes quant à elle, est traitée avec des corticoïdes par voie générale. Cependant leur utilisation au long cours est limitée par apparition de nombres d'effets secondaires. Par ailleurs les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont également utilisés mais leur tolérance digestive limite aussi leur utilisation.

- Prendre en charge les carences alimentaires et les défauts digestifs. Cet élément passe par une alimentation hyper énergétique et équilibrée avec un apport en enzymes pancréatiques.

- Réparer les tissus épithéliaux atteints par transplantation pulmonaire. Il s'agit du dernier recours qui permet une survie des sujets arrivés en phase terminale. Il s'agit d'opérations lourdes et limitées puisque les donneurs sont rares et les organes compatibles difficiles à trouver.

74

Introduction

b) La recherche thérapeutique

La recherche constitue la clef pour améliorer les possibilités thérapeutiques. Les voies de recherches sont diversifiées et les orientations prises concernent les nombreux facteurs mis en jeu dans la pathologie.

La recherche est orientée vers :

- la thérapie génique : remplacement ou correction du gène anormal.

- la thérapie protéique : correction de l'adressage défectueux des mutations de classe II ou régulation de l'activité des mutations de classe III et IV.

- la lutte contre l'infection et l'inflammation : développement d'antibiotiques et de vaccins ; développement d'anti-inflammatoire mieux tolérés par les malades.

- une pharmacologie alternative : des activateurs d'autres canaux chlorure présents à la membrane plasmique ou des inhibiteurs de canaux sodique pour bloquer l'entrée massive de sodium.

La Figure 21 donne un aperçu de tests et d'avancées pharmacologiques concernant des composés correcteurs ou modulateurs de CFTR et d'autres canaux.



Figure 21 : Résumé de molécules en cours de tests et de développement D'après *Becq, 2010*

Position du problème et objectifs *I. Contexte de l'étude*

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé sous la direction du Pr Frédéric Becq au sein de l'équipe physiologie et pharmacologie des canaux ioniques de l'institut de physiologie et de biologie cellulaire (IPBC, UMR CNRS 6187) de l'université de Poitiers.

Cette étude avait pour objectif premier de mettre en évidence le site d'action des composés Benzo[c]quinolizinium activateur de CFTR. Suite aux nombreux indices apportés par les précédentes études, nous avons utilisé une méthode de pharmacologie inverse couplée à de la biologie structurale.

Concernant ce dernier point, il a été mis en place une collaboration avec l'équipe du Dr Isabelle Callebaut de l'Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés (IMPMC) de l'université Pierre et Marie Curie de Paris 6.

Cette association a conduit au développement d'un projet financé par l'association Vaincre La Mucoviscidose (VLM) consistant à mettre en relation les études structurales théoriques avec des données expérimentales. Ce projet a deux objectifs : affiner le modèle 3D de CFTR proposé par Mornon *et al., 2009* et explorer des sites putatifs de liaison d'agents pharmacologiques.

II. Les composés Benzo[c]quinolizinium

Les sels de benzo[*c*]quinolizinium appelés aussi MPB sont une famille de composés dont certains membres ont été montrés comme activateurs de CFTR (Becq et al., 1999). Par la suite, il a été montré que ces composés permettaient de restaurer une localisation membranaire du mutant CFTR-F508del (Dormer et al., 2001). Les MPB apparaissent donc comme des composés à double action : activateur et correcteur de l'adressage.

Un tel composé apparaît prometteur sur le plan de la thérapie puisqu'un même composé permettrait de corriger le défaut d'adressage de la protéine et de moduler son activité. Afin de pouvoir proposer dans le futur des composés à double action présentant une toxicité et une dose efficace plus faible que les composés MPB, leur mécanisme d'action a été étudié sans toutefois être mis clairement en évidence.

Concernant l'activation du canal, il apparaît que les MPB ne modifient pas l'activité ATPase des NBD et que leur action est indépendante de la phosphorylation (Derand et al., 2001). De plus une étude non publiée de Pereira *et al.*, du laboratoire de Dormer, démontrent par des expériences d'équilibre de ligand radioactif que les MPB se fixent sur un site du NBD1 du CFTR.

Concernant l'effet des MPB sur la correction de l'adressage de CFTR, il a été montré que les composés été capables d'inhiber la dégradation de fragments protéiques composés des domaines cytoplasmiques F508del-NBD1 et domaine R (Stratford et al., 2003). Plus récemment il a été mis en évidence une diminution de l'activité du proteasome en présence de MPB et surtout une absence de correction lorsque la glycine G622 était mutée en acide aspartique, mutation G622D retrouvée chez des patients CF (Norez et al., 2008).

La famille des MPB comporte de nombreux membres ayant tous une activité correctrice et certains une activité activatrice. Dans cette étude nous avons utilisé le composé MPB-91 (Figure 22) car une étude de structure/activité l'a révélé comme l'un des plus intéressants en terme d'activation/toxicité (Marivingt-Mounir et al., 2004).



Figure 22 : Structure du MPB-91 Les carbones sont numérotés de 1 à 10

III. Projet de recherche

Pour commencer la recherche du site de fixation des MPB sur la protéine CFTR, nous avons exploré l'environnement de la glycine 622 dont la mutation G622D a pour conséquence l'inefficacité des MPB à corriger l'adressage du CFTR.

Nous avons donc cherché à savoir si la glycine 622 participait au site de fixation ou si cette dernière était à proximité. De plus, nous nous sommes demandés s'il n'y avait qu'un seul site de fixation des MPB pour deux effets ou si au contraire les composés agissaient à différents endroits de la protéine.

Dans cette, étude nous avons donc étudié l'effet activateur des MPB au niveau de la glycine 622 et par extension de son environnement moléculaire : l'extrémité C-terminale du NBD1.

Par la suite, le projet a évolué afin de comprendre et d'affiner les premiers résultats obtenus par l'étude de mutations introduites au sein de l'extrémité C-terminale du NBD1. Une étude du modèle moléculaire du CFTR a permis de mettre en lumière des liaisons possibles entre l'extrémité C-terminale du NBD1 et diverses régions du CFTR. Plusieurs de ces liaisons ont été explorées par mutations des résidus mis en jeu.

L'étude du modèle 3D a également mis en évidence différentes régions du CFTR qui semblent jouer un rôle critique dans la perméabilité chlorure. Cet axe de travail étant très récent, les résultats présentés ne sont que préliminaires et nécessitent encore de nombreuses expérimentations.

Matériels et Méthodes

Cette section du manuscrit présente les principales méthodes employées lors de ce travail de recherche.

Dans cette étude, le rôle de l'extrémité c-terminale du NBD1 et de son environnement moléculaire sur l'activité du CFTR ainsi que le mécanisme d'action des composés benzo[c]quinolizinium ont été explorés.

Pour ce faire nous avons étudié l'influence de mutations ayant pour conséquences des changements dans la structure moléculaire de la protéine ou dans les interactions entre les acides aminés des domaines étudiés. Ces mutations ont été choisies suite à une analyse par modélisation 3D de la protéine réalisée par le Dr Isabelle Callebaut avec laquelle nous collaborons.

Nous avons étudié les conséquences des mutations choisies dans un système d'expression hétérologue du canal CFTR par différentes approches biochimiques et électrophysiologiques.

I. Système d'expression hétérologue

<u>1. Vecteurs d'expression</u>

Un vecteur d'expression est un vecteur de clonage dans lequel est introduite une molécule d'ADN entre les signaux indispensables à son expression. Parmi les vecteurs d'expression on retrouve les plasmides. Il s'agit de molécules d'ADN circulaires extrachromosomiques non essentiels à la survie de l'hôte et capables de se répliquer de façon autonome. Dans cette étude le vecteur d'expression utilisé est le plasmide pEGFP-C1

A. Plasmide pEGFP-C1

Le plasmide p-EGFP-C1 (détails des éléments du plasmide Figure 23) est un vecteur dit « navette » : il possède deux origines de réplication, l'une bactérienne et l'autre eucaryote, ceci lui conférant la capacité de se répliquer dans les deux types d'organisme. L'origine de réplication bactérienne, ici **pUC ori**, permet la production du vecteur par les

bactéries alors que l'origine de réplication eucaryote, ici P_{CMV} , est indispensable à son expression dans des cellules eucaryotes.



Figure 23 : Carte de restriction du plasmide pEGFP-C1 Issu de la base de données Clontech (GenBank Accession # :U55763)

Description des éléments du vecteur :

pUC ori : origine de réplication bactérienne pour Escherichia coli.

P_{CMV}: promoteur du cytomégalovirus humain.

EGFP : séquence codante de l'EGFP.

SV40 polyA : signal de polyadénylation marquant l'extrémité 3' de l'ARN messager.

f1 ori : origine de production d'un ADN simple brin.

SV40 ori : origine de réplication du SV-40 (permet la réplication dans des cellules exprimant l'antigène T).

 P_{sv40} : promoteur précoce du SV-40.

Kan^r/Neo^r : séquence codante pour la néomycine phototransférase conférant aux bactéries et cellules exprimant le plasmide une résistance à la néomycine et/ou à la kanamycine.

HSV TK polyA : signal de polyadénylation du gène codant pour la thymidine kinase (TK) du virus Herpes Simplex (HSV).

MCS : Site multiple de clonage.

Dans notre étude il a été utilisé le plasmide pEGFP-C1 dans lequel a été inséré l'ADN complémentaire (ADNc) codant pour la protéine CFTR humaine (Moyer et al., 1998).

De plus ce plasmide possède la séquence codante pour la protéine EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*. Cette séquence étant adjacente au site multiple de clonage (**MCS**, site d'insertion de l'ADNc du CFTR), l'expression du plasmide dans une cellule eucaryote, générera une protéine de fusion EGFP-CFTR, la protéine EGFP étant fixée à l'extrémité NH₂-terminale de la protéine d'intérêt. Il est à noter que l'ajout de ce « tag » sur notre protéine ne modifie ni l'adressage ni les fonctions de la protéine CFTR (Moyer et al., 1998)

La protéine EGFP est dérivée de la protéine sauvage GFP, *Green Fluorescent Protein*, extraite de la méduse *Aequoria victoria* en 1962 (Shimomura, 2009) et dont le gène a été cloné en 1992 (Prasher et al., 1992). Il s'agit d'une protéine de 238 acides aminés dont l'arrangement spatial de trois acides aminés (Ser65-Tyr66-Gly67) constitue le chromophore conférant à la protéine la particularité d'émettre de la fluorescence verte. L'EGFP est un variant de la GFP, qui possède deux mutations ponctuelles (F64L et S65T) modifiant la conformation de la protéine la rendant 35 fois plus fluorescente que la GFP sauvage (Zhang et al., 1996).

B. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée permet l'introduction d'une mutation précise dans un fragment d'ADN cloné puis la réinsertion de cette séquence mutée dans le gène original.

a) Principe

La méthode utilisée est la méthode dite de Kunkel (Kunkel, 1985), utilisant un ADN simple brin comme matrice initiale, adaptée par Braman (Braman et al., 1996) pour pouvoir utiliser la technique avec un ADN double brin.

La mutagénèse dirigée repose sur le principe de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), qui permet l'amplification *in vitro* d'une séquence d'ADN connue à partir d'une faible quantité d'acide nucléique. C'est une méthode basée sur la succession de cycles de

transition de température : - Elévation de la température provoquant la dissociation des deux brins d'ADN complémentaires.

- Refroidissement de la température permettant l'hybridation d'amorces sens et anti-sens (encadrant la séquence de la matrice à amplifier).

- Nouvelle élévation de la température permettant l'action de la Taq Polymérase, enzyme ajoutant, selon la règle de complémentarité des bases, des désoxyribonucléotides à l'extrémité 3'des amorces. Cette étape correspond à l'élongation des amorces donc à la synthèse d'un brin d'ADN identique à la séquence comprise entre les deux amorces.

Ce cycle de température est répété N fois permettant une amplification exponentielle de la séquence encadrée par les deux amorces (sens et anti-sens).

Pour la mutagénèse dirigée, les amorces utilisées contiennent la mutation à introduire, l'ADN néo synthétisé portera donc la mutation recherchée.

b) Matériel utilisé

Dans cette étude, les mutagénèses dirigées sont réalisées avec le kit Quickchange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagène).

Ce kit comprend :

- un mix de dNTP (mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP : désoxi adénine triphosphate, dCTP : désoxi cytosine triphosphate, dGTP : désoxi guanine triphosphate et dTTP : désoxi thymine triphosphate)

- une Taq polymérase Pfu Turbo : enzyme d'élongation thermostable

- un tampon de réaction 10X

- une Quick solution qui améliore l'amplification linéaire

- un enzyme de restriction *Dpn1* : endonucléase spécifique de l'ADN méthylé (brin parentaux)

- un lot de bactéries ultra-compétentes *XL10-Gold* (souche d'*Escherichia coli* rendue ultra-compétentes).

c) Amorces de mutagénèse dirigée

L'efficacité de la mutagénèse dépend en grande partie de la qualité des amorces utilisées. Celles-ci sont dessinées pour introduire la mutation voulue dans la séquence codante pour le CFTR. Certains paramètres doivent être respectés pour permettre l'hybridation avec le brin parental malgré l'erreur de mésappariement au lieu de la mutation.

La mutation doit être placée le plus possible au centre de l'amorce et les extrémités 3' et 5' de celle-ci doivent contenir un maximum de bases Guanine et Cytosine augmentant ainsi la force d'appariement des amorces avec l'ADN parental. Enfin il faut prendre en compte la température de fusion des amorces : le Tm (*Melting Temperature*). Il s'agit de la température moyenne à laquelle la moitié de l'ADN double brin est dissocié. Elle est estimée par la formule suivante :

Tm = 81,5 + 0,41(% GC) - 675/N - % mésappariement

%GC : pourcentage de guanine et de cytosine. N : nombre total de bases de l'amorce.

Il est préférable que le Tm des amorces soit supérieur ou égale à 78°C afin de respecter les conditions thermiques de la PCR.

Les amorces ont été synthétisées et purifiées par la société *Invitrogen*. Le détail des amorces est présenté en annexe 1.

d) Phase expérimentale

• Réaction PCR : introduction de la mutation dans le plasmide matrice

Dans un tube PCR sont mélangés

- Tampon 10X
- 30 ng d'ADN plasmidique (matrice)
- 125 ng d'amorce sens
- 125 ng d'amorce anti-sens
- 1 μ l de mix dNTP
- 3 µl de Quick solution
- 2,5 U/µl de PfuTurbo

Le volume final est porté à 50 µl avec de l'eau pure.

La réaction d'amplification est ensuite réalisée dans un thermocycleur *PTC-100* (*MJ Research, Inc*) selon des paramètres suivants :

Segment	Nombre de cycles	Température	Temps
1	1	95°C	1 minute
		95°C	50 secondes
2	18	60°C	50 secondes
		68°C	10 minutes
3	1	68°C	1 minutes

• Digestion de l'ADN parental

La matrice parentale non mutée a été mise en grande quantité pour que la réaction de mutagénèse puisse avoir lieu. Il faut donc après la réaction PCR l'éliminer afin de ne garder que l'ADN néo synthétisé potentiellement muté. Il existe une différence d'état entre ces deux types d'ADN permettant de supprimer l'ADN parental sans dégrader le néo synthétisé. En effet ce dernier n'a encore subit aucune modification alors que le premier ayant été amplifié et extrait *d'Escherichia coli* est méthylé.

On ajoute donc 10 U/ μ l (1 μ l) d'enzyme *Dpn I* aux produits d'amplification préalablement refroidis. Une incubation d'1h30 à 37°C permet alors à cette endonucléase spécifique de l'ADN méthylé, de dégrader les brins d'ADN parentaux.

o Transformation de bactéries compétentes

Le plasmide obtenu est sous forme d'un plasmide aux extrémités libres. Pour réparer ces coupures simples brins et donc permettre sa réplication normale, une transformation de bactéries compétentes (possédant des pores permettant la pénétration d'ADN exogène) est réalisée. Cette transformation permettra également l'amplification et la sélection du plasmide.

Les bactéries utilisées sont des bactéries *XL10-Gold*. Il s'agit de bactéries de souche *Escherichia coli* possédant une activité ligase réparant les cassures simples brins et rendues ultra-compétentes par un traitement au chlorure de calcium.

Les étapes suivantes sont réalisées en condition stérile autour de la flamme d'un bec Bunsen.

- **Phase d'adsorption** : c'est la phase pendant laquelle l'ADN se colle à la membrane plasmique des bactéries dont les phospholipides sont figés à 0°C.

Les bactéries sont décongelées sur glace et mises en présence de β mercaptoéthanol pendant 10 minutes. Il est ensuite ajouté 2 µl du produit d'amplification digéré puis le mélange est laissé 30 minutes sur glace.

- **Phase d'absorption** : c'est la phase de pénétration de l'ADN dans la bactérie, réalisée par un choc thermique qui rend sa fluidité à la membrane bactérienne.

Le mélange bactéries/ADN est donc mis 30 secondes à 42°C. La réaction est arrêtée en plaçant le mélange 2 minutes sur glace immédiatement après le choc thermique.

- Amplification du plasmide et acquisition du phénotype de résistance : l'augmentation de la température de l'environnement des bactéries va permettre à ces dernières de reprendre leur cycle de croissance et leur métabolisme normal. Pendant cette phase le plasmide va se répliquer donnant lieu à l'expression de protéines plasmidiques et l'acquisition d'un phénotype de résistance aux antibiotiques.

Les bactéries sont placées dans 500 µL de milieu SOC, stérile et préchauffé, puis incubées 1h à 37°C sous agitation.

Composition du milieu SOC :

Milieu SOB :

- 20 g de tryptone
- 5 g d'extraits de levure
- 0,5 g de NaCl
- 1 litre qsp d'eau désionisée

Ajouter extemporanément :

- 10 ml de MgCl₂ 1M et 10 ml de MgSO₄ 1M stérile
- 2 % de glucose 20% (w/v) stérile (filtré)

- Sélection des bactéries transformées : en appliquant une pression sélective positive, grâce aux antibiotiques introduits dans le milieu, seules les bactéries ayant intégrées le plasmide pourront se multiplier.

 $250 \ \mu l$ de suspension bactérienne sont étalées sur milieu solide LB-agar (LB : Luria Bertoni) additionné de kanamycine (à $25 \ \mu g/ml$) et placé une nuit à $37^{\circ}C$.

Composition du milieu LB :

- 10 g de tryptone.
- 5 g d'extraits de levure.
- 10 g de NaCl.
- 400 µl de NaOH 10N.
- 1 litre qsp d'eau désionisée
- + 15 g d'agar pour 1 litre de LB-agar

Les colonies résistantes à la kanamycine sont par la suite récupérées, multipliées et le plasmide amplifié, extrait et séquencé.

C. Extraction plasmidique

Pour être utilisé comme vecteur d'expression en cellule eucaryote les plasmides doivent être amplifiés puis extraits des bactéries. Une culture liquide de bactéries transformées est réalisée sous pression de sélection (antibiotiques) afin d'amplifier le plasmide. S'ensuit une phase d'extraction et de purification de ce dernier.

a) Principe

Deux sortes d'extraction sont réalisées. La première extraction, appelée ici « miniprep », permet d'obtenir une petite quantité de plasmide qui sera séquencée. Si la séquence étudiée possède la mutation d'intérêt et ne présente aucune altération du reste de la séquence codante pour le CFTR, alors une deuxième extraction, appelée ici « maxiprep », est réalisée afin d'obtenir une grande quantité de plasmide de grande pureté.

Les deux types d'extraction sont effectués grâce à l'utilisation des kits *Plasmid Purification (mini ou maxi) (qiagen).* Le principe de ces kits se base sur une méthode de lyse alcaline suivi d'isolement par liaison à des colonnes échangeuses d'anions. La lyse alcaline permet de récupérer l'ADN plasmidique en se débarrassant des membranes bactériennes. Le passage sur une colonne échangeuse d'ions permet de séparer l'ADN plasmidique, qui se fixe sur la colonne, des autres débris bactériens (ARN, protéines et impuretés de faibles poids moléculaires). L'élution de l'ADN permet ensuite de le concentrer et le purifier.

b) Protocole

Les protocoles des mini- et maxi- prep ne diffèrent que par certains volumes et temps utilisés. Dans la suite du paragraphe les volumes et temps indiqués en bleu correspondent à ceux utilisés lors des miniprep alors que ceux en **rouge** désignent les volumes et temps utilisés pour la maxiprep.

• Cultures bactériennes

Une colonie résistante à la kanamycine est prélevée et mise en culture dans 3 ml de milieu LB additionné de kanamycine (25 μ g/ml) pendant une nuit à 37°C. La culture est utilisée telle quelle pour les miniprep ou 100 μ l en sont prélevés et remis en suspension dans 100 ml de LB+kanamycine.

• Lyse alcaline

Après centrifugation de la culture, à 5000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, le culot bactérien est remis en suspension dans 200 μ l ou 10 ml de tampon Tris-HCl 50mM, pH 8,0, EDTA 10mM, RNase A 100 μ g/ml. Puis les bactéries sont lysées par 200 μ l ou 10 ml de solution de lyse (NaOH 200 mM et SDS 1%).

• Purification et concentration du plasmide

Après neutralisation de la solution de lyse avec 200 μ l ou 10 ml d'une solution d'acétate de potassium 3M, pH 5,5, le lysat est centrifugé 10 ou 30 minutes à 14000 rpm pour précipiter débris bactériens et protéines. Le surnageant, contenant l'ADN plasmidique est récupéré et placé dans une colonne échangeuse d'ions. L'ADN est ensuite élué à l'aide de 800 μ l ou 15 ml de tampon d'élution (Tris-Cl 50mM, pH 8,5, NaCl 1,25 M).

L'ADN est précipité par ajout de 0,7 volume d'isopropanol puis centrifugation de 45 minutes à 14000 rpm. Après un lavage à l'éthanol 70% (1 ou 5 ml), l'ADN plasmidique est séché et remis en suspension dans 100 ou 200 µl d'eau pure.

c) Dosage et vérification de l'ADN plasmidique

Afin de pouvoir utiliser l'ADN plasmidique dans les meilleurs conditions il faut réaliser un dosage et une vérification de ce dernier. Le dosage va permettre de connaitre la concentration du plasmide utilisé, afin de maitriser la quantité d'ADN introduite dans les cellules. La vérification par migration sur gel d'agarose permettra de vérifier la taille et l'intégrité du plasmide.

• Dosage d'ADN

La méthode de dosage utilisée est basée sur la spectrophotométrie. On utilise l'absorbance des rayons ultraviolets à 260 nm.

Selon la loi de Beer Lambert, l'absorbance A_{λ} est fonction de la concentration C de la solution, du coefficient d'absorption molaire ε_{λ} et de la longueur de solution à traverser l.

Loi de Beer Lambert : $A_{\lambda=} \varepsilon_{\lambda} * \mathbb{C} * \mathbb{I}$

Les cuves utilisées sont en quartz et de 1 cm de coté soit l=1. Le coefficient d'extinction molaire de l'ADN étant de 6200 A_{260} .M⁻¹.cm⁻¹ et une mole de nucléotides représentant 309 grammes, on peut utiliser le facteur de corrélation suivant : 1 unité de DO = 50 ng/µl d'ADN.

• Migration sur gel d'agarose

Afin de vérifier la concentration et surtout l'intégrité du plasmide, ce dernier est soumis à une migration sur gel d'agarose.

Cette migration permettra de visualiser approximativement la concentration d'ADN (en comparaison avec un témoin de concentration connue), la taille du plasmide et surtout la présence des 3 formes sous lesquelles on retrouve normalement le plasmide :

- Forme I : circulaire covalente
- Forme II : circulaire, relâchée, un des 2 brins coupés

- Forme III : forme linéaire, les 2 brins coupés.

L'ADN est donc mélangé à du tampon de charge puis déposé sur un gel d'agarose à 0,8% préparé à partir de tampon TAE 0,5X et additionné de bromure d'éthidium (BET : agent intercalant devenant fluorescent lorsqu'il est exposé aux ultraviolets).

Tampons utilisés :

<u>Bleu de charge</u> : 10 % bleu de bromophénol, 10 % xylène cyanol, 20 % ficoll, dans du tampon TAE 0,5X

<u>Tampon Tris Acétate EDTA (TAE) 0,5X</u> : 20 mM Tris base, 0,05 % acide acétique, 0,5 mM EDTA, pH 8,4

D. Séquençage des plasmides

Pour vérifier l'insertion de la bonne mutation dans la séquence codante du CFTR, un séquençage de l'ADN plasmidique est réalisé. Le séquençage est la détermination de la succession des acides nucléotides composant un brin d'ADN.

Pour vérifier l'obtention de la mutation, seule la zone du gène de part et d'autre de la mutation étudiée est séquencée.

a) Principe

Le séquençage des séquences codantes de l'ADN plasmidique a été réalisé par la méthode de Sanger.

Il s'agit de réaliser une PCR classique mais en utilisant en plus des dNTP, des ddNTP (didésoxyribonucléotides) contenant un groupement OH en moins en position 3' et marqué à l'aide de fluorochromes de couleurs différentes. L'absence du groupement OH empêche la fixation d'un autre nucléotide et donc la poursuite de l'élongation.

Ainsi lorsque l'ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, la synthèse du brin d'ADN s'arrête. De cette manière, différents brins de taille variable vont être obtenus en grande quantité, chaque fragment arrêté par un ddNTP donné ayant la même couleur.

D'après la loi de la probabilité des grands nombres, toute la séquence pourra être déterminée. Les multiples fragments sont séparés par électrophorèse selon leur taille. Ils sont

ensuite classés par lecture de la fluorescence du ddNTP terminal lorsqu'ils passent devant le faisceau d'un photomètre à laser.

b) Phase expérimentale

Le mix de séquençage utilisé est issu du kit *Big Dye Terminator*TM *Cycle Sequencing Ready Reaction V1.1 Kit* (Applied Biosystems). Il contient la Taq polymérase, les dNTP et les ddNTP couplés avec un fluorophore spécifique de la base azotée.

• *Réaction PCR*

Dans un tube PCR sont mélangés :

- $-2 \mu l de mix$
- 1 µl d'amorces (sens ou anti-sens) à 3,33 µM
- 1 µl de plasmide
- 1 µl d'eau.

La réaction d'amplification est ensuite réalisée dans un thermocycleur *PTC-100* (*MJ Research, Inc*) selon les paramètres suivants :

Segment	Nombre de cycles	Température	Temps
1	25	96°C	1 minute
		96°C	10 secondes
		55°C	10 secondes
		60°C	4 minutes

Rq : Le détail des amorces de séquençage est présenté en annexe 2.

• Précipitation et dénaturation

Après une précipitation de l'ADN à l'aide d'éthanol 100 % et d'acétate de Na⁺ 3 M pH 5,2, le culot est repris dans 20 µl de formamide désionisé (solvant inorganique). Les brins d'ADN sont alors dénaturés par la température (2 minutes à 95°C puis immediatement sur glace)

La lecture de la séquence est faite par une méthode fluorescente par un séquenceur automatique ABI PRISMTM 310 (Applied Biosystems).

E. Réalisation d'un souchier

Pour finir, nous avons réalisé un stock de bactéries transformées qui sont maintenues à -80°C. Le plasmide est donc conservé dans son système de production ce qui permettra d'obtenir du plasmide sans avoir à passer à nouveau par les étapes de transformation, sélection et séquençage.

Afin d'être conservé sans risque de dégradation, les bactéries transformées sont stockées en présence de glycérol.

• *Phase expérimentale*

1 colonie est mise en culture dans 6 ml de milieu LB + Kanamycine. Cette culture est laissée jusqu'à la phase exponentielle de croissance (environ 6-7 heures à 37°C sous agitation 300 rpm). Puis après centrifugation 5 minutes à 3000 rpm, le culot est repris dans 1,4 ml de LB + 600 μ L de glycérol stérile 50 % (50 % eau stérile, 50 % glycérol).

La préparation est aliquotée en cryotubes (500 μ L/cryotube), placée sur glace quelques minutes, puis placée à - 80°C.

2. Système d'expression

L'étude de la relation structure-activité de la protéine canal CFTR a été réalisée par expression de cette dernière dans un système eucaryote. Dans ce paragraphe seront détaillés les systèmes d'expressions utilisés : les cellules eucaryotes. Puis la manière de faire pénétrer et exprimer les plasmides sera détaillée dans le paragraphe suivant.

A. Culture cellulaire

Une des caractéristiques essentielles, pour le choix du modèle, est l'absence de la protéine étudiée dans les types cellulaires choisis. Deux types cellulaires ont été utilisés en fonction des expériences réalisées. La lignée HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*) pour les expériences de biochimie et de patch-clamp et la lignée BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*) pour la partie efflux d'iodures de ce travail.

a) Type cellulaire

o Lignée HEK-293

Les cellules HEK-293 sont des cellules embryonnaires épithéliales humaines issues de reins, transformées par un fragment de l'adénovirus 5 à la fin des années 1970 (Graham et al., 1977).



Figure 24 : Cellules HEK-293, vues en microscopie à transmission (x10) (Barre d'échelle correspondant à 100 µm)

Remarque : La transformation cellulaire consiste en l'injection d'un élément (le plus souvent un virus) provoquant des changements des propriétés de la cellule. Le plus souvent la transformation induit l'immortalité des cellules, une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance du sérum, une perte de l'inhibition de contact.

Les HEK-293 sont classées niveau 2 concernant la biosécurité (risque modéré pour le manipulateur et nul pour la collectivité).

Ces cellules ont été choisies car elles n'expriment pas la protéine CFTR et sont très faciles à cultiver. Elles se divisent rapidement et ne nécessitent pas un milieu de culture trop complexe. En revanche, elles adhèrent faiblement au support de culture une fois placée à température ambiante. Cette caractéristique limite leur utilisation pour la technique des efflux d'iodures qui se déroule à température ambiante et avec des propulsions de milieu assez brusques qui décollent les cellules. Pour cette raison une deuxième lignée cellulaire a été utilisée : les BHK-21.

o Lignée BHK-21

Les cellules BHK-21 sont des cellules fibroblastiques issues de rein de hamsters nouveaux nés et transformées par le polyomavirus en 1961 par Macpherson (Macpherson and STOKER, 1962).



Figure 25 : Cellules BHK-21, vues en microscopie à transmission (x10) (Barre d'échelle correspondant à 100 μm)

Cette lignée cellulaire est également classée niveau 2 et n'exprime pas la protéine CFTR.

b) Culture Cellulaire

Toutes les manipulations de culture cellulaire sont réalisées en conditions stériles sous une hotte de sécurité microbiologique de type II.

Mis à part les milieux qui diffèrent, toutes les étapes de la culture cellulaire sont identiques entre les HEK-293 et les BHK-21.

o Milieux utilisés

Les HEK-293 sont cultivées dans du milieu Eagle Modifié par Dulbelco (D-MEM) à forte teneur en glucose (4,5 g/L), enrichi en pyruvate et en « glutamax » (dérivé de L-glutamine, plus stable et résistant). Le milieu est supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et d'antibiotiques (100 UI/L de pénicilline et de streptomycine). Les BHK-21 sont cultivées dans du milieu D-MEM/F12 contenant du « glutamax ». Le milieu est supplémenté de 5% de SVF et de 100 UI/L d'antibiotiques.

Le SVF est composé en majorité de protéines globulaires (albumine de sérum bovin). Les cellules vont survivre et croitre en utilisant ces facteurs de croissance. Le SVF est dit décomplémenté c'est-à-dire que les protéines du complément (protéines actrices de la réponse immunitaire) sont dénaturées par un choc thermique (30 minutes à 56°C)

Les antibiotiques utilisés sont la pénicilline et la streptomycine. Le premier est une bêta lactamine efficace contre les bactéries à Gram positif. Elle inhibe la formation de leur paroi de peptidoglycane. La streptomycine est un aminoside à large spectre, efficace autant sur certains bacilles à Gram négatif (comme *Escherichia coli*), que sur certaines coques à Gram positif (comme *Staphylococcus aureus*). Cet antibiotique inhibe la synthèse des protéines bactériennes en se fixant sur la sous unité ribosomale 30S.

• Décongélation des cellules

Les cellules étant stockées dans l'azote, elles sont placées dans le DMSO qui a un effet cryoprotecteur. Cependant à température ambiante le DMSO devient toxique pour les cellules, il faut donc les laisser le moins longtemps possible en contact.

Protocole :

20 ml de milieu adapté sont mis à chauffer à 37°C.

L'aliquot de cellules sortant de l'azote est mis en contact avec le milieu réchauffé. Le mélange est mis à centrifuger 7 minutes à 1000 rpm.

Le culot est repris dans 12 ml et le tout déposé dans une flasque de 75 cm² ou 2 flasques de 25 cm².

o Entretien des lignées

Les cellules de lignées ayant perdue la propriété d'inhibition de contact, il convient de les changer de boite lorsqu'elles arrivent à 80-100% de confluence. Cette étape consiste donc à détacher les cellules de la boite et les séparer les unes des autres puis à les redistribuer avec une dilution appropriée dans une nouvelle flasque de routine ou dans des boites adaptées à la manipulation visée.

Les cellules sont attachées entre elles et à la boite grâce à des liaisons protéiques via des protéines d'adhérence dépendantes du calcium libre. Pour les détacher un mélange de trypsine-EDTA est utilisé. La trypsine est une enzyme protéolytique alors que l'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique) est un chélateur de calcium.

Protocole :

Les volumes indiqués correspondent à une flasque de 25 cm².

Eliminer soigneusement le surnageant.

Rincer les cellules à l'aide d'1 ml de PBS stérile ou 1 ml de trypsine-EDTA (pour enlever les cellules mortes et les traces de SVF qui inhibent l'action de la trypsine).

Incuber une minute en présence d'1 ml de trypsine-EDTA à température ambiante pour les HEK-293 ou 37°C pour les BHK-21.

Reprendre les cellules dans 9 ml de milieu et les centrifuger 7 minutes à 1000 rpm. Reprendre le culot dans 6 ml de milieu approprié et procéder aux dilutions voulues.

Les cellules sont ensemencées au 1/100^{ème} pour les routines, au 1/40^{ème} pour les boites servant aux expériences de patch-clamp (35 mm de diamètre), au 1/10^{ème} pour les boites servant aux expériences de western blot (60 mm de diamètre) et enfin à une densité de 75 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits, pour les expériences d'efflux d'iodures.

• Congélation des cellules

Afin de conserver un stock de cellules à faible passage, des aliquots de celles-ci sont réalisés après un passage post-décongélation.

Après le protocole de décrochage à la trypsine, reprendre le culot dans 90% de milieu et 10% de DMSO. Aliquoter les cellules en cryotubes puis placer les tubes 24h à -80°C puis dans l'azote liquide.

B. Transfection transitoire

La transfection consiste en l'introduction d'un vecteur transportant un gène d'intérêt dans une cellule. Il existe deux sortes de transfection :

- la transfection stable, pour laquelle l'ADN exogène s'intègre dans le génome de la cellule hôte et se transmet aux générations suivantes. - la transfection transitoire, pour laquelle le plasmide est libre dans le cytoplasme impliquant une expression limitée dans le temps et une non-transmission du vecteur aux générations suivantes.

Dans notre étude les propriétés de nombreux mutants ont été étudiées, il aurait été trop fastidieux et long de faire une transfection stable pour chaque mutation, nous avons donc choisi la méthode de transfection transitoire.

a) Principe de la transfection

Il existe plusieurs techniques de transfection. Dans notre étude nous avons utilisé la technique de lipofection.

Cette technique de transfection utilise des lipides cationiques pour permettre l'introduction de l'ADN exogène dans les cellules. Ces lipides dont des polyéthylènimines linéaires vendus sous le nom de JetPEITM.

Les lipides forment des complexes cationiques avec l'ADN, complexes qui interagissent avec les protéoglycanes anioniques de la membrane plasmique cellulaire et ainsi pénétrer dans les cellules par endocytose (Figure 26).

Cependant il peut y avoir un influx de protons dans les endosomes, provoquant un gonflement par des phénomènes d'osmose. La rupture de ces derniers va alors constituer un mécanisme de fuite des particules d'ADN hors du cytoplasme. Pour éviter ce phénomène de rupture et diminuer l'influx de proton, le JetPEITM possède donc une propriété dite « d'éponge à protons » qui tamponne le pH des endosomes.



Figure 26 : Principe de Lipofection par utilisation de JetPEI Modifié d'après *QBiogène*

b) Protocole de lipofection

Les cellules sont transfectées entre 12h et 24h après ensemencement.

L'ADN est dilué dans du NaCl 150 mM stérile, à raison d'1 μ g d'ADN dans 50 μ l q.s.p de NaCl.

Le JetPEI est aussi dilué dans du NaCl 150 mM stérile, à raison de 2 µl de JetPEI par µg d'ADN.

La dilution de lipides cationiques est mise sur la dilution d'ADN. Le mélange est laissé à température ambiante 15 à 30 minutes (pour laisser les complexes cationiques se former). Le mélange ADN/Lipides est ensuite mis au contact des cellules.

Le milieu de culture est changé après 24 heures.

Selon la manipulation réalisée la quantité d'ADN inoculée est différente : $0,2 \mu g$ d'ADN par ml de culture pour le patch-clamp, $0,5 \mu g$ d'ADN par ml de culture pour les efflux d'iodure, $1 \mu g$ d'ADN par ml de culture pour le western blot.

II. Caractérisation biochimique et fonctionnelle des mutants

Dans cette étude, les conséquences de changement putatif de structure moléculaire, induit par l'introduction d'une mutation dans la séquence codante pour la protéine CFTR sont étudiées. Cependant pour étudier la fonctionnalité et la pharmacologie d'un mutant il convient d'observer la maturation de la protéine. En effet, le CFTR est présent à la membrane et fonctionnel lorsqu'il est sous une forme glycosylée. Cette partie du manuscrit détaillera donc les deux aspects techniques :

- dans une première partie les techniques de biochimie mises en œuvre pour étudier la maturation de la protéine.

- dans une deuxième partie les techniques de physiologie cellulaire utilisées pour explorer la fonctionnalité et la pharmacologie.

<u>1. Techniques de biochimie</u>

A. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons comporte trois étapes : la lyse cellulaire, le dosage protéique et la dénaturation des protéines.

a) Lyse cellulaire

La lyse permet d'obtenir un lysat protéique à partir d'une culture cellulaire. Dans notre cas, les protéines sont récupérées 72 heures post-transfection.

Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS à 4°C.

Elles sont ensuite recouvertes de tampon de lyse (100 μ l pour une boite de 35 mm de diamètre et 300 μ l pour une boite 60 mm de diamètre) et mises à 4°C sous agitation pendant 30 minutes.

L'ensemble est récupéré au râteau et centrifugé 20 minutes à 4°C et 14000 rpm afin de séparer les débris cellulaires des protéines qui se retrouveront dans le surnageant. Les protéines sont ensuite dosées.

Milieux utilisés pour la lyse cellulaire :

PBS: 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄.

<u>Tampon de lyse :</u> 150 mM NaCl ; 25 mM Tris.HCl pH 7,4 ; cocktail d'inhibiteur de protéase 50X ; 1% triton X-100.

b) Dosage protéique

Afin de déposer une quantité connue de protéine, il convient de doser les protéines totales contenues dans le lysat cellulaire. Ce dosage est réalisé par la méthode de Bradford en utilisant le kit Bio-Rad Assay (Bio-Rad) pour Bradford.

Le dosage nécessite la détermination d'une gamme étalon grâce à des concentrations connues de BSA. On réalise donc un dosage avec des concentrations croissantes de BSA (de 0,1 mg/ml à 1 mg/ml).

Le réactif de Bradford est dilué au 1/5 dans l'eau puis filtré à 0.8 μ m. Les échantillons sont prédilués au 1/20 soit 5 μ l de lysat dans 95 μ l d'eau (pour ne pas sortir de la gamme étalon). Un mélange 2,5 ml de Bradford + 2,5 μ l de lysat dilué est ensuite réalisé et incubé une quinzaine de minutes à température ambiante.

La lecture de la densité optique (DO) se fait au spectrophotomètre à 595 nm. La lecture est faite contre un blanc réalisé avec du tampon Ripa à la place du lysat protéique.

Après avoir tracé la courbe étalon on reporte les valeurs de DO obtenues pour obtenir la concentration protéique du lysat en mg/ml.

c) Dénaturation

Pour que les protéines migrent correctement lors de l'électrophorèse, il convient de les dénaturer afin qu'elles perdent leur structure tridimensionnelle (par cassure des liaisons secondaires). La dénaturation est réalisée grâce à un tampon Laemli riche en SDS (détergent) et en 2-mercaptoéthanol (réduit les ponts disulfures).

100

Après de multiples essais de temps et de température, la dénaturation la plus efficace pour nos protéines de fusion eGFP-CFTR a été : tampon Laemli 2X, incubation à 37°C pendant 30 minutes.

Tampon Laemli 2X :

125mM Tris-HCl ; 4 % SDS ; 10 % 2-mercaptoéthanol ; 20% Glycerol; 0.005% Bleu de bromophénol.

B. Western blot

Le western blot comporte trois étapes distinctes.

- Une électrophorèse sur gel de polyacrylamide qui permet la séparation des protéines selon leurs poids moléculaires.

- Un électrotransfert qui permet de transférer les protéines du gel d'électrophorèse sur une membrane.

- Une immunodétection qui permet de révéler les protéines d'intérêt grâce à des anticorps spécifiques de cette protéine.

a) Electrophorèse sur gel

Deux gels différents sont utilisés. Un premier gel de concentration à 5 % de polyacrylamide et un deuxième de séparation à 5 ou 7 % de polyacrylamide. Les gels sont coulés dans des cassettes Invitrogen de 1 mm d'épaisseur.

25 à 50 µg de protéines totales y sont déposés. La migration a lieu environ 1 heure à 200 mV et 34 mA dans un tampon d'électrophorèse (Tris-Glycine-SDS migration buffer, Interchim). La migration est suivit par un marqueur de taille (High-Range Rainbow Molecular Weight Markers ; Amersham Biosciences) ce qui permet d'ajuster le temps de migration.

Tampons et réactifs utilisés

 $\label{eq:2.1} \frac{Tampon\;4X\;pour\;gel\;de\;concentration\;(upper):}{6,06\;g\;Tris-Base\;;\;4\;ml\;SDS\;10\;\%}$

 $\label{eq:main_state} \frac{Tampon~4X~pour~gel~de~séparation~(lower):}{18,07~g~Tris-Base}~;~4~ml~SDS~10$ % (p/v) ; 100 ml (qsp) H_20 ; pH 8,8

	Gel de séparation		Gel de concentration
	5%	7%	
H ₂ O	3,75ml	3,45ml	2,6ml
Tampon Lower 4X	1,5ml	1,5ml	
Tampon Upper 4X			1ml
Acryl	750µ1	1,05ml	400µ1
APS	60µ1		40µ1
Temed	6µ1		4µ1

Gels de polyacrylamide :

Tampon d'électrophorèse 10X : 0.025 M Tris-Base ; 0.192 M Glycine ; 0.1 % SDS (p/v).

b) Électrotransfert

Cette étape consiste à transférer les protéines présentes et séparées dans le gel de polyacrylamide sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) de 0,45 µm (Roche).

Le gel est placé sur la membrane de PVDF, le tout étant ensuite entouré de papier Whatman et d'éponges. Ce montage forme un « setwich ». Ce dernier est placé dans une cassette de transfert fournit avec le dispositif Invitrogen. Le transfert a lieu dans un tampon de transfert pendant 1h30 à 30 mV et 190 mA.

Tampon utilisé :

 $\label{eq:ampondet} \frac{Tampon\ de\ transfert:}{10X\ ;\ 400\ ml\ d'H_2O}\ ml\ cAPS$

c) Immunodétection

Suite au transfert, les protéines se retrouvent sur la membrane de PVDF. La présence de la protéine étudiée peut être révélée par ajout d'un anticorps spécifique de cette protéine.

Au préalable, les sites non spécifiques sont saturés par une incubation de 4 à 5 heures à 4°C avec du PBS-Tween 0,1 % contenant 5 % de lait écrémé. Après 3 rinçages au PBS-Tween 0,1 %, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C avec un anticorps primaire dirigée contre la protéine étudiée.

Le lendemain, la membrane est rincée 3 fois avec du PBS-Tween 0,1 % puis incubée 1 heure à 4°C avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et dilué dans du PBS-Tween 0.1 % + 5 % de lait écrémé. Cet anticorps est dirigé contre le type d'immunoglobulines de l'anticorps primaire.

La révélation commence par une réaction enzymatique par chémiluminescence entre la peroxydase de l'anticorps secondaire et le kit ECL (Millipore). La révélation de la réaction se fait par autoradiographie en apposant un film photographique Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences) sur la membrane.

Anticorps utilisés :

Anticorps primaire :

- Anticorps souris anti-CFTR monoclonal MAB3480 (Chemicon); dilution: 1/1000^{ème}

- Anticorps lapin anti-GFP polyclonal (Sigma) ; dilution : 1/2000^{ème}

Anticorps secondaire :

- IgG de mouton anti-souris (Amersham Biosciences) ; dilution : 1/20000ème

- IgG d'âne anti-lapin (Amersham Biosciences) ; dilution : 1/20000ème

d) Analyse par densitométrie

Pour comparer les taux de maturation en s'affranchissant des conditions variables entre les différents blots obtenus, une analyse de densitométrie est réalisée.

Tout d'abord, l'intensité de chaque bande est mesurée avec le logiciel Image J (*Macbiophotonics*) (Figure 27) puis ces valeurs sont normalisées par le bruit de fond de chaque blot. On obtient une valeur de bande $B = I_B/I_{BF}$ et une valeur de bande $C = I_C/I_{BF}$.



<u>Figure 27 : Exemple de mesure densitométrique d'un western blot</u> Les rectangles pointillés jaunes représentent les intensités mesurées. I_B : Intensité de la bande B ; I_C : Intensité de la bande C ; I_{BF} : Intensité du bruit de fond.

Un pourcentage de maturation est calculé pour chaque mutant en utilisant la formule :

C / (B+C)*100

Pour chaque profil de maturation de mutant, nous avons mis un contrôle wt. Il est donc par la suite déterminé un pourcentage de maturation de la protéine mutée normalisé par rapport à la valeur de pourcentage de maturation obtenu pour ce wt.

C. Localisation des protéines ; technique de microscopie

Afin de vérifier la localisation cellulaire de certains mutants, nous avons réalisé des images en microscopie confocale des cellules. Grâce à la fluorescence de l'EGFP, il n'a pas été nécessaire de recourir à l'utilisation d'anticorps pour détecter la localisation des protéines CFTR. Seule une sonde fluorescente se liant aux acides nucléiques a été utilisée pour visualiser le noyau des cellules : le TO-PRO®-3 iodide.

Matériels et Méthodes

a) Microscope confocale

Le système utilisé est un système confocal simple photon qui utilise une lumière d'excitation directement sur le fluorophore. La fluorescence émise provient de toute l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau laser.

L'observation est faite sur un système FV1000 *Olympus* comportant un microscope inversé à fluorescence (*Olympus* IX 81) équipé d'un objectif à immersion à eau (UplanSapo X 60, ouverture numérique de 1,2). Ce système propose cinq raies d'excitation dont l'intensité est contrôlée indépendamment par un modulateur optique. Le laser Argon délivre trois raies à 458, 488 et 514 nm alors que deux lasers Hélium-Néon délivrent les raies à 543 et 633 nm.

La détection des signaux fluorescents est assurée par deux détecteurs spectraux, dont la fenêtre de détection varie entre 500 et 700 nm, plus un détecteur équipé d'un filtre passe-haut pour la détection dans le rouge lointain.

L'acquisition des images ainsi que leur traitement est réalisé grâce au logiciel FV10-ASW (*Olympus*).

b) Protocole

Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre afin de pouvoir être observées sur la station de microscope confocal.

Les cellules sont rincées 2 fois une minute avec du TBS. Elles sont ensuite fixées 15 minutes avec de TBS-PAF (para-formaldéhyde) 3 %. Après trois lavages de 3 minutes au TBS, du TBS-triton 0,1 % est ajouté pour perméabiliser les cellules. Après trois lavages de 4 minutes au TBS, les cellules sont incubées 10 minutes avec du TOPRO-3 dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS. Pour finir les cellules sont rincées 3 fois 4 minutes au TBS.

L'EGFP est excité à 488 nm et émet à 507 nm. Le TOPRO-3 est excité à 640 nm et émet à 670 nm.

2. Techniques de physiolologie cellulaire

Après avoir étudiée la maturation des protéines étudiées, des études fonctionnelles sont réalisées. Des techniques d'électrophysiologie cellulaire (patch clamp) ou des études de sortie de flux sur populations cellulaires (efflux d'iodures). Dans les deux cas, ces techniques nous ont permis de conclure quant à la fonctionnalité des mutants et leur sensibilité à certaines drogues dont les composés MPB.

A. Mesure de courants transmembranaires : la technique de *patch-clamp*

Le passage d'ion à travers les membranes biologiques s'effectue notamment au niveau de pores protéique transmembranaires : les canaux ioniques.

Le *patch-clamp* est une technique de potentiel imposé qui permet la mesure et l'étude des variations de courant induits par les mouvements ioniques transmembranaires ainsi que l'étude du mode de régulation des canaux.

Cette technique a été mise au point et utilisée pour la première fois en 1976 par Neher et Sackman pour mesurer des courants ioniques activés par l'acétylcholine sur les fibres squelettique de grenouille (Neher and Sakmann, 1976). Le développement de ces enregistrements électrophysiologique leur a valu le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1992. Grace aux innovations technologiques telles que les amplificateurs de plus en plus puissants ou les systèmes de réduction du bruit électrique, la technique s'est vu améliorée au début des années 1980 (Hamill et al., 1981).

a) Principe

La technique consiste a réaliser un contact étanche entre une pipette de verre, d'un diamètre de l'ordre du micromètre, et la membrane plasmique d'une cellule. Ce contact étanche, appelé scellement ou seal en anglais, n'autorise aucun échange ionique entre la solution de bain et la solution contenue dans la pipette. Cette étanchéité permet d'isoler mécaniquement et électriquement une petite portion de la membrane appelée patch.

Lorsque la pipette entre en contact avec la membrane, on observe une légère augmentation de la résistance de seal (Rseal). Une légère dépression à l'intérieur de la pipette permet d'augmenter cette résistance jusqu'à des valeurs de 5 à 10 G Ω . Une forte valeur Rseal permet d'abaisser le bruit de fond du signal ainsi que la fuite de courant entre la pipette et la cellule (Rshunt).

A ce stade de l'expérimentation il est possible de choisir la configuration requise au type d'étude envisagé.

b) Les différentes configurations

Il est possible d'enregistrer les courants ioniques selon quatre configurations comme représenté sur la Figure 28, chaque configuration permettant d'étudier des paramètres différents.





La première configuration (A) résulte du scellement de la pipette avec la membrane cellulaire et l'obtention d'une résistance de seal de l'ordre du gigaohm (Rs >1 G Ω). Une portion de la membrane est piégée dans l'orifice de la pipette, on parle alors de configuration cellule attachée (cell attached). Cette configuration permet l'enregistrement de l'activité des canaux présents sous la pointe de la pipette, on parle d'enregistrement élémentaire de canaux. Dans cette configuration l'expérimentateur peut contrôler la composition du bain extracellulaire mais n'a pas accès au milieu intracellulaire.

Un retrait rapide de la pipette permet de passer à la configuration cellule excisée (inside out) (D). Cette conformation permet également l'enregistrement des canaux piégés sous la pipette. Dans ce cas, la face interne de la membrane se situe à l'extérieur, le milieu de bain devient alors le milieu intracellulaire ce qui permet à l'expérimentateur de pouvoir mimer des variations et régulations intracellulaires.

A partir de la configuration cellule attachée, l'application d'une dépression supplémentaire à l'intérieur de la pipette permet la rupture de la portion de membrane piégée sous la pointe. On obtient la configuration cellule entière (whole cell) (B). La rupture du fragment membranaire permet la communication entre le milieu intracellulaire et le milieu intrapipette, ce dernier remplaçant petit à petit le milieu interne par phénomène de diffusion. Cette configuration permet l'enregistrement de l'activité de la totalité des canaux membranaires.

La dernière configuration (C) s'obtient après l'obtention de la configuration cellule entière. En effet, un retrait de la pipette permet d'obtenir la configuration membrane inversée (outside-out). Dans ce cas, un morceau de membrane se détache et se referme en vésicule dont la face externe est exposée au milieu extracellulaire et la face interne au milieu intrapipette.

Dans cette étude, pour mettre en évidence l'impact des mutations sur l'activité et la pharmacologie du canal CFTR, la configuration cellule entière a été utilisée. La suite de ce chapitre traitera donc de cette configuration.
c) Schéma électrique de la configuration cellule entière.

Les principaux éléments constituant le circuit électrique correspondant à cette configuration comprennent (Figure 29) :

- la résistance de seal, Rseal, comprise entre 5 et 10 G Ω .

- les résistances séries, Rs, correspondant à la somme : résistance d'accès (Ra) de la cellule, liée au milieu intracellulaire + résistance de la pipette (Rp). Ces résistances sont généralement faibles, de 3 à 10 M Ω . (Rs = Ra + Rp).

- la résistance membranaire, Rm, variable selon le type cellulaire étudié.

- la capacité membranaire, Cm, qui varie selon les dimensions de la cellule.



Figure 29 : Diagramme d'une partie du circuit électrique de la configuration cellule entière Rseal : Résistance de seal ; Rs : Resistance séries ; Rm : Résistance membranaire ; Cm : Capacité membranaire Modifié d'après *http://www.patch-clamp.info*

Si l'on accepte que Rseal est très supérieur à Rs et Rm, on peut considérer que l'essentiel du courant passe dans la branche du circuit RS et RM/Cm. Lorsque l'on établit un saut de potentiel, le courant capacitatif va progressivement diminuer (décroissance exponentielle) avec une constante de temps τ tel que $\tau = \text{Rs/Cm}$.

Etant donné que τ dépend de Rs, une trop forte valeur de résistance série va considérablement allonger la durée de la charge capacitative membranaire, interdisant

l'enregistrement des courants en potentiel imposé, puisque la différence de potentiel ne serait pas établie durant cette durée.

Par ailleurs, lorsqu'un courant se développe au niveau de la membrane, il génère une chute de potentiel aux bornes de la résistance série. Ainsi Rs introduit une erreur de potentiel ΔV , proportionnelle à l'amplitude du courant mesuré.

Il est mesuré : $\Delta V = Vi - Vm = Rs.Imax$

Avec : Vi : potentiel imposé (mV) ; Vm : potentiel membranaire (mV) ; Imax : amplitude maximale du courant (pA) ; Rs : Résistance série (Ω)

La valeur de ΔV est négative dans le cas d'un courant sortant et positive pour un courant entrant.

En plus des résistances, Rs, Rseal et Rm, le circuit électrique de la configuration comporte un dernier élément : la capacité membranaire.

En effet par application d'un saut de potentiel à la membrane, deux pics de courants d'amplitude et de durée variable se produisent sur l'enregistrement (Figure 30). Il s'agit de courants capacitatifs qui résultent de la charge et la décharge des deux structures qui se comportent comme des condensateurs : la membrane cellulaire et la paroi de verre de la microélectrode. Lors d'expériences en configuration cellule entière, cette dernière est négligeable comparée à celle de la membrane. De plus elle est facilement compensée à l'aide de l'amplificateur. La surface du courant représente la quantité de charge (ΔQ) déplacées pendant l'imposition du potentiel ΔV . La capacité membranaire peut être calculée en intégrant la surface sous le pic du courant capacitatif, elle équivaut à :

 $Cm = \Delta Q/\Delta V$ avec Cm en picofarads (pF) et ΔV en mV

La capacité membranaire reflète la dimension de la cellule et servira à normaliser les courants enregistrés afin de pouvoir comparer les expériences entre elles en s'affranchissant de la taille de la cellule, on parlera alors de densités de courant en pA/pF.



Figure 30 : Illustration des courants capacitatifs transitoires d'une cellule HEK-293 soumise à une tension de 10 mV

d) Dispositif expérimental

Afin d'enregistrer les courants ioniques induits par les canaux présents à la membrane de la cellule, il convient d'avoir un dispositif expérimental approprié pour amplifier les courants de l'ordre du pA mais aussi imposer de faibles voltages à la membrane.

o Microscope

Le microscope utilisé pour visualiser les cellules et réaliser l'approche pipette est un microscope inversé *Olympus* CKX41. Afin de repérer les cellules transfectées avec le plasmide EGFP-CFTR, le microscope est couplé à un système de fluorescence équipé d'une lampe au mercure HBO 50W.

o Amplificateur

L'amplificateur utilisé est un modèle EPC-7 (*ListElectronic*). Il permet la conversion du courant enregistré en tension par l'intermédiaire d'un convertisseur courant/tension.

L'amplificateur est utilisé pour :

- imposer un potentiel à la membrane cellulaire via la pipette de patch.

- corriger le potentiel de jonction qui s'établit entre le liquide intrapipette et le milieu extracellulaire. Cette différence de potentiel est compensée juste avant la formation du *seal* grâce au bouton « offset ».

- compenser les courants capacitatifs via le bouton « c-fast ».

- compenser en partie les résistances séries.

• Système d'acquisition (digidata/PC)

L'amplificateur est relié à un ordinateur (PC) qui permet de contrôler les potentiels imposés à la membrane et d'enregistrer les courants qui en résultent. Pour cela, il est placé entre l'amplificateur et le PC un tableau de conversion analogique numérique-analogique (interface Digidata 1200, *Axon Instruments*).

Ce système PC/digidata permet la stimulation de la préparation grâce au logiciel pClamp 6.3 (module Clampex), le stockage des signaux et l'analyse des courants enregistrés grâce au module Clampfit du logiciel pClamp 9.0.

• Pipettes d'enregistrement

Les micropipettes sont réalisées à partir de capillaires en verre de borosilicate (ref : GC 150 TF-10, *Clark Electromedical Instrument*) étirés en deux temps à l'aide d'une étireuse verticale (*Narishige*, Japon). Les pipettes sont remplies, au travers d'un filtre 0,2 μ M, avec du milieu intrapipette mimant le milieu intracellulaire physiologique. Elles sont ensuite montées sur un portoir relié au convertisseur courant tension de la tête de l'amplificateur par l'intermédiaire d'un filament Ag/AgCl. Le potentiel est appliqué entre le fil d'Ag/AgCl plongé dans le milieu intrapipette et une électrode de référence (pastille d'Ag/AgCl) plongée dans le bain extracellulaire. La résistance des pipettes est comprise entre 3 et 5 MΩ.

o Solutions

Deux solutions sont utilisées lors des expériences de patch-clamp en configuration cellule entière : une solution mimant le milieu extracellulaire (bain) et une solution mimant le milieu intracellulaire (intrapipette).

Composants	Concentration en mM
NaCl	145
CsCl	4
$MgCl_2$	1
CaCl ₂	1
Glucose	10
TES	10

Milieu extracellulaire :

Le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH, l'osmolarité est ajusté à 315 ± 5 mOsmol avec du mannitol.

Composants	Concentration en mM		
L-aspartic acid	113		
CsOH	113		
CsCl	27		
NaCl	1		
$MgCl_2$	1		
EGTA	1		
TES	10		

<u>Milieu intracellulaire :</u>

Le pH est ajusté à 7,2 avec du CsOH, l'osmolarité est ajusté à 285 \pm 5 mOsmol avec du mannitol.

Afin d'éviter la perte d'activité du canal CFTR lors des enregistrements, il est ajouté 3 mM de sels de MgATP extemporanément.

Les milieux utilisés ne contiennent pas de potassium qui est remplacé par du césium. En effet, le césium n'est pas perméable au travers des canaux potassiques ce qui permet de s'affranchir des conductances potassique (Adelman, Jr. and French, 1978).

Selon l'équation de Nernst le potentiel d'équilibre des ions chlorure (E_{Cl} -) peut se calculer de la façon suivante :

```
E_{Cl} = RT/nF * ln ([Cl]_{ext}/[Cl]_{int})
```

Avec :

R : constante des gaz parfaits : 8 ,31 J.mol⁻¹.K⁻¹ T : Température en Kelvin n : valence de l'ion. Ici n = -1 F : constante de Faraday : 96 485 C \cdot mol⁻¹ = 1 F [Cl⁻]_{ext} & [Cl⁻]_{int} : concentrations en ions chlorure externe et interne

Avec ce milieu le potentiel d'équilibre des ions chlorure est E_{Cl} = -41,18 mV

e) Méthodes d'analyse

Afin de comparer les courants obtenus, nous procédons à différentes analyses.

Tout d'abord, le courant est normalisé par la capacité membranaire de la cellule. On parle alors de densité de courant.

Les valeurs de densité de courant sont reportées en fonction du voltage, on obtient alors une courbe courant-tension (IV) (Figure 31).



Figure 31 : Exemple de courbe IV en conditions basale et activée pour le CFTR-wt Les données sont représentées sous la forme moyenne ± S.E.M.

Comme on peut le remarquer sur la Figure 31, les courbes obtenues sont d'aspect linéaire. Afin de pouvoir comparer les densités de courant de manière globale et non à un seul potentiel, une régression linéaire est appliquée à chaque courbe IV, permettant de calculer la pente de chaque courbe. Ce sont ces valeurs de pente qui seront comparées.

Pour finir, afin de comparer les cinétiques d'activation de chaque mutant, nous avons calculé les T_{50} , correspondant aux temps mis pour obtenir 50 % de l'activation maximale. La détermination de la valeur de T50 est illustrée Figure 32.



Figure 32 : Exemple de courbe d'activation en fonction du temps – détermination du T_{50}

B. Efflux d'iodure

Afin de tester la sensibilité des mutants au MPBs, ou encore pour réaliser leurs profils pharmacologiques, la technique d'efflux d'iodure a été utilisée.

a) Généralités

Cette technique d'efflux permet d'interroger une population de cellules. Elle permet grâce à l'utilisation d'un isotope radioactif d'explorer la fonctionnalité des canaux chlorure.

Il a été montré que pour l'exploration de cette fonctionnalité, l'iodure possédait de nombreux avantages comparé au chlorure (Venglarik et al., 1990). De ce fait, cet isotope a été préférentiellement choisi comme traceur du transport d'ions chlorure.

Les avantages majeurs de l'iodure, mis en évidence dans l'étude de Venglarik sont les suivants (Venglarik et al., 1990) :

- La plupart des membres de la famille des canaux chlorure ont une sélectivité pour l'iodure supérieure à leur sélectivité aux ions chlorure.

- Les constantes de sortie de l'iodure permettent une bonne estimation de l'efflux de chlorure.

- La $\frac{1}{2}$ vie de l'iode est beaucoup plus faible que celle du chlorure (respectivement : 30 jours contre 300000 ans).

- L'iodure a un coût 10 fois moindre que le chlorure.

Toutes ces caractéristiques font de l'iodure un traceur de l'activité des canaux chlorure efficace et facile d'utilisation.

Dans cette étude la technique a permis d'étudier l'efflux d'iodure induit par des agents pharmacologiques au travers du CFTR.

b) Principe de la méthode

Cette technique repose sur la mesure des changements de concentrations en radiotraceur de part et d'autre de la membrane cellulaire.

Le radioélément est placé en petites quantités (traces) dans le compartiment extracellulaire avec addition de milieu non radioactif dit « froid ». Ici on fait un mélange de ¹²⁵INa radioactif et de KI froid. Le traceur finit par s'équilibrer de part et d'autre de la membrane.

L'activité du canal CFTR est déterminée par mesure des rayonnements γ , détectés par voie externe avant et après ajout de drogue.

c) Protocole expérimental

Nous avons réalisé, durant ce travail, à la fois des efflux manuels et des efflux robotisés. Le principe et le protocole étant le même, l'aspect expérimental ne fait l'objet que d'une seule partie.

Les cellules sont cultivées en plaque 24 puits. Après un rinçage au milieu d'efflux, elles sont incubées avec du milieu de charge composé de milieu d'efflux et de ¹²⁵INa (1 μ Ci/ml, NEN Life Sciences). L'incubation est faite à 37° pendant 1 heure.

Après cette période d'incubation les cellules sont rincées avec la solution d'efflux, afin d'éliminer la radioactivité non incorporée, puis mise en présence de 500 µl de milieu d'efflux.

Toutes les minutes le surnageant est prélevé, placé dans un tube à hémolyse et remplacé par 500 μ l de milieu « propre ». On réitère cette opération 8 fois (cinétique sur 8 minutes). Une fois tous les surnageants collectés, la radioactivité présente dans chaque tubes est déterminé par un compteur γ (Cobra II, Packard).

A la fin de l'expérience, les cellules sont lysées par ajout de 500µl de NaOH 0,1 M + SDS 0,1 %. Après une incubation de 30 minutes minimum, les 500 µl sont prélevés et la radioactivité mesurée représente la radioactivité résiduelle.

Ce protocole est donc réalisé manuellement ou automatiquement grâce au système MultiPROBEII®, *perkin elmer*.

Composants	Concentration en mM		
NaCl	136,9		
KCl	5,4		
KH_2PO_4	0,3		
NaH ₂ PO ₄	0,3		
NaHCO ₃	4,2		
CaCl ₂	1,3		
$MgCl_2$	0,5		
$MgSO_4$	0,4		
HEPES	10		
D-Glucose	5,6		

Milieu d'efflux utilisé :

Le pH est ajusté à 7,5 par ajout de NaOH.

Pour éviter la précipitation des sels, le CaCl₂ est ajouté extemporanément.

d) Méthode d'analyse

Les résultats obtenus par cette technique d'efflux d'iodure peuvent être représentés sous forme de vitesse de sortie « k » du radioélément. On utilise la formule suivante :

$\mathbf{k} = (\ln X_1 - X_2) / (t_1 - t_2) \text{ en min}^{-1}$

X1 et X2: radioactivité en coup par minute (cpm) mesurées aux temps successifs t1 et t2

Pour comparer l'effet de différents agonistes ou les différences d'activation de plusieurs mutants, les résultats sont traités en taux relatif (*relative rates* ou RR) en utilisant la formule :

$\mathbf{RR} = \mathbf{k}_{\text{pic}} - \mathbf{k}_{\text{basal}} (\text{en min}^{-1})$

k_{pic} : vitesse de sortie maximale

k_{basal} : vitesse de sortie en condition basale avant l'ajout de drogue



Figure 33 : Exemple de représentations obtenues avec la technique d'efflux d'iodure A. Traces représentatives de la sortie d'I¹²⁵ à l'ajout d'une drogue activatrice de CFTR. B. Taux relatifs (RR) correspondants montrant la différence d'activation entre CFTR sauvage et mutant.

Les résultats obtenus avec cette technique peuvent varier avec la densité de cellules dans les puits ou le taux de radioactivité. Afin de pouvoir comparer les données issues de manipulations différentes, nous avons choisi de normaliser les valeurs. Pour ce faire, chaque test est réalisé avec une piste transfectée avec du CFTR-wt. Les réponses obtenues pour chaque mutant sont alors normalisées par rapport à la réponse du wt de la même expérience.

Résultats et discussions

Les résultats sont présentés sous la forme de trois chapitres. Les deux premiers résument les résultats obtenus par l'exploration de l'extrémité C-terminale du NBD1 et de son environnement moléculaire. Le troisième chapitre traite les résultats concernant l'exploration d'une entrée cytoplasmique putative du pore mise en évidence par exploitation du modèle structural 3D de CFTR réalisé par l'équipe du Dr Callebaut.

Chapitre I: Exploration de l'extrémité Cterminale du NBD1

I. La glycine 622 et son environnement moléculaire

Cette étude a débuté suite à des travaux antérieurs de l'équipe montrant une absence d'effet correcteur des composés benzo[*c*]quinolizinium (les MPB) pour le mutant G622D (Norez et al., 2008). Nous avons alors cherché si cet aspect réfractaire était également observé vis-à-vis de l'effet activateur des MPB et si le cas échéant, l'environnement de ce résidu participait au site d'interaction des MPB avec le CFTR.

Cet acide aminé est situé à l'extrémité C-terminale du NBD1. Il apparaît très conservé au sein des espèces et des transporteurs ABC (Figure 34).



Figure 34 : Alignement des séquences des NBD de CFTR et de plusieurs transporteurs ABC
 A. Topologie générale du CFTR, la zone d'étude est encadrée en rouge. B. et C. Alignement de séquence de la zone d'étude. Les résidus identiques dans la plupart des séquences sont indiqués sur fond noir. Les résidus mutés chez des patients CF sont indiqués sur fond vert ou jaune. La structure secondaire prédite est représentée sous les alignements. D'après Callebaut et al., 2004

Comme on peut le voir sur la Figure 34, la glycine G622 fait partie de la dernière structure en épingle à cheveux (β *hairpin*) du NBD1. En observant la structure secondaire de cette région on s'aperçoit que cet acide aminé est l'un des résidus participant à la boucle courte reliant les deux brins β (Figure 35).



Figure 35 : Représentation schématique de la β hairpin étudiée

Les flèches représentent les liaisons hydrogènes formées entre deux acides aminés. Les acides aminés mutés dans ce travail sont indiqués en jaune.

Nous avons donc étudié l'effet de mutation de plusieurs résidus de cette β *hairpin* sur la maturation de la protéine, la fonctionnalité du canal puis sur sa susceptibilité aux MPB.

Parmi les mutations étudiées, trois sont des mutations retrouvées chez des patients CF : H620Q, G622D et G628R. Les autres mutations sont des mutations de travail : E621G, S623A et S624A.

L'article suivant montre les principaux résultats de cette exploration moléculaire. La vérification de l'expression et de la maturation des mutants de CFTR a été réalisée par la technique de Western blot, l'étude fonctionnelle par les techniques de patch clamp en configuration cellule entière et d'efflux d'iodure.

II. Résultats

<u>1. Article scientifique</u>

Cet article a été publié en 2010 dans The Journal of Biological Chemistry.

Supplemental data

Table 1

Sequences of site-directed mutagenesis primers.

Mutation	Primer sequence $(5' \rightarrow 3')$
H620Q	GCTGACAAAATATTAATTTTGCAGGAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGG
E621G	CTGACAAAATATTAATTTTGCATGGAGGTAGCAGCTATTTTTATGGGAC
G622D	AATTTTGCATGAAGATAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAG
S623A	CAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTGCCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAG
S624A	CAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGC GC CTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACTC
G628R	GCATGAAGGTAGCAGCTATTTTTATCGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCT

Table 2

Mean CI current densities recorded at + 40mV in basal condition, in presence of 10 μM Fsk or 10 μM Fsk + 10 μM CFTR_{inh}-172

	Basal		Fsk 10µM		+ Inh172 10µM		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Ν
wt	6,37	2,16	82,31	9,77	23,07	3,70	8
E621G	8,25	1,56	84,21	10,11	19,11	4,31	10
S624A	3,47	0,76	81,80	7,72	12,35	2,87	7
H620Q	5,41	1,54	124,68	19,42	23,56	6,70	8
S623A	4,05	0,76	142,85	16,79	14,49	3,54	10
G622D	5,09	1,19	36,54	4,50	9,07	1,69	8
G628R	3,96	1,29	19,97	3,50	1,89	0,39	5

Table 3

Mean Cl⁻ current densities recorded at + 40mV in basal condition, in presence of 50 μ M MPB-91 or 50 μ M MPB-91 + 10 μ M CFTR_{inh}-172

	Basal		MPB-91 50µM		+ Inh172 10µM		
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Ν
wt	3,52	0,94	31,54	4,69	4,00	1,31	6
E621G	5,59	1,97	47,00	6,65	7,76	2,22	8
S624A	5,70	1,68	36,53	5,08	8,97	2,22	6
H620Q	3,70	1,90	27,86	4,20	5,68	0,83	5
S623A	5,21	0,96	30,83	3,44	9,58	2,38	5
G622D	3,52	1,08	4,95	2,34			7
G628R	4,26	1,57	3,15	0,92			5

2. Résumé des principaux résultats

Dans cet article, nous avons montré que l'extrémité C-terminale du NBD1 influence :

l'adressage de la protéine CFTR : diminution de 60 % du trafic pour le mutant
 G622D et de plus de 80 % pour le mutant G628R comparée à l'adressage de la protéine sauvage (données de densitométrie non montrées).

- l'activité du canal : augmentation de la densité de courant d'environ 70 % pour les mutants H620Q et S623A.

 l'effet pharmacologique des composés MPB : pas de réponse aux composés pour les mutants G622D et G628R et une réponse légèrement augmentée pour la protéine CFTR-E621G comparé à la réponse de la protéine sauvage.

3. Résultats complémentaires

A. Expériences complémentaires sur H620

Dans le but de comprendre la modification d'activité du canal lorsque le résidu H620 est muté, d'autres expériences ont été réalisées.

a) Détermination des EC₅₀ de la Fsk pour le mutant CFTR-H620Q et la protéine sauvage CFTR-wt

L'augmentation de densité de courant observée pour le mutant H620Q pourrait venir d'une plus grande sensibilité à l'AMPc. Afin de tester cette hypothèse, les EC_{50} Fsk pour le mutant et la protéine sauvage ont été déterminées par deux techniques : en patch clamp configuration cellule entière et en efflux d'iodure (Figure 36).



*Figure 36 : Détermination de l'EC*₅₀ *de la Fsk pour les protéines sauvage et H620Q* **A. & B.** Courbes doses-réponses de la Fsk sur les protéines wt et H620Q. Courbes obtenues par la technique de patch clamp cellule entière (A.) ou par efflux d'iodure (B.). C. tableau récapitulatif des valeurs obtenues.

Les EC_{50} des deux protéines pour la Fsk ne présentent pas de différence significative. Il est à noter que la différence de valeurs entre les deux types d'expériences provient sans doute du faible nombre d'expériences pour les efflux d'iodure. En effet l'expérience n'a été réalisée une seule fois (sur 4 puits par concentrations de Fsk) et nécessiterait une nouvelle itération pour que les résultats soient affinés.

Cependant au vu des résultats le mutant H620Q ne semble pas avoir de sensibilité accrue à la forskoline.

b) Effet d'autres mutations de l'histidine 620

Deux autres mutations du résidu 620 ont été testées : H620R et H620D

Pour ces mutants la maturation des protéines, l'activité chlorure et la sensibilité aux MPB ont été testés.

o Étude de la maturation

L'étude de la maturation des mutants a été faite par Western blot. Les résultats sont présentés ci après :



Figure 37 : Etude de la maturation des mutants H620

A. Exemple de western blot obtenus avec un anticorps anti-CFTR. B. Récapitulatif de la densitométrie réalisée à partir des Western blot. Les valeurs sont normalisées par rapport à la protéine sauvage (wt=100%). Les données présentées sont des moyennes normalisées ± S.E.M. ns : non significatif ; *** p<0,001 (ANOVA – Tukey)

La substitution de l'histidine 620 par une arginine ou un acide aspartique n'influence pas la maturation de la protéine. Les mêmes valeurs que pour la protéine sauvage ou le mutant H620Q sont obtenues.

• Étude de la fonctionnalité

La fonctionnalité des deux mutants a été étudiée par la technique de patch clamp en présence de Fsk (Figure 38).



Figure 38 : Caractérisation fonctionnelle des mutants H620R et H620D
 A. Traces représentatives des courants portés par les protéines CFTR-wt -H620R et -H620D, en condition basale, en présence de 10 μM Fsk ou de 10 μM Fsk + 10 μM CFTR_{inh}-172.
 B. Courbe courant/tension correspondante pour les mutants H620R (n=9) et H620D (n=6). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± S.E.M.

Les deux mutants présentent les caractéristiques du wt-CFTR : pas de dépendance au temps ni au voltage, un potentiel d'équilibre de -40 mV, soit le même que le potentiel d'équilibre électrochimique théorique des ions chlorure (ECl⁻) dans nos conditions d'enregistrement et un courant totalement inhibé par l'inhibiteur spécifique de CFTR le CFTR_{inh}-172.

En revanche, ils présentent des densités de courant différentes. Alors que le mutant CFTR-H620D présente une conductance globale similaire à celle du wt (respectivement à +100 mV 236 \pm 28 pA/pF n=6 et 211 \pm 29 pA/pF n=14), le mutant CFTR-H620R présente une densité de courant analogue à celle du mutant CFTR-H620Q (respectivement à +100 mV 367 \pm 24 pA/pF n=9 et 355 \pm 38 pA/pF n=8)

La comparaison des pentes des courbes IV confirme ces différences d'activation (Figure 39) :



Figure 39 : Comparaison des pentes des courbes IV en présence de Fsk La ligne pointillée représente le niveau du wt-CFTR. Les données sont présentées sous la forme moyenne ± S.E.M. ns : non significatif ; *** : p<0,001 (ANOVA Tukey) ; les indications au dessus de chaque moyenne correspondant à la comparaison avec la protéine wt.

Les deux mutants H620R et H620D sont donc fonctionnels mais H620R présente une densité de courant augmentée de 70 % par rapport au wt alors que H620D supporte une densité de courant similaire au wt.

Concernant la cinétique d'activation, nous avons montré que H620Q présentait une activation plus rapide que le wt (T_{50} , Figure 5. B. de l'article). Comme on peut le voir sur la Figure 40, il en est de même pour le mutant « hyperactif » H620R qui présente une diminution de son T_{50} . En revanche, le mutant H620D présente la même cinétique d'activation que le canal non muté.



Figure 40 : Analyse des cinétiques d'activation des mutants H620

Histogramme représentant le temps moyen, en seconde (T_{50}) mis pour atteindre 50 % d'activation. Les données sont présentées sous la forme moyenne ± S.E.M. ns : non significatif ; * : p<0,05 comparé au wt (Student t-test)

o Étude de l'effet du MPB-91

La susceptibilité des mutants aux MPB a été testée par la technique d'efflux d'iodure. Le MPB-91 a été utilisé à 250 μ M et au moins deux expériences différentes ont été réalisées par mutant.

La figure suivante présente la réponse des mutants de l'histidine 620 au MPB-91.



<u>Figure 41 : Récapitulatif des réponses maximales des mutants H620 au MPB-91</u> La ligne pointillée représente la réponse des protéines wt à une stimulation de 250 μ M de MPB-91. ns : non significatif (ANOVA-Tukey). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne normalisée ± S.E.M, n=2 séries de 4 tests ns : non significatif (ANOVA-Tukey)

Les mutants CFTR-H620R et -H620D ne sont pas réfractaires aux composés MPB et ont une amplitude de réponse similaire à celle de la protéine sauvage.

B. Expériences complémentaires sur G622D

Dans l'article, ce mutant est montré réfractaire vis-à-vis de MPB mais sensible à tous les activateurs testés (Gst, xanthines, dérivé pyrrolopyrazine). De plus, nous avons vu que ce mutant n'était pas réfractaire à l'inhibiteur utilisé dans cette étude : l'inhibiteur CFTR_{inh}-172. Nous avons donc testé deux autres inhibiteurs sélectifs pour CFTR : le GlyH₁₀₁ (Muanprasat et al., 2004) et le GPinh5a (Routaboul et al., 2007). Le premier a été testé par la technique d'efflux d'iodure (Figure 42), le deuxième en patch clamp (Figure 43).



<u>Figure 42 : Effet de l'inhibiteur GlyH₁₀₁ sur le mutant G622D</u> L'inhibiteur est testé en présence de 10 μ M de Fsk + 30 μ M de Gst. Les données sont présentées sous la forme moyenne ± S.E.M.. *** : p<0,001

L'activation du mutant CFTR-G622D induite par la une stimulation Fsk/Gst est totalement inhibée par le GlyH₁₀₁.



Figure 43 : Effet de l'inhibiteur GPinh5a sur le mutant G622D

L'inhibiteur est testé en présence de 10 µM de Fsk. La courbe de *gauche* correspond à la moyenne des courbes IV enregistrées (moyenne ± S.E.M. n=5). La courbe de *droite* représente l'évolution de la densité de courant à +40 mV.

L'activation du mutant CFTR-G622D induite par une stimulation AMPc dépendante est totalement inhibée par le GPinh5a. De plus, la cinétique d'inhibition ne présente aucune anomalie (Figure 43 *droite*)

Le mutant CFTR-G622D n'est donc pas réfractaire à l'inhibiteur GlyH101 au GPinh5a.

III. Discussion

Dans cette étude nous avons montré que des modifications de la structure de l'extrémité C-terminale du NBD1 avaient des répercussions sur l'adressage de la protéine et sur l'activation du canal CFTR.

1. Implication de l'extrémité C-terminale dans l'adressage de CFTR

La mutation des deux glycines présentes dans cette région conduit à une diminution de l'adressage des protéines CFTR-G622D et CFTR-G628R. D'un point de vue structural (voir Figure 1 de l'article) la glycine 622 fait partie du « coude » reliant les deux brins β , l'ensemble étant situé à l'interface NBD1/NBD2 (Callebaut et al., 2004). Son remplacement par un acide aspartique, résidu deux fois plus gros provoquerait une gêne induisant une perturbation de la structure locale avec notamment un changement de l'orientation des brins β 5 et 6 et une gêne dans la formation de l'hétérodimère NBD1/NBD2.

La glycine 628 quant à elle est située plus profondément dans le NBD1 à l'extrémité du dernier brin β du NBD1, juste avant la dernière hélice α . Dans ce cas la substitution de la glycine par une arginine possédant une longue chaîne latérale conduirait à un encombrement stérique avec la dernière hélice entraînant un mauvais repliement de la protéine et vraisemblablement sa rétention dans le RE.

L'intégrité de la structure de la région C-terminale du NBD1 apparaît donc essentielle à une maturation correcte de la protéine et donc à son bon adressage. Il est d'ailleurs retrouvé d'autres mutations CF dans cette région du NBD1, empêchant un adressage correct de la protéine. C'est le cas notamment de la mutation CF H620P qui

présente un adressage défectueux (Vankeerberghen et al., 1998). Pour ce dernier résidu, nous avons vu que la mutation de l'histidine en glutamine, arginine ou aspartate ne modifiait pas la maturation de la protéine (voir Figure 37). En revanche, la mutation de ce résidu en proline conduit à une absence de CFTR mature à la membrane. La proline est un acide aminé qui possède une fonction amine secondaire empêchant la formation de liaison hydrogène. L'introduction d'un tel résidu dans la β *hairpin* préviendrait la formation de la liaison hydrogène entre H620 et S623, déstabilisant la structure du feuillet β et par conséquent entraînant un mauvais repliement du NBD1.

2. Implication de l'extrémité C-terminale dans la régulation de l'activité de CFTR

Nous avons observé que malgré la correction pharmacologique de l'adressage des deux mutants G622D et G628R leur niveau d'activité présentait une densité de courant plus faible par rapport au wt (Figure 4. A de l'article).

De plus des études électrophysiologiques de CFTR-G622D, exprimé dans un système d'ovocyte de Xénope, montrent une probabilité d'ouverture plus faible que le canal wt (Vankeerberghen et al., 1998) sans changer sa conductance unitaire (Figure 44).

Ces derniers éléments confirment donc l'implication de l'extrémité C-terminale du NBD1 dans la régulation de l'activité du canal.

De plus, nous avons montré une hyperactivation du canal lorsque les résidus situés de part et d'autre du « coude » de la β *hairpin* étaient mutés (H620Q et S623A). Cette activation augmentée ne provient pas d'une sensibilité accrue à la forskoline puisque les valeurs des EC₅₀ du mutant H620Q et du canal wt non muté ne sont pas significativement différentes. Or la Fsk active le canal CFTR par augmentation de l'AMPc intracellulaire conduisant à l'activation des PKA. L'augmentation de courant enregistrée ne serait donc pas due à un dérèglement des processus de phosphorylation (meilleur accès aux sites de phosphorylation ou plus grande sensibilité aux PKA par exemple).

Une étude électrophysiologique en canal unitaire sur le mutant H620Q a déjà été réalisée. Elle montre une augmentation de la probabilité d'ouverture (Po) du mutant H620Q sans modification de la conductance unitaire (Vankeerberghen et al., 1998) (Figure 44).



Figure 44 : Résultats de patch clamp en canal unitaire des mutants H620Q et G622D
Probabilité d'ouverture (A.) et conductance unitaire (B.) mesurées en configuration cellule attachée à un potentiel de -60 mV avec un potentiel d'équilibre de 0 mV. Les canaux sont activés avec un cocktail 1 μM IBMX + 0,1 μM Fsk. * : p<0,05</p>
D'après Vankeerberghen et al., 1998

Ces résultats indiquent que l'extrémité C-terminale a une influence sur la régulation du *gating* du canal mais pas sur sa perméabilité. Cette augmentation de Po explique également l'augmentation de la densité de courant enregistrée en patch clamp configuration cellule entière.

De plus, le remplacement de l'histidine 620 par une arginine (H620R) a les mêmes conséquences que la mutation H620Q (densité de courant augmentée, temps d'activation diminué) alors que sa substitution par un acide aspartique (H620D), ne modifie pas les propriétés du courant chlorure porté par CFTR. Au vu des propriétés des acides aminés concernés, il ne semble pas que ces modifications proviennent de la charge ou de la polarité des résidus. En revanche au regard du modèle en 3 dimensions de CFTR, on s'aperçoit que H620 est en contact avec la sérine 459, résidu du motif Walker A du NBD1 participant au site A non canonique (voir Figure 1.B. de l'article). Or l'histidine et l'acide aspartique possèdent des chaînes latérales assez courtes alors que l'arginine et la glutamine possèdent des chaînes latérales plus longues, les substitutions H620Q et H620R perturberaient donc ce contact entre la β hairpin et le site non canonique.

Cette perturbation induirait un trouble de la régulation du *gating* du canal via le site non canonique des NBD. Afin d'approfondir le rôle de cette interaction, une étude de S459 sera réalisée par la suite.

3. Implication de l'extrémité C-terminale dans le mécanisme d'action des composés benzo[c]quinolizinium

Dans notre étude nous montrons que les mutants G622D et G628R sont réfractaires à l'action des MPB. En effet en présence ou non d'agent correcteur de l'adressage du CFTR, le canal n'est jamais activé par les MPB même lorsque le domaine R est préalablement phosphorylé. Ces résultats montrent que l'intégrité de la structure de l'extrémité C-terminale du NBD1 est indispensable à l'action des composés MPB. En revanche les changements drastiques de structures causés par les mutations G622D et G628R ne permettent pas de conclure sur le site exact de fixation des composés MPB. Cependant, au vu des résultats qui montrent un aspect réfractaire uniquement pour les composés MPB, on peut conclure que ce site est situé dans le voisinage de l'extrémité C-terminale.

De plus, l'aspect réfractaire du mutant G622D aux MPB à la fois pour l'activation (cette étude) et pour l'effet correcteur (Norez et al., 2008) supporte l'hypothèse d'un seul et unique site d'action des composés MPB pour les deux effets. De plus, les conséquences de la mutation des résidus de l'extrémité C-terminale sur l'adressage et/ou l'activation soutiennent cette hypothèse d'un site unique d'action.

Cette étude apporte tout de même quelques précisions sur le mode d'action des composés MPB :

Tout d'abord, contrairement à l'activation AMPc dépendante, en présence de MPB, il n'y a pas de différence d'activation entre le CFTR-wt et les mutants CFTR-H620Q et -S623A. Ces résultats suggèrent un mode d'action des MPB différent de la voie AMPc dépendante classique avec phosphorylation du domaine R puis fixation et hydrolyse d'ATP sur les domaines NBD.

Ensuite, nous avons observé une activation par les MPB plus importante pour les canaux CFTR-E621G comparé aux canaux CFTR-wt. Or l'acide glutamique 621, premier résidu de la « courbe » de la β *hairpin* est situé en périphérie du dimère NBD1/NBD2 lorsque
le canal est en configuration ouvert. La mutation d'un acide glutamique en glycine, résidu de plus petite taille, favoriserait l'accessibilité d'une molécule à ce niveau.

De plus dans la configuration fermée, E621 serait en contact avec l'arginine R1245, résidu situé dans le motif Walker A du NBD2. Or il a été montré que la dimérisation des domaines NBD constituait la première étape dans l'ouverture du canal et que cette dimérisation était renforcé par la fixation d'ATP sur les domaines Walker des NBD1 et 2 (Jones et al., 2002; Callebaut et al., 2004; Vergani et al., 2005b).

La mutation E621G pourrait perturber cette liaison E621-R1245 et ainsi renforcer l'effet des MPB en facilitant la dimérisation des deux NBD ou en consolidant le dimère NBD1/NBD2 facilitant ainsi le passage de la forme fermé à la forme ouverte du canal.

Afin de progresser dans la compréhension du mécanisme d'action des MPB mais aussi de comprendre comment l'extrémité C-terminale du NBD1 influence l'adressage et l'activation des canaux CFTR, nous avons étudié les interactions que pouvait avoir la β *hairpin* avec d'autres domaines de la protéine.

<u>Chapitre II. Exploration de l'environnement</u> <u>moléculaire de l'extrémité C-terminale du</u> <u>NBD1</u>

Une analyse structurale a été réalisée en collaboration avec le laboratoire du Dr Callebaut. En effet, nous avons cherché les interactions ou les proximités entre les résidus de l'extrémité C-terminale du NBD1 et d'autres domaines du CFTR.

Nous avons mis en évidence plusieurs résidus qui interagiraient directement ou non avec des résidus de l'extrémité C-terminale du NBD1. Ainsi, nous avons étudié les conséquences de mutations de ces résidus. Ce chapitre sera alors scindé en deux parties : l'étude des résidus interagissant avec H620 puis avec E621.

I. Étude des résidus à proximité de H620

1. Analyse structurale

La première observation de proximité avec le résidu 620 a été faite par observation de la topologie théorique du NBD1 (Figure 45). Sur cette topologie réalisée par alignement de séquence et homologie avec d'autres transporteurs ABC, on remarque la proximité de H620 et S459. En effet, ces deux résidus sont localisés au niveau du feuillet β principal du NBD1, structure composée de 6 brins β (β_c 1 à β_c 6). Cette structure en feuillet β est entourée d'hélices α et forme le cœur catalytique du NBD1 des transporteurs ABC (Hung et al., 1998; Yuan et al., 2001; Callebaut et al., 2004). S459 est situé à l'extrémité C-terminale du brin β_c 1 et H620 à l'extrémité C-terminale du brin β_c 5.



Figure 45 : Topologie du domaine NBD1

N et C représente les extrémités N-terminale et C-terminale du domaine, les flèches roses représentent les brins β alors que les cylindres rouges représentent les hélices α . La zone d'intérêt est cerclée en noir. D'après *NCBI*

Par la suite, l'observation des modèles en trois dimensions du canal CFTR en conformation ouverte et fermée (Mornon et al., 2009), nous a permis de confirmer la proximité S459/H620 mais également de mettre en évidence une proximité entre l'histidine 620 et la phénylalanine 640 (Figure 46).

Résultats et discussions



<u>Figure 46 : Représentation des proximités entre les résidus H620, S459 et F640</u> Modélisation (A.) ou représentation schématique (B.) de la structure secondaire de l'extrémité C-terminale du NBD1 et de son environnement moléculaire (en configuration canal ouvert – ATP lié). Les doubles flèches rouges symbolisent les liaisons entre résidus alors que les noires représentent une grande proximité. $β_c$ et $α_c$ pour β ou α *core* : brin β ou hélice αappartenant au cœur catalytique du NBD ; $α_{ext}$: hélice α située à l'extrémité du NBD Modifié d'après *Mornon et al., 2010* Nous avons alors étudié l'effet de trois mutations de S459 (S459A/R/D) et de trois mutations de F640 (F640A/D et F640del)

2. Résultats

Pour chaque mutant, nous avons testé la maturation par Western blot, la fonctionnalité par la technique de patch clamp en configuration cellule entière et la sensibilité au MPB-91 par la technique d'efflux d'iodure.

Pour une meilleure compréhension, un code couleur particulier est utilisé dans les graphiques qui suivent : les résultats concernant les mutants de S459 sont représentés en **rouge** et ceux des mutants F640 en **bleu**.

A. Étude de la maturation

La figure ci après présente les résultats de l'étude de la maturation par Western blot :



Figure 47 : Etude de la maturation des mutants S459 et F640

A. Exemple de western blot obtenus avec un anticorps anti-CFTR. B. Récapitulatif de la densitométrie réalisée à partir des Western blot. Les valeurs sont normalisées par rapport à la protéine sauvage (wt=100%). Les données présentées sont des moyennes normalisées ± S.E.M. ns : non significatif ; *** p<0,001 (ANOVA - Tukey)

Un profil de maturation similaire à celui de la protéine wt est observé pour tous les mutants de S459 et de F640 étudiés. Les mêmes valeurs normalisées sont obtenues pour la protéine sauvage et tous les mutants indiquant le même ratio de forme B et C pour tous les mutants.

B. Étude de la fonctionnalité

La fonctionnalité des mutants a été étudiée par la technique de patch clamp en configuration cellule entière en présence de Fsk.

a) Enregistrement des courants chlorure

o Mutants de la sérine 459



<u>Figure 48 : Caractérisation fonctionnelle des mutants S459A, S459R et S459D</u>
 A. Traces représentatives des courants portés par les protéines CFTR-wt, -S459A, -S459R et - S459D, en condition basale, 10 μM Fsk ou 10 μM Fsk + 10 μM CFTR_{inh}-172.
 B. Courbe courant/tension (IV) correspondante pour les mutants S459A (n=17), S459R (n=7) et S459D (n=7). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± S.E.M.

Comme le CFTR-wt, les trois mutants ne présentent pas de dépendance au temps ou au voltage mais montrent un potentiel d'équilibre similaire au potentiel d'équilibre électrochimique théorique des ions chlorure (ECl⁻) dans nos conditions d'enregistrement. De plus, les courants AMPc dépendant sont de plus, totalement inhibés par l'inhibiteur spécifique de CFTR le CFTR_{inh}-172.

o Mutants de la phénylalanine 640



Figure 49 : Caractérisation fonctionnelle des mutants F640A, F640D et F640del
 A. Traces représentatives des courants portés par les protéines CFTR-wt, et les mutants F640 en condition basale, 10 μM Fsk ou 10 μM Fsk + 10 μM CFTR_{inh}-172.
 B. Courbe courant/tension (IV) correspondante pour les mutants F640A (n=6), F640D (n=12) et F640del (n=13). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± S.E.M.

Tout comme les mutants de la sérine 459, les trois mutants de F640 présentent certaines propriétés électrophysiologiques semblables à la protéine CFTR-wt (pas de dépendance au temps ou au voltage, E_{eq} : -40 mV, totalement inhibés par le CFTR_{inh}-172).

b) Analyse des courants enregistrés

Dans un premier temps les pentes des courbes IV ont été calculées par régression linéaire afin de comparer les densités de courants obtenues (Figure 50) puis nous avons comparé les cinétiques d'activation par calcul des T_{50} (Figure 51).

• Comparaison des pentes IV :



Figure 50 : Comparaison des pentes des courbes IV obtenues en présence de 10 µM Fsk

La ligne pointillée représente le niveau du CFTR-wt. Les données sont présentées sous la forme moyenne ± S.E.M. ns : non significatif ; *** : p<0,001 (ANOVA-Tukey) ; les indications au dessus de chaque moyenne correspondent à la comparaison avec la protéine wt.

Par comparaison des pentes des courbes IV, on remarque une différence significative d'activation des mutants S459A et S459R (pente IV : $2,417 \pm 0,041$ et $2,25 \pm 0,092$ respectivement) par rapport à la protéine sauvage (pente IV : $1,403 \pm 0,0329$). S459A et S459R présentent donc une augmentation de courant de 60 à 70 % par rapport au wt.

De plus, de façon similaire au mutant de l'histidine 620 H620D, on remarque que la mutation de la serine en acide aspartique (S459D) n'entraîne pas de différence significative du courant AMPc dépendant (pente IV : $1,243 \pm 243$).

Concernant les mutants de F640 la comparaison des pentes des courbes IV vient corroborer la différence significative d'activation entre la protéine wt (pente IV : $1,403 \pm$

0,0329) et les trois mutants F640A, F640D et F640del (respectivement pente IV : 2,173 \pm 0,024 ; 2,102 \pm 0,054 et 2,590 \pm 0,035).

Cependant contrairement aux mutants H620 et S459, la substitution du résidu par un acide aspartique (F640D) entraîne aussi une augmentation de la densité de courant global. De plus, on remarque 2 comportements significativement différents :

- une augmentation d'environ 50 % du courant global AMPc dépendant pour les substitutions F640A et F640D.

- une augmentation de 85 % du courant global AMPc pour la délétion du résidu
640.

200 ns ns 150 T₅₀ (s) ** ** 100 50 FONDA F640081 FEADD GASOR 5459A SAF9D Å.

• Comparaison des cinétiques d'activation :

Figure 51 : Histogramme représentant les valeurs de T₅₀

Histogramme représentant le temps moyen, en seconde (T_{50}) mis pour atteindre 50 % d'activation. Les données sont présentées sous la forme moyenne ± S.E.M. ns : non significatif ; ** : p<0.01, *** : p<0,001 (ANOVA-Tukey) ; les indications au dessus de chaque moyenne correspondent à la comparaison avec la protéine wt.

Les cinétiques des mutants présentant une augmentation de la densité de courant sont significativement différentes de la cinétique du CFTR-wt. En effet, tous ces mutants montrent une diminution de leur T_{50} par rapport au sauvage mais ne présentent pas de différence significative entre eux.

Concernant le mutant S459D qui présente une densité de courant similaire à celle du wt, la cinétique d'activation n'est pas non plus différente de celle du CFTR-wt, il n'y a pas de différence significative de leur T_{50} .

Les trois mutants S459A, S459R et S459D sont fonctionnels avec une densité de courant augmentée pour les deux premiers et normale pour S459D.

Les trois mutants F640A, F640D et F640del sont fonctionnels avec une densité de courant augmentée pour tous les mutants.

De plus, les cinétiques d'activation sont différentes pour les mutants présentant une densité de courant augmentée. En effet pour ces mutants le T_{50} est significativement diminué par rapport au T_{50} de la protéine sauvage.

c) Étude de la sensibilité des mutants S459A et F640A à la Fsk - Calcul de l'EC₅₀ Fsk

L'augmentation de densité de courant observée précédemment pourrait venir d'une plus grande sensibilité à l'AMPc. Afin de tester cette hypothèse, les EC_{50} Fsk pour les mutants S459A et F640A et la protéine sauvage ont été déterminées par la technique de patch clamp.



*Figure 52 Comparaison des EC*₅₀*Fsk du CFTR-wt -S459A et –F640* A. Courbes doses-réponses de la Fsk sur les protéines wt et S459A. **B.** tableau récapitulatif des valeurs obtenues.

Comme on peut le voir sur la Figure 52, il n'y a pas de différence significative concernant les EC_{50} Fsk des mutants S459A et F640A et de la protéine wt. L'augmentation de la densité de courant enregistrée pour les mutants de S459 et F640 ne proviendrait pas d'une plus grande sensibilité à l'AMPc.

C. Résumé des résultats

L'extrémité C-terminale du NBD1 et en particulier le résidu H620 est en contact avec d'autres résidus dont la sérine 459, la sérine 623 et la phénylalanine 640 (Figure 46).

La mutation des différents résidus mentionnés, ont pour conséquences des changements de l'activité chlorure du canal CFTR mais non de l'adressage ou de la pharmacologie. Les différents résultats sont résumés dans le tableau suivant :

CFTR-	Maturation	Densité de courant AMPc dépendant	T_{50}
wt	Normale	++	
S459A	Normale	+++	<
S459R	Normale	+++	<
S459D	Normale	++	ĸ
H620Q	Normale	+++	<
H620R	Normale	+++	<
H620D	Normale	++	и
S623A	Normale	+++	<
F640A	Normale	+++	<
F640D	Normale	+++	<
F640del	Normale	++++	<

Figure 53 : Récapitulatif des principaux résultats obtenus

Les + représentent une échelle d'activation. Plus il y a de +, plus le courant ou la réponse sont important. La colonne T₅₀ est une comparaison avec le T₅₀ du wt : \approx : T₅₀ similaire ; < : T₅₀ diminué

3. Discussion

Nous avons, dans cette partie de l'étude, exploré les conséquences de la mutation des résidus à proximité de l'histidine 620. Nous avons montré que les mutations introduites perturbaient les propriétés fonctionnelles des canaux mutés :

- La mutation des résidus S459, H620 et S623 induit une augmentation de 70% du courant chlorure et modifie les paramètres cinétiques d'activation avec une diminution du T_{50} . Ces modifications ne sont pas observées lorsque les résidus sont mutés en acide aspartique (S459D et H620D).

- La mutation du résidu F640 induit une augmentation de 50 % du courant chlorure lorsque la phénylalanine est substituée par un autre acide aminé (même par un acide aspartique {F640D}). Cette augmentation de courant chlorure atteint 80 % lorsque ce résidu est délété (F640del). Dans les deux cas de figure, la mutation de F640 modifie les paramètres cinétiques d'activation avec une diminution du T₅₀

Nous avons donc observé que les mutations introduites ne perturbaient pas la maturation de la protéine mais qu'elles entraînaient une augmentation de la densité de courants chlorure accompagnée d'une diminution du temps mis pour atteindre la densité de courant maximale. Il y a donc une activation plus importante et plus rapide lorsque ces résidus sont mutés.

Afin de comprendre comment ces mutations influencent l'activité du canal, nous nous sommes intéressés à la localisation particulière des résidus au sein du NBD1. En effet, la β *hairpin* ainsi que les résidus du NBD1 étudiés dans ce travail sont localisés dans le domaine à activité catalytique du domaine NBD.

L'étude de la structure des composants des domaines liant les nucléotides de deux transporteurs ABC bactérien, a mis en évidence un repliement des domaines NBD particulier et typique des ABC transporteurs (Hung et al., 1998; Schmitt et al., 2002). Ce domaine est composé de trois éléments : un cœur catalytique dit F1-ATPase-*like* car de structure et de fonctionnement similaire à la protéine F1-ATPase mitochondriale (Abrahams et al., 1994) et deux sous domaines spécifiques des ABC (Abrahams et al., 1994; Karpowich et al., 2001) (Figure 54 A.).

Le cœur catalytique F1-ATPase-*like* est formé d'un feuillet β , constitué de 6 brins β ($\beta_c 1$ à $\beta_c 6$), entouré d'hélices α stabilisant la structure (Karpowich et al., 2001). Il contient les motifs Walker A et B et la Q-loop de chaque NBD (Figure 54 B.).

Les sous-domaines sont quant à eux formés :

- d'un petit feuillet β périphérique recouvrant le site de liaison des nucléotides.
- d'hélices α contenant la séquence signature des ABC.



Figure 54 : Représentation en ruban du NBD1 humain

A. Représentation du NBD1 humain entier, canal en configuration ouvert. Le cœur catalytique est représenté en rouge, le sous-domaine β en jaune et le sous domaine-α en bleu. Les parties blanches représentent des régions spécifiques du CFTR.
B. Zoom du cœur catalytique. Sont indiqués : les motifs Walker A et B, la Q-loop, la séquence signature des ABC (S.S) ainsi que les résidus S459, H620 et F640 (la ligne pointillés verte indique une liaison hydrogène). D'après le fichier pdb issus des travaux de *Mornon et al.*, 2010

Nous voyons donc que la β *hairpin* ainsi que la sérine 459 (située à l'extrémité du segment $\beta_c 1$) et la phénylalanine 640 sont localisées dans le cœur catalytique du NBD1 en contact direct (S459) ou indirect (H620, S623 et F640) avec le site non canonique A lorsque les NBD sont dimérisés. La mutation de ces résidus aurait donc un impact sur l'activité de liaison ou d'hydrolyse de l'ATP, phénomène moteur de l'activation du canal.

Si l'on regarde la fixation de l'ATP sur le site A de la protéine ABC HisP (Figure 55), on remarque que le Walker A s'enroule autour du groupement phosphate β de l'ATP et que la sérine 41, homologue de la thréonine 460 du CFTR, interagit directement avec le groupement phosphate γ de l'ATP par une liaison hydrogène (Hung et al., 1998). La même organisation et les mêmes liaisons sont observées pour le transporteur MJ0796 avec le résidu homologue S40 (Smith et al., 2002). Or lors de l'hydrolyse de l'ATP en ADP, ce groupement γ -phosphate est clivé. On peut donc suggérer qu'une modification du résidu lié au γ -phosphate (S40 pour MJ0796, S41 pour HisP et T460 pour CFTR) va empêcher ou diminuer l'hydrolyse de ce groupement et par conséquent prolonger la fixation de l'ATP sur le site A.

Cette hypothèse est confortée par une étude récente qui montre que les liaisons hydrogène entre le γ –phosphate de l'ATP et les résidus du site catalytique à activité ATPase de la myosine ont une importance critique dans l'hydrolyse de l'ATP (Frye et al., 2010). De plus il est montré dans cette étude qu'une sérine de ce site catalytique (S236) crée une de ces liaisons hydrogène et que la mutation S236A entraîne une forte diminution de l'activité d'hydrolyse de l'ATP.



Figure 55 : Représentation des liaisons impliquées dans la fixation d'ATP (HisP) Les lignes pointillées représentent les liaisons hydrogène entre résidus de la protéine HisP et une molécule d'ATP. Les résidus du Walker A sont encadrés en jaune, les groupements phosphates de l'ATP sont notés en rouge. D'après *Hung et al., 1998.*

Donc les conséquences structurales des mutations S459A et S459R pourraient perturber leur environnement moléculaire et en particulier la liaison entre le résidu T460 voisin et le γ –phosphate de l'ATP. Cette perturbation induirait l'absence de l'hydrolyse de l'ATP donc une fixation plus longue de ce dernier sur le site A. Or il est maintenant acquis que le site non canonique A lie l'ATP plus longuement que le site B. Cette propriété venant de la séquence signature du NBD2, intervenant dans le site A, qui est dégénérée et induit une action catalytique diminuée par rapport au site canonique B (Basso et al., 2003). Récemment, il a été montré que la fixation plus longue de l'ATP permettrait aux domaines NBD d'être dans une conformation spatiale favorable à un nouveau cycle de liaison/hydrolyse d'ATP sur le site B (Tsai et al., 2010).

Par conséquent l'absence d'hydrolyse de l'ATP lié au site A induirait une multiplication des cycles catalytiques sur le site B donc des ouvertures plus fréquentes et rapides que pour la protéine sauvage. Ceci expliquerait l'augmentation de la densité de courant enregistrée et l'activation plus rapide des canaux.

L'introduction d'un acide aspartique (S459D) ne perturberait pas cette liaison T460- γ phosphate de l'ATP, de part la similitude des chaînes latérales (CH₂OH pour la sérine ; CH₂-COO pour l'aspartate).

De plus comme il a précédemment été mentionné, la sérine 459 interagit avec la β *hairpin* dont le résidu H620 est au centre d'un ensemble d'acides aminés créant ou non des interactions directes avec lui.

En effet, d'après les modèles 3D de CFTR (Callebaut et al., 2004; Serohijos et al., 2008; Mornon et al., 2009), cette histidine crée des liaisons hydrogènes avec l'acide aminé qui lui fait face au sein de la β *hairpin* : la sérine S623 mais surtout avec la sérine du Walker A : S459. Enfin il semble y avoir une grande proximité entre cette histidine 620 et la phénylalanine F640 (Figure 56)



Figure 56 : Représentation des proximités avec l'histidine 620

Modélisation des quatre résidus étudiés et leurs interactions. Les couleurs correspondent aux : groupements COOH en rouge, groupements NH2 en bleu et liaisons hydrogène en vert. D'après le fichier pdb issus des travaux de *Mornon et al.*, 2009 Lorsque les résidus H620 ou S623 sont mutés, il y aurait une perturbation structurale de la liaison β *hairpin* - motif Walker A du NBD1 qui pourrait mimer la mutation du résidu S459 et entraîner une perturbation de l'hydrolyse de l'ATP. Le cycle liaison/hydrolyse de l'ATP sur le site B serait alors augmenté, ce qui pourrait être à l'origine de l'augmentation de la probabilité d'ouverture enregistrée pour H620Q et de la diminution des paramètres cinétiques observés dans cette étude.

Concernant la mutation de la phénylalanine 640, l'augmentation de courant enregistrée apparaît plus faible que pour les mutations des résidus liés entre eux directement. En effet, dans le premier cas, il y a une augmentation de 50 % du courant chlorure (F6400A/D) alors que dans l'autre cas l'augmentation de courant est de 70 % (S459A/R, H620Q/R et S623A).

La différence entre ces résidus est leur localisation dans le cœur catalytique (Figure 54 B.). Alors que les acides aminés S459, H620 et S623 font partie du feuillet β , F640 est située au niveau d'une hélice α dont le rôle serait de stabiliser le feuillet β du cœur catalytique. On peut donc émettre l'hypothèse que la mutation de F640 déstabilise l'hélice α dont le résidu fait partie et de ce fait modifie la régulation de l'activité du cœur catalytique.

II. Étude des résidus à proximité d'E621

<u>1. Analyse structurale</u>

L'observation des modèles 3D de la β hairpin nous a permis de mettre en évidence des proximités différentes avec E621 selon l'état d'ouverture du canal (Figure 57).



Configuration canal fermé



Configuration canal ouvert

Figure 57 : Représentation en 3D des proximités entre les résidus E621, R1245 et Q1330

Représentation en conformation canal fermé (*haut*) ou ouvert (*bas*), avec ATP lié.
 Les structures bleues représentent les structures du NBD1 alors que celles en jaunes font partie du NBD2. Les flèches représentent les brins β et les hélices les hélices α.
 Modifié d'après Mornon et al., 2009

L'état d'ouverture du canal implique donc des changements de conformation des NBD induisant des changements dans l'environnement moléculaire de l'extrémité C-terminale et en particulier du résidu E621. La figure suivante détaille schématiquement la structure secondaire de cet environnement en configuration canal fermé ou ouvert (Figure 58).



Figure 58 : Localisation schématique des acides aminés étudiés.

A. Topologie générale du CFTR. B. Configuration spatiale des NBD. C. Structures secondaires des zones d'intérêts. β_c et α_c pour β ou α *core* : brin β ou hélice α appartenant au cœur catalytique du NBD ; α_{α} : hélice α du sous domaine α domaine. Les flèches rouges pointillés symbolisent les liaisons hydrogène entre résidus.

Le résidu E621 formerait donc, en configuration canal fermé, une liaison hydrogène avec l'acide aminé R1245. Il est intéressant de noter que ce résidu est le premier résidu du Walker A du NBD2. Cette arginine est donc l'analogue de la sérine 459 étudié dans la première partie de cette étude.

En configuration canal ouvert, E621 n'émet pas de contact direct avec un résidu du NBD2 mais se trouve très proche de l'acide aminé Q1330.

Nous avons étudié donc l'effet de trois mutations de R1245 (R1245A/G/S) et deux mutations de Q1330 (Q1330H/A)

2. Résultats

Pour chaque mutant, nous avons testé la maturation par Western blot, la fonctionnalité par la technique de patch clamp en configuration cellule entière et la sensibilité au MPB-91 par la technique d'efflux d'iodure.

Pour une meilleure compréhension, un code couleur particulier est utilisé dans les graphiques qui suivent : les résultats concernant les mutants de R1245 sont représentés en vert et ceux des mutants Q1330 en violet.

A. Étude de la maturation

La figure ci après présente les résultats de l'étude de la maturation par Western blot :



Figure 59 : Etude de la maturation des mutants R1245 et Q1330 A. Exemple de western blot obtenus avec un anticorps anti-CFTR. **B.** Récapitulatif de la densitométrie réalisée à partir des Western blot. Les valeurs sont normalisées par rapport à la protéine sauvage (wt=100%). Les données présentées sont des moyennes normalisées ± S.E.M. ns : non significatif ; *** p<0,001 (ANOVA - Tukey)

Aucune différence significative n'est observée entre les valeurs normalisées du ratio C/B+C de la protéine sauvage et des mutants. Ces résultats indiquent un processus d'adressage normal pour tous les mutants.

B. Étude de la fonctionnalité

La fonctionnalité des mutants a été étudiée par la technique de patch clamp en configuration cellule entière en présence de Fsk.

a) Enregistrement des courants chlorure



• Mutants de l'arginine 1245

Figure 60 : Caractérisation fonctionnelle des mutants R1245A/G&S

A. Traces représentatives des courants portés par les protéines CFTR-wt, -R1245A, -R1245G et –R1245S, en condition basale, 10 μM Fsk ou 10 μM Fsk + 10 μM CFTR_{inh}-172.
B. Courbe courant/tension (IV) correspondante pour les mutants R1245A (n=6), R1245G (n=10) et R1245S (n=9). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± S.E.M.

Les trois mutants ne présentent pas de dépendance au temps ou au voltage et un potentiel d'équilibre similaire au potentiel d'équilibre électrochimique théorique des ions chlorure (ECl⁻) dans nos conditions d'enregistrement. Ces courants AMPc dépendant sont également totalement inhibés par le CFTR_{inh}-172.

En revanche les trois mutants présentent des densités de courants très diminuées comparé à la protéine sauvage. La comparaison des pentes des courbes IV confirme ces différences d'activation (Figure 62).

o <u>Mutants de la glutamine 1330</u>



Figure 61 : Caractérisation fonctionnelle des mutants Q1330A et Q1330H

A. Traces représentatives des courants portés par les protéines CFTR-wt, -Q1330A et -Q1330H, en condition basale, 10 μM Fsk ou 10 μM Fsk + 10 μM CFTR_{inh}-172.
 B. Courbe courant/tension (IV) correspondante pour les mutants Q1330A (n=8) et Q1330H (n=7). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± S.E.M.

Encore une fois les courants enregistrés pour les deux mutants sont activés par la Fsk et totalement inhibés par le $CFTR_{inh}$ -172. De plus ils ne présentent pas de dépendance au temps ni au voltage mais présentent un potentiel d'équilibre similaire au potentiel d'équilibre électrochimique théorique des ions chlorure (ECl⁻) dans nos conditions d'enregistrement.

Les deux mutants présentent des densités de courants augmentées comparé à la protéine sauvage.

b) Analyse des courants enregistrés

Comme précédemment, le calcul des pentes des courbes IV par régression linéaire nous a permis de comparer les densités de courants obtenues par la technique de patch clamp (Figure 62). Nous avons par la suite comparé les cinétiques d'activation par calcul des T_{50} (Figure 63)

Comparaison des pentes IV :



<u>Figure 62 : Comparaison des pentes des courbes IV obtenues en présence de Fsk 10 μM</u> Comparaison des pentes des courbes IV en condition basal ou en présence de 10 μM de Fsk pour chaque mutant. La ligne pointillée représente le niveau d'activation du CFTR-wt. Les données sont présentées sous la forme moyenne ± S.E.M. ns : non significatif ; *** : p<0,001 (ANOVA-Tukey) ; les indications au dessus de chaque moyenne correspondent à la comparaison avec le wt.

Par comparaison des pentes des courbes IV en condition basale ou en présence de Fsk, on observe une légère augmentation du courant chlorure en présence de Fsk et ce pour les trois mutants de l'arginine 1245. En revanche les courants enregistrés sont diminués d'environ 80-85 % par rapport à la protéine sauvage. La pente IV du CFTR-wt est de 1,40 \pm 0,03 alors que celle des mutants étudiés ici est de 0,24 \pm 0,01 pour les mutants R1245A et G et de 0,29 \pm 0,02 pour le mutants R1245S.

La comparaison des pentes des courbes IV des mutants de Q1330 montre un doublement de la densité de courant $(2,8 \pm 0,05 \text{ et } 2,9 \pm 0,06 \text{ pour Q1330A et Q1330H respectivement}).$

Comparaison des cinétiques d'activation :



Figure 63 : Histogramme représentant les valeurs de T₅₀ des mutants de R1245 et Q1330 Histogramme représentant le temps moyen, en seconde (T₅₀) mis pour atteindre 50 % d'activation. Les données sont présentées sous la forme moyenne ± S.E.M. ns : non significatif ; ** : p<0.01, *** : p<0,001 (ANOVA-Tukey) ; les indications au dessus de chaque moyenne correspondent à la comparaison avec la protéine wt.

Aucune différence significative de T_{50} n'est observée entre la protéine sauvage et les mutants de R1245 et Q1330. La mutation des résidus en lien avec E621 ne modifie donc pas la cinétique d'activation du canal CFTR.

Alors que les mutants de Q1330 montrent une forte augmentation de leur densité de courant comparé au wt, les trois mutants R1245A, R1245G et R1245S présentent une forte diminution de leur densité de courant chlorure malgré une maturation correcte. Nous nous sommes alors demandé si malgré cette maturation correcte (observée par western blot) les trois protéines mutées n'avaient pas une localisation cellulaire incorrecte. Des expériences d'immunolocalisation ont donc été réalisées.

Étude de la localisation cellulaire des mutants



Figure 64 : Observation microscopique de la localisation cellulaire des mutants R1245 L'observation a été réalisée sur cellules fixées mais non marquées. Seul l'EGFP est visualisée.

Ces résultats de microscopie confocale nous indiquent que les trois mutants ont une localisation membranaire correcte. Le défaut de conductance chlorure ne provient donc pas d'une mauvaise localisation mais plus probablement d'un défaut de régulation du *gating* de la protéine.

C. Résumé des principaux résultats

Les résultats pour les mutants à proximité d'E621 sont résumés dans le tableau cidessous (Figure 65).

CFTR-	Maturation	Densité de courant AMPc dépendant	T_{50}
wt	Normale	++	
R1245A	Normale	+	~
R1245G	Normale	+	~
R1245S	Normale	+	~
Q1330A	Normale	+++++	\approx
Q1330H	Normale	+++++	\approx

Figure 65 : Récapitulatif des principaux résultats obtenus

Les + représentent une échelle d'activation. Plus il y a de +, plus le courant ou la réponse sont importants. La colonne T_{50} est une comparaison avec le T_{50} du wt : \approx : T_{50} similaire

3. Discussion

Nous avons, dans cette deuxième partie de l'étude, exploré les conséquences de la mutation des résidus à proximité de l'acide glutamique 621, acide aminé participant au coude de la β hairpin étudiée dans le premier chapitre de ce travail.

Les résidus étudiés sont localisés dans le NBD2 et leur mutation induit des perturbations électrophysiologiques différentes :

- La mutation du résidu R1245 suspecté d'être en contact direct avec E621 en configuration canal fermé a pour conséquence une forte diminution ($\approx 80 \%$) du courant chlorure AMPc dépendant malgré une maturation et une localisation correcte des protéines CFTR.

- La mutation du résidu Q1330 suspecté d'être à proximité d'E621 mais en configuration canal ouvert a pour conséquence une augmentation de 100 % du courant chlorure. Cependant contrairement aux mutants du NBD1, les paramètres cinétiques ne sont pas significativement modifiés par rapport aux canaux wt.

• Étude en configuration canal ouvert

Au regard du modèle de l'hétérodimère en configuration canal ouvert (Figure 66), il apparaît que E621 et Q1330 ne sont pas liés directement mais sont très proches l'un de l'autre et surtout situés à l'interface NBD1/NBD2. De plus, alors que l'acide glutamique 621 appartient au cœur catalytique du NBD1, la glutamine 1330 est située dans le sous-domaine α du NBD2 à proximité de la séquence signature du NBD2.

Résultats et discussions



Figure 66 : Localisation des résidus E621 et Q1330

Représentation de l'hétérodimère, canal en configuration ouvert vue de dessus des DTM (A.) ou latéralement (B.). Le NBD1 est coloré en bleu alors que le NBD2 est représenté en jaune.

La figure **C.**, est un agrandissement de la zone encadrée de la figure **B.**. Les chaînes principales et secondaires sont représentées en jaune. La séquence signature du site B est également localisée (S.S.).



D'après le fichier pdb issus des travaux de Mornon et al., 2009

Comme on peut le remarquer sur la Figure 66, les résidus E621 et Q1330 sont localisés à l'interface NBD1/NBD2. De plus il apparaît que ces résidus sont accessibles au

solvant (Callebaut et al., 2004) et semblent situés de part et d'autre d'un « passage » vers le site Walker A du NBD1. La mutation de la glutamine en alanine (Q1330A) ou en histidine (Q1330H) semble libérer le « passage » encombré par la chaîne latérale de la glutamine. Ainsi il y aurait une meilleure accessibilité de l'ATP vers ses sites de liaison qui pourrait se traduire par une augmentation de l'affinité de l'ATP pour le site A.

La fixation de l'ATP sur le site A étant à l'origine de la dimérisation des NBD (Vergani et al., 2005b), une fixation facilitée de l'ATP sur le site A favoriserait la dimérisation des NBD. Il y aurait alors une augmentation du cycle de l'ATP donc une augmentation du cycle ouverture/fermeture. Cependant, les activités catalytiques des sites A et B n'étant pas modifiées, les cinétiques de changement d'état du canal resteraient inchangées.

Au niveau des courants globaux, cette augmentation de la probabilité d'ouverture expliquerait les fortes densités enregistrées sans changement de cinétique pour les mutants de Q1330.

• Étude en configuration canal fermé

Concernant R1245, il s'avère que ce résidu est l'homologue de S459 dans le NBD2. Cet acide aminé fait donc partie du motif Walker A du site canonique B. On pourrait faire une analogie entre les effets de la fixation/hydrolyse de l'ATP sur le site A et B. Or il est maintenant démontré que les deux sites n'ont pas le même rôle dans le *gating* du canal.

En effet, l'hydrolyse de la molécule d'ATP fixée sur le site B induit un changement de l'état d'ouverture du canal : il passe d'un état ouvert réversible (O_1) à un état ouvert irréversible (O_2) suivi par la fermeture du canal (Vergani et al., 2005a). De plus il a été montré que l'abolition de l'hydrolyse de l'ATP sur le site B induisait d'une part, une diminution de la probabilité d'ouverture du canal (Ramjeesingh et al., 1999) et d'autre part, un prolongement de l'état ouvert qui peut alors atteindre une durée de 3 minutes (Zeltwanger et al., 1999). En d'autres termes, le canal s'ouvre moins souvent qu'un canal non muté mais reste ouvert plus longtemps. Dans ce cas, l'étude des courants globaux des protéines mutées se traduirait par une densité de courant similaire ou légèrement augmentée en comparaison avec la protéine wt.

L'effet observé dans cette étude pour les mutations de R1245 ne peut donc pas être expliqué, comme pour les mutants de S459, par une diminution de l'hydrolyse du groupement γ phosphate de l'ATP.

Toutefois, alors que la dimérisation des NBD est initiée par la fixation d'ATP sur le site A (Callebaut et al., 2004; Vergani et al., 2005a), l'ouverture du canal serait déclenchée par la liaison d'une molécule d'ATP sur le site B (Zhou et al., 2006). La mutation de R1245 pourrait avoir comme effet structural la gêne de la fixation d'ATP induisant une forte diminution, voire une absence, de cette fixation sur le site canonique B. Cette hypothèse est confortée par une étude montrant que la mutation de la thréonine T1246, résidu voisin de R1245, entraîne une forte baisse d'affinité du site B pour la molécule d'ATP, cette diminution d'affinité se traduisant fonctionnellement par une diminution de la probabilité d'ouverture du canal (Vergani et al., 2005a).

Une autre hypothèse pour expliquer cette baisse drastique de la densité de courant serait une explication mécanique. En effet dans la configuration canal fermé, le résidu R1245 est situé face à la β *hairpin*, avec laquelle il crée des liaisons, notamment avec le résidu E621 (Figure 67).



Figure 67 : Localisation du résidu R1245 en configuration canal fermé

Représentation en vue latérale (A.) ou de dessus (B.) de l'hétérodimère NBD1/NBD2 lorsque le canal est en configuration fermée.

Le NBD1 est en bleu alors que le NBD2 est en jaune. Les résidus E621 et R1245 sont représentés.

D'après le fichier pdb issus des travaux de Mornon et al., 2009



Comme on peut le voir sur la Figure 67, la liaison E621-R1245 semble faire une charnière entre les deux NBD. Or lorsque l'ATP va se fixer sur ses sites de fixation, les deux NBD vont subir une translation afin que les différents domaines se trouvent en vis-à-vis (WA & B d'un NBD avec la séquence signature de l'autre).

Les mutations de R1245, de part la localisation du résidu à l'interface NBD1/NBD2, pourraient perturber la translation des deux NBD, perturbant la formation de l'hétérodimère et par conséquent diminuerait fortement l'ouverture du canal. En effet comme on peut le voir sur la Figure 67, il y a une grande proximité entre R1245 et E621. Il se forme alors une liaison hydrogène entre les deux résidus créant ainsi une sorte de « charnière » utile à la translation des NBDs. Il est maintenant acquis qu'après la fixation des NBD, les deux domaines vont changer de conformation et former un dimère (Lewis et al., 2004; Callebaut et al., 2004), changements conformationnels qui seront transmis aux segments membranaires.

Or il est très probable que la mutation de R1245 modifie sa liaison avec E621. En effet on remplace une arginine, résidu avec une grande chaîne latérale, pour une alanine, une sérine ou une glycine qui sont des résidus à courte chaîne latérale. La perturbation de la liaison E621-R1245 aurait donc un impact sur la dimérisation qui serait gênée ou malformée.

III. Étude de l'effet des composés MPB

Comme nous avons montré dans le premier chapitre de ce travail, certains mutants de la β *hairpin* sont réfractaires aux composés MPB. En effet nous avons montré que les deux mutants G622D et G628R ne répondaient pas aux composés benzo[*c*]quinolizinium. Or ces deux mutations changent drastiquement la structure de la β *hairpin* et implicitement les contacts que celle-ci pourrait avoir avec d'autres résidus de la protéine.

Nous nous sommes alors demandé si le MPB venait se fixer sur l'extrémité Cterminale ou à proximité auquel cas une perturbation structurale de son environnement perturberait sa fixation et donc son action.

Nous avons donc testé le MPB-91 sur tous les mutants étudiés précédemment afin de déterminer si l'intégrité des proximités et les interactions avec la β hairpin jouaient un rôle dans l'action des composés donc site fixation.

<u>1. Résultats</u>

La susceptibilité des mutants aux MPB a été testée par la technique d'efflux d'iodure. Cependant, les mutants R1245 présentant un défaut d'activité, leurs réponses au MPB-91 seront traitées séparément des autres.

La figure suivante présente les réponses maximales des mutants de S459, F640 et Q1330 au MPB-91. Les réponses sont normalisées par rapport à la réponse du wt.


Figure 68 : Récapitulatif des réponses maximales des mutants de S459, F640 et Q1330 au <u>MPB-91</u>

Les réponses sont obtenues après une stimulation de 250 μ M de MPB-91. La ligne pointillée représente la réponse des protéines wt. ns : non significatif (ANOVA-Tukey). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne normalisée \pm S.E.M, n=2 ou 3 séries de 4 tests

Tous les mutants testés présentent une réponse au MPB-91 similaire à la réponse du CFTR-wt. La mutation de la sérine 459, de la phénylalanine 640 ou de la glutamine 1330 ne modifie donc pas la sensibilité du canal aux composés MPB.

Ces mutations n'empêchent donc pas l'accès des composés MPB à leur site d'action, ni leur action activatrice.

Concernant les mutants de R1245, afin de pouvoir enregistrer une réponse aux MPB, en dépit de la faible densité de courant AMPc dépendant portée par les mutants, les expériences d'efflux ont été réalisées après une incubation des cellules 24 heures à 27°C.

En effet il a été montré que l'incubation des cellules à 27°C permettait d'inhiber certaines protéines chaperonnes du ERQC sensibles à la température (les Hsp : *Heat Shock Protein*) (Denning et al., 1992). Une incubation par la température nous a donc permis d'augmenter la densité de canaux CFTR mutés à la membrane cellulaire et ainsi d'augmenter les niveaux de réponse obtenus par la technique d'efflux d'iodure.

La figure suivante présente les résultats obtenus par la technique d'efflux d'iodure en condition basale, en présence de $10 \,\mu\text{M}$ de Fsk ou 250 μM de MPB-91.



Figure 69 : Efflux d'iodure du CFTR-wt et –R1245A/G&S en réponse à une stimulation <u>AMPc dépendante ou au MPB-91</u>

Histogrammes des réponses maximales obtenues en condition basal, en présence de 10 μ M de Fsk ou 250 μ M de MPB-91. * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001 (ANOVA-Tukey). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne normalisée ± S.E.M, n=3 série de 4 tests

Les trois mutants présentent un efflux d'iodure augmenté en présence de MPB-91. Cette différence significative de réponse indique une activation des canaux malgré la mutation. Les trois mutants R1245A, R1245G et R1245S ne sont donc pas réfractaires aux composés MPB.

Cependant, il est à noter que pour la différence de réponse aux MPB entre les mutants R1245 et la protéine wt, les niveaux des réponses obtenues ne sont pas comparables étant donné le défaut d'activation AMPc dépendant observé. Ce défaut est d'ailleurs confirmé par ces résultats puisque l'on voit que la réponse AMPc dépendante des mutants est diminuée de 80 %, valeur retrouvée par la technique de patch clamp (Figure 62).

La comparaison des amplitudes des réponses obtenues en présence de 250 μ M de MPB-91 par rapport à celles obtenues en présence de 10 μ M de Fsk montre cependant une différence entre la protéine sauvage et les mutants de R1245. Pour le wt, la réponse aux composés MPB atteint 40 % de la réponse Fsk, valeurs déjà retrouvées dans la première étude et validées en patch clamp. En revanche pour les trois mutants de R1245, le niveau de réponse aux MPB est identique au niveau de réponse obtenu en présence de Fsk.

2. Discussion

Nous avons, dans cette troisième partie de l'étude, exploré les effets du composé MPB-91 sur tous les mutants précédemment étudiés. Pour ce faire, le MPB-91 a été testé par la technique d'efflux d'iodure à une concentration unique de 250 µM.

Pour tous les mutants testés une réponse au MPB-91 a été observée. La comparaison des réponses obtenues, ne montre aucune différence d'activation entre la protéine sauvage et les mutants de S459, F640 et Q1330. Concernant les mutations du résidu R1245, au vu des problèmes de *gating* observés, les réponses obtenues n'ont pas pu être comparées à celles du wt mais une activation a également été enregistrée.

Préalablement nous avons montré que deux mutants de l'extrémité C-terminale du NBD1, G622D et G628R, n'étaient pas activés par les MPB (Billet et al., 2010). Or, la glycine est un petit acide aminé sans chaîne latérale dont la substitution peut induire un changement structural important. La mutation de la glycine G622, de part sa localisation dans le coude reliant deux brins β ($\beta_c 5$ et $\beta_c 6$), peut entraîner une orientation différente de la β -*hairpin* donc un changement important de la structure. Nous avons donc étudié l'influence des résidus de l'environnement moléculaire de cette β -*hairpin* du NBD1 afin de déterminer si certaines liaisons ou proximités avec cette structure particulière étaient indispensables à l'action des MPB.

Les résultats obtenus pour les mutants S459 montrent que la liaison entre les résidus de la β -*hairpin* et le Walker A du NBD1 ne semble pas intervenir dans l'activation par les MPB. En effet, la perturbation de la liaison H620-S459 ne change pas le niveau de réponse obtenu en présence de MPB-91. Il en est de même pour la proximité avec la dernière hélice α du cœur catalytique sur laquelle se situe le résidu F640. Ces résultats sont concordants avec nos premières observations qui montraient un effet du MPB-91 similaire sur le wt ou le mutant H620Q.

De même, le résidu Q1330 à proximité d'E621, n'est pas impliqué dans l'action des MPB puisqu'aucune différence de réponse entre les mutants de Q1330 et la protéine wt n'a été observée.

En revanche le résidu R1245 semble impliqué dans le mécanisme d'action des composés. En effet, alors que la réponse MPB de la protéine sauvage atteint un niveau de

réponse de l'ordre de 40 % de l'activation Fsk, la réponse des mutants de R1245 est similaire à la réponse AMPc dépendante.

Dans le premier chapitre de ces travaux nous mettions en évidence l'augmentation d'activation pour le mutant E621G. Nous proposions alors deux hypothèses pour expliquer cette augmentation :

- une meilleure accessibilité de la molécule à son site de fixation

- une facilitation de la dimérisation des deux NBD ou une consolidation de l'état dimérisé.

La première hypothèse concernant la meilleure accessibilité peut être rejetée au vu des résultats obtenus avec les mutants de Q1330. En effet, nous avons vu que ces deux résidus étaient situés en périphérie de l'hétérodimère NBD. Tous comme la mutation E621G, la substitution de la glutamine 1330 par des résidus à chaîne latérale plus courte ouvrirait une voie d'accès vers les sites catalytiques des NBD (Figure 66).

Concernant la deuxième hypothèse, il s'avère que la perturbation de la liaison E621-R1245 semble favoriser l'action des MPB.

Comme il a déjà été montré, les MPB ne modifient pas l'activité ATPasique des NBD (Derand et al., 2001). En revanche, d'après des résultats non publiés de l'équipe de Robert Dormer, les composés MPB induiraient un déplacement des constantes de fixation de l'ATP indiquant une possible fixation des MPB à la place des molécules d'ATP.

Les MPB pourraient donc agir par fixation sur les sites ATP. Or comme les mutations des résidus du Walker A du NBD1 (S459) n'entraînent pas une réponse au MPB différente de celle du wt mais que la perturbation de la liaison E621-R1245 affecte positivement la réponse MPB, l'action des composés pourrait être liée au site canonique B. Dans ce cas la fixation des MPB sur un site proche de ce site canonique induirait l'ouverture du canal.

Cependant il a également été montré que le CFTR pouvait être activé par une fixation directe de nucléotide cyclique comme l'AMPc (Pereira et al., 2007). Dans cette étude il est montré que cette activation par fixation directe serait responsable de 30 à 40 % du niveau de réponse AMPc dépendante. Or les MPB sont responsables d'une activation dont le niveau de réponse est de l'ordre de 40 % de la réponse Fsk. De plus les composés MPB

induiraient tout comme pour l'ATP, un déplacement des constantes de fixation de l'AMPc en faveur d'une fixation des MPB (résultats non publiés).

On peut donc émettre l'hypothèse d'une fixation des MPB sur le site de fixation des nucléotides cycliques.

Une étude préalable suggérait la présence d'un tel site de fixation des nucléotides cycliques entre les résidus 397 et 426 avec le résidu T421 comme jouant un rôle critique dans cette activation (Sullivan et al., 1995). Or si l'on observe la localisation de ce résidu (et des autres résidus suspectés d'intervenir) lorsque le canal est en configuration fermé, on s'aperçoit qu'il est situé à l'opposé des résidus E621 et R1245 mais qu'il serait aussi à l'interface NBD1/NBD2 avec un possible rôle de charnière (Figure 70).



Figure 70 : Localisation du résidu T421 en configuration canal fermé

Représentation en vue de dessus de l'hétérodimère NBD1/NBD2 lorsque le canal est en configuration fermée. Le NBD1 est en bleu alors que le NBD2 est en jaune. Les résidus E621 et R1245 sont représentés respectivement en jaune et en bleu, le résidu T421 est coloré en rose. Le site de fixation des nucléotides cycliques est représenté par un ovale pointillé rouge.

D'après le fichier pdb issu des travaux de Mornon et al., 2009

On peut donc penser que la fixation du MPB sur ce site favoriserait la translation des NBD donc leur dimérisation et par conséquent l'ouverture du canal. La perturbation de la liaison E621-R1245 entraînerait alors moins de contraintes physiques lors du glissement des NBD pendant cette phase de dimérisation expliquant ainsi le niveau de réponse plus élevé obtenu pour les mutants de ces résidus.

Chapitre III. Exploration de l'entrée cytoplasmique du CFTR

I. Contexte scientifique

Même si les processus d'ouverture/fermeture du canal ne sont pas encore parfaitement élucidés, il est acquis que le *gating* du CFTR est finement régulé entre autre par les protéines kinase et l'ATP. En revanche, ces processus permettent de modifier l'état d'ouverture des canaux mais ne permettent pas de contrôler la sélectivité ionique de ces derniers.

Cette sélectivité est modulée par la nature même des résidus des vestibules externes et internes du pore.

Cependant, Mornon et al., proposent dans leur récente étude de l'architecture du CFTR, une structure particulière située à l'entrée cytoplasmique du pore et dont les résidus formeraient un passage pour les ions ainsi qu'un filtre de sélectivité (Mornon et al., 2009). Cette structure serait localisée à l'interface TMD/dimère NBD et formée par des résidus des quatre ICL (Figure 71).

Résultats et discussions



Figure 71 : Représentation de l'entrée cytoplasmique du pore de CFTR

A. Localisation des ICL au sein du CFTR entier. B. Vue des DTM des ICL et du dimère NBD en configuration canal ouvert. C. Zoom sur la structure formée par les ICL. Les ICL1 et ICL3 sont représentées en jaune, les ICL2 et ICL4 en rose et les acides aminés en rouge. Modifié d'après *Mornon et al., 2010*

Ce projet a pour but de déterminer le rôle de cette structure dans la sélectivité ionique du CFTR et de déterminer si elle participe au filtre de sélectivité.

II. Résultats.

1. Analyse structurale

Une analyse du modèle de CFTR en trois dimensions a mis en évidence une organisation sur trois niveaux des résidus étudiés (Figure 72).



Configuration canal fermé

Configuration canal ouvert

Figure 72 : Représentations des résidus suspectés de former l'entrée cytoplasmique du CFTR Représentations du squelette carboné des résidus identifiés. Représentations en configuration canal fermé à gauche et canal ouvert à droite. Les deux résidus étudiés dans ce travail sont notés en rouge. D'après le modèle de *Mornon et al., 2010*

La modélisation des résidus montre donc une organisation sur plusieurs niveaux :

- Un couple acide-base E267/K1060 qui serait situé au plus près des NBD.

- Un anneau hydrophobe fait de deux couches successives. La première constituée des résidus I177 (ICL1), S263 (ICL2), G970 (ICL3) et V1056 (ICL4), la deuxième composée par les acide aminés V181 (ICL1), L259 (ICL2), L973 (ICL3) et F1052 (ICL4)

Ce travail étant en cours de réalisation, seuls les résultats obtenus pour les résidus E267 et V1056 seront présentés par la suite.

2. Étude de deux résidus : E267 et V1056

A. Étude de la maturation

L'étude de la maturation des mutants a été faite par Western blot.



Figure 73 : Etude de la maturation des mutants des résidus E267 et V1056 **A.** Exemple de western blot obtenus avec un anticorps anti-CFTR. **B.** Récapitulatif de la densitométrie réalisée à partir des Western blot. Les valeurs sont normalisées par rapport à la protéine sauvage (wt=100%). Les données présentées sont des moyennes normalisées ± S.E.M. ns : non significatif ; *** p<0,001 (ANOVA – Tukey)

La Figure 73 montre un profil de maturation similaire à celui du wt pour tous les mutants. Les mêmes valeurs normalisées sont obtenues pour la protéine sauvage et tous les mutants indiquant le même ratio de forme B et C.



B. Étude de la fonctionnalité des mutants E267A et E267R





Les deux mutants présentent des courants sans dépendance au temps ou au voltage, avec un potentiel d'équilibre similaire au potentiel d'équilibre électrochimique théorique des ions chlorure (ECl⁻) dans nos conditions d'enregistrement. Les courants AMPc dépendants sont de plus, totalement inhibés par l'inhibiteur spécifique de CFTR le CFTR_{inh}-172.

Cependant malgré le profil de maturation correct pour les deux mutants, une diminution de la densité de courant est enregistrée.

En effet, on enregistre une diminution de 40 % pour le mutant E267A et de 90 % pour le mutant E267R. Ces pourcentages sont confirmés par les valeurs des pentes IV.

b) Étude de la localisation cellulaire des mutants E267

Comme une diminution des courants chlorure est observée malgré une maturation correcte des mutants, nous avons voulu vérifier leur localisation cellulaire :



<u>Figure 75 : Observation microscopique de la localisation cellulaire des mutants E267A/R</u> L'observation a été réalisée sur cellules fixées mais non marquées. Les protéines CFTR mutées sont localisées par la visualisation de l'EGFP fusionné à l'extrémité N-terminale du CFTR. Les noyaux sont marqués au Topro-3 et visualisés en bleu.

Ces résultats de microscopie nous indiquent que les deux mutants ont une localisation membranaire correcte. Le défaut de conductance chlorure ne provient donc pas d'une mauvaise localisation des protéines.



C. Étude de la fonctionnalité du mutant V1056H



A. Traces représentatives des courants portés par les protéines CFTR-wt et –V1056H, en condition basale, 10 μM Fsk ou 10 μM Fsk + 10 μM CFTR_{inh}-172.
B. Courbe courant/tension (IV) correspondante pour le mutant V1056H (n=7).
C. Comparaison des densités de courant du wt et du mutant V1056H à -100 mV (noir) et +100 mV (blanc). Les résultats sont présentés sous la forme moyenne ± S.E.M. *** p<0,001 (ANOVA – Tukey)

Alors que le courant pour le mutant V1056H est activé par une augmentation de l'AMPc, totalement inhibé par l'inhibiteur spécifique de CFTR le $CFTR_{inh}$ -172 et possède un potentiel d'équilibre similaire au potentiel électrochimique des ions chlorure, il ne présente pas les caractéristiques électrophysiologiques de la protéine wt.

En effet, la courbe IV du mutant V1056H n'est pas linéaire comme pour la protéine wt mais au contraire présente une rectification sortante. Comme on peut le voir sur la Figure 76 C., les densités de courant du wt et du mutant sont similaires à -100 mV mais

présentent une grande différence, statistiquement significative, à +100 mV. Cette rectification sortante indique une modification de la modulation de la perméabilité chlorure.

III. Discussion

Les résultats de cette étude montrent deux comportements différents des mutants étudiés.

Tout d'abord la mutation de l'acide glutamique E267 entraîne une diminution du courant plus ou moins importante selon le résidu introduit à la place de ce glutamate.

En effet, cet acide aminé est un résidu chargé négativement et sa substitution par une alanine, résidu non chargé (E267A) entraîne une diminution de 40 % du courant chlorure alors que sa substitution par une lysine chargée positivement (E267K) abolit 90 % du courant chlorure.

Ensuite la mutation de la valine 1056 entraîne un changement des propriétés du courant chlorure des canaux mutés. En effet, l'introduction d'une charge positive via l'histidine (V1056H) entraîne une rectification sortante du courant.

Alors que le courant porté par les canaux CFTR-wt est augmenté de façon linéaire en fonction de l'augmentation du potentiel imposé à la membrane, l'augmentation du courant porté par les canaux mutés V1056H est de plus en plus importante.

Les résidus de la structure d'entrée cytoplasmique du pore joueraient donc un rôle dans la modulation de la perméabilité chlorure.

Au vu de la modélisation moléculaire, dans la configuration canal ouvert le résidu E267 est situé sous le pore (voir Figure 71 et Figure 72). Or, dans une étude sur le filtre de sélectivité du canal chlorure ClC1, l'effet de la mutation d'un acide glutamique (E148) dont la chaîne secondaire servirait de porte au pore du canal, a été étudié. En position canal fermé, la chaîne bloquerait l'accès puis se décalerait lors de l'ouverture du canal afin de laisser un passage aux ions Cl⁻ (Dutzler et al., 2003; Lobet and Dutzler, 2006).

La localisation du résidu E267 du CFTR étant similaire à celle du résidu E148 du ClC1, on peut émettre l'hypothèse de la participation de ce glutamate dans la formation d'une porte qui modulerait le flux des ions Cl⁻.

Concernant V1056, l'introduction d'une charge positive au niveau de ce résidu modifie la conductance du canal.

Au regard de la modélisation moléculaire (Figure 72), on s'aperçoit que cette valine fait partie d'un anneau de résidus hydrophobes qui formerait une partie de l'entrée cytoplasmique putative du pore. Une étude portant sur un autre acide aminé de cet anneau hydrophobe, la glycine 970, montre des résultats similaires aux nôtres avec l'apparition d'une rectification sortante du courant chlorure lorsque la glycine est substituée par un acide aminé chargé positivement (G970R) (Seibert et al., 1996b).

Pour les deux résidus, G970 et V1056, l'introduction de la charge positive attirerait plus facilement les ions chlorure chargés négativement, ce qui expliquerait l'augmentation de courant enregistrée. Cet anneau hydrophobe mis en évidence par *Mornon et al.*, ferait donc partie de l'entrée du pore.

La structure mise en évidence par la modélisation moléculaire du CFTR entier aurait donc 3 niveaux dont 2 anneaux formant un « conduit » au travers duquel les ions transiteraient jusqu'à une « porte » formée entre autre par la chaîne latérale de l'acide glutamique E267.

Conclusions et perspectives

Ce travail présente une étude des relations entre la structure et le fonctionnement du CFTR.

Nous avons principalement exposé dans ce manuscrit les résultats de l'étude de l'influence de l'extrémité C-terminale du NBD1 et de son environnement moléculaire sur l'expression, l'activité et la pharmacologie des canaux CFTR.

Nous avons par ailleurs présenté les résultats préliminaires d'un projet annexe visant à explorer l'organisation particulière de certains résidus des ICL qui influencerait le flux ionique transitant par le canal CFTR.

Alors que certaines mutations n'ont aucun effet sur la maturation du canal ainsi que sur les propriétés électrophysiologiques du courant chlorure porté par ces protéines mutées (mutant S624A), d'autres mutations modifient la maturation de la protéine (mutants G622D ou G628R) ou influencent les propriétés fonctionnelles (mutation des résidus S459, H620, F640, R1245, Q1330) et/ou pharmacologiques du canal (mutants E621G, G622D, G628R ou R1245G/A/S).

\circ β -hairpin et adressage du CFTR

Nous avons montré tout d'abord l'importance de la structure de la β -hairpin dans la maturation et l'adressage de CFTR. Ces résultats sont concordants avec les différentes études qui montrent l'importance de l'extrémité C-terminale du NBD1 et en particulier des résidu 622 à 633, soit le dernier brin β du NBD1 (Pasyk et al., 1998; Chan et al., 2000). L'orientation de ce dernier brin β apparaît donc critique pour une localisation membranaire correcte de la protéine.

Or malgré le problème d'adressage, contrairement au mutant F508del, nous retrouvons une petite quantité de protéines à la membrane, indiquant une fuite de l'ERQC ou une reconnaissance difficile du mauvais repliement. Les mutants présentant ce type de phénotype pourraient alors former une sous classe de mutations dans la classe II.

Il serait intéressant par la suite d'explorer les conséquences des mutations des résidus en contact direct ou à proximité de cette structure. En effet, la perturbation de l'adressage pourrait être due à la rupture de ces contacts putatifs et l'identification des liaisons en cause permettrait le développement d'une nouvelle pharmacologie.

\circ β -hairpin et activité du CFTR

Ensuite nous avons montré l'importance de l'intégrité de l'extrémité C-terminale du NBD1 et de ses interactions dans la régulation de l'activité du CFTR. La β -*hairpin* aurait une influence sur la régulation des phénomènes de liaison et d'hydrolyse de l'ATP et participerait à la mécanique de dimérisation des NBD conduisant à l'ouverture du canal. Par ailleurs nos résultats suggèrent des mécanismes de régulation différents selon la localisation des résidus interagissant avec la β -*hairpin* :

- Le premier mettrait en jeu les résidus du NBD1 étudiés et leurs interactions. Ce processus semble intrinsèque au fonctionnement du NBD1 et serait liés à l'activité catalytique du domaine.

Afin de compléter cette étude, il serait intéressant de mesurer l'activité ATPasique du NBD1. Ceci pourrait être réalisé par dosage colorimétrique des phosphates inorganiques (Pi) issus de l'hydrolyse de l'ATP en ADP par des protéines de fusion ne contenant que le domaine NBD1 muté ou non.

- Le deuxième groupe de processus, mettrait en jeu des résidus des deux NBD et leurs interactions, il y aurait alors une interdépendance entre les deux domaines NBD.

Dans ce cas, la perturbation des liaisons de la β -*hairpin* avec les résidus du NBD2 entraîne des comportements antagonistes : une augmentation de la densité de courant chlorure ou au contraire une forte diminution de ce dernier.

Dans un premier temps, il faudrait vérifier si les variations des densités des courants enregistrées sont dues à des modifications d'affinité des mutants pour l'ATP. Pour ce faire, on pourrait effectuer des mesures de liaison d'ATP, par utilisation de TNP-ATP (2'-

(ou-3')-*O*-(2, 4, 6-trinitrophényl)-adénosine 5'-triphosphate), un dérivé fluorescent d'ATP dont la fluorescence augmente lorsqu'il est lié à une protéine. Des mesures de fluorescence sur un dimère NBD purifié muté ou non permettrait d'avoir une estimation de la capacité des mutants à lier l'ATP.

Ensuite, une des hypothèses données pour expliquer la forte diminution de courant enregistré pour les mutations de R1245 est un possible blocage de dimérisation dû à la localisation « charnière » de la liaison E621-R1245. Pour vérifier si la dimérisation des NBD est correcte, des expériences de liaisons croisées (*cross-linking*) pourraient être envisagées. En effet, certaines liaisons entre résidus ne se font que lorsque le canal est fermé (NBD non dimérisés) ou ouvert (hétérodimère formé). Ainsi il se crée une liaison entre T1246 et le résidu R555 du NBD1 lorsque le canal est dans un état ouvert ATP (Vergani et al., 2005a). Il serait donc intéressant de vérifier si cette liaison R555-T1246 se crée en présence d'ATP lorsque le résidu R1245 est muté.

Enfin la mutation de l'acide glutamique E621 n'a pas eu les mêmes impacts sur la fonction du canal que les mutants de R1245 et Q1330. Ceci pourrait provenir des mutations réalisées qui n'auraient pas pour effet de perturber la liaison avec R1245 ou ne changerait pas suffisamment la structure pour que l'effet soit détectable. Il serait donc intéressant de réaliser des mutations plus drastiques d'E621 afin de vérifier cette hypothèse.

\circ β -hairpin et pharmacologie du CFTR

Pour finir, nous avons vu que la déstabilisation de l'extrémité C-terminale du NBD1 ou de son environnement moléculaire pouvait avoir des répercussions sur la pharmacologie du canal et en particulier sur l'activité des composés MPB. En effet, certaines mutations abolissent complètement l'effet des composés MPB alors que d'autres mutations semblent augmenter la sensibilité des canaux pour ces composés. Il reste cependant à déterminer si cette influence de l'extrémité C-terminale sur l'action des MPB est :

- directe : la β -*hairpin* est le site de fixation des composés MPB ou se trouve à proximité de celui-ci.

- indirecte : la perturbation de la structure de la β -hairpin ou de son environnement moléculaire induit des changements structuraux modifiant la mécanique de la dimérisation.

Afin d'élucider le mécanisme d'action des composés MPB, il serait intéressant d'étudier l'influence des mutations des résidus du Walker A du site B de fixation des nucléotides afin d'observer si les MPB ont un effet sur la fixation de l'ATP.

De plus, l'étude de mutations des résidus susceptibles d'appartenir au site de fixation des nucléotides cycliques permettrait de déterminer si l'effet des composés MPB est dû à leur fixation sur ce site. Les travaux pourraient commencer avec l'étude des conséquences de mutations du résidu T421 sur l'effet des MPB.

Il est à noter que dans ce manuscrit, certains résultats obtenus pendant ce travail de recherche n'ont pas été exposés. En effet, nous avons étudié l'effet des mutations des résidus E1418 et N1419, aminoacides du NBD2, homologues des résidus E621 et G622 (Figure 34). Les résultats obtenus n'ont pas été exposés car ne présentant aucune différence de maturation, d'activité ou de pharmacologie avec la protéine sauvage.

Nous avons donc dans ce travail de recherche mis en évidence le rôle critique de l'extrémité C-terminale du NBD1. L'intégrité de cette structure et des liaisons qu'elle réalise avec différents domaines du CFTR apparaît indispensable à la maturation correcte des protéines et à la régulation de leur activité.

• Projet annexe

Lors de ce travail de recherche, une collaboration avec l'équipe du Dr Isabelle Callebaut a été mise en place. Leurs travaux consistent, entre autre, à élaborer un modèle moléculaire de CFTR le plus proche de la réalité. Un des objectifs de cette collaboration était de valider leur modèle théorique par une approche expérimentale.

Ainsi il a été mis en évidence par étude du modèle, une structure formée par les 4 ICL dont certains résidus formeraient une entrée cytoplasmique accompagnée d'une porte régulant le flux ionique transitant au travers du CFTR. Nous avons donc commencé à investiguer cette structure et les résultats préliminaires présentés dans ce manuscrit confirment les hypothèses émises par exploration du modèle.

Afin de confirmer le rôle de cette structure dans la conduction des ions et la modulation de leur flux, cette étude devrait se poursuivre avec l'étude de mutation d'autre résidu.

Tout d'abord nous prévoyons de muter la lysine K1060 qui serait située face au glutamate E267. En effet, il y aurait une configuration acide-base primordiale pour le contrôle de la perméabilité chlorure. Pour tester cette hypothèse, nous prévoyons une approche similaire à celle utilisée pour E267, c'est à dire supprimer la charge de la lysine par substitution avec une alanine (K1060A) puis introduire une charge négative par substitution avec un acide glutamique (K1060E).

Ensuite nous prévoyons d'explorer l'anneau hydrophobe localisé sur les résidus E267/K1060. Concernant cette région, des résultats ont déjà été obtenus pour deux résidus : G970 (ICL3) et V1056 (ICL4). Nous allons donc nous intéresser aux deux autres résidus : I177 (ICL1) et S263 (ICL2).

Annexes

Annexe 1 : Séquences des amorces de mutagenèse

Mutont	Position du 1 ^{er} nucléotide
Wittain	
S459A S459R S459D	1356 GTTGTTGGCGGTTGCTGGAGCCACTGGAGCAGGCAAGACTTC GTTGTTGGCGGTTGCTGGACGCACTGGAGCAGGCAAGACTTC GTTGTTGGCGGTTGCTGGAGACACTGGAGCAGGCAAGACTTC
51072	
H620Q H620R H620D	1837 GCTGACAAAATATTAATTTTGCAGGAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGG GCTGACAAAATATTAATTTTGCGTGAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGG GCTGACAAAATATTAATTTTGGATGAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGG
E621G	1838 CTGACAAAATATTAATTTTGCATGGAGGTAGCAGCTATTTTTATGGGAC
G622D	1851 AATTTTGCATGAAGATAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAG
S623A	1842 CAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTGCCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAG
S624A	1844 AAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCGCCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACTC
G628R	1857 GCATGAAGGTAGCAGCTATTTTTATCGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCT
F640A F640D F640del	1897 CTCCAAAATCTACAGCCAGACGCTAGCTCAAAACTCATGGGATGTG CTCCAAAATCTACAGCCAGACGATAGCTCAAAACTCATGGGATGTG CTCCAAAATCTACAGCCAGACAGCTCAAAACTCATGGGATGTG
R1245G R1245A R1245S	3714 GAGGGTGGGCCTCTTGGGAGGAACTGGATCAGGGAAGAG GAGGGTGGGCCTCTTGGGAGCAACTGGATCAGGGAAGAG GAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGCACTGGATCAGGGAAGAG
Q1330A Q1330H	³⁹⁶⁷ GGGCTCAGATCTGTGATAGAAGCGTTTCCTGGGAAGCTTGAC GGGCTCAGATCTGTGATAGAACACTTTCCTGGGAAGCTTGAC
E267A E267R	775 CTTGTGATTACCTCAGAAATGATTGCAAATATCCAATCTGTTAAGGC GTGATTACCTCAGAAATGATTCGAAATATCCAATCTGTTAAGGCATACTGC 778
V1056H	3132 GGAGTCCAATTTTCACTCATCTTCATACAAGCTTAAAAGGACTATGG

Annexe 2 : Séquences des amorces de séquençage

Amorces sens 5' $\rightarrow 3$

• Séquençage des mutants E267

669

GGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGG

• Séquençage des mutants S459

1288

GGTACTCCTGTCCTGAAAGATATTAATTTC

• Séquençage des mutants de H620 - E621 - G622 - S623 - S624 - G628 - F640

1692

AAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACT

o Séquençage des mutants V1056

3030

GTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGC

• Séquençage des mutants R1245 - Q1330

3642

GATCTCACAGCAAAATACACAGAAG

Références bibliographiques

- Abrahams, J.P., A.G.Leslie, R.Lutter, and J.E.Walker. 1994. Structure at 2.8 A resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:621-628.
- Adelman,W.J., Jr. and R.J.French. 1978. Blocking of the squid axon potassium channel by external caesium ions. *J Physiol* 276:13-25.
- Akabas, M.H., M.Cheung, and R.Guinamard. 1997. Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel. *J Bioenerg Biomembr* 29:453-463.
- Aleksandrov, L., A.Mengos, X.Chang, A.Aleksandrov, and J.R.Riordan. 2001. Differential interactions of nucleotides at the two nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 276:12918-12923.
- Andersen, D.H. 1938. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 56:344-399.
- Andersen, D.H. and R.C.Hodges. 1946. Celiac syndrome. V. Genetics of cystic fibrosis of the pancreas with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 72:62-80.
- Anderson, M.P., H.A.Berger, D.P.Rich, R.J.Gregory, A.E.Smith, and M.J.Welsh. 1991a. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell* 67:775-784.
- Anderson, M.P., R.J.Gregory, S.Thompson, D.W.Souza, S.Paul, R.C.Mulligan, A.E.Smith, and M.J.Welsh. 1991b. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253:202-205.
- Antigny, F., C.Norez, L.Dannhoffer, J.Bertrand, D.Raveau, P.Corbi, C.Jayle, F.Becq, and C.Vandebrouck. 2010. TRPC6 Links Ca2+ Mishandling to CFTR Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
- Arniges, M., E.Vazquez, J.M.Fernandez-Fernandez, and M.A.Valverde. 2004. Swellingactivated Ca2+ entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia. *J Biol Chem* 279:54062-54068.
- Aubin, C.N. and P.Linsdell. 2006. Positive charges at the intracellular mouth of the pore regulate anion conduction in the CFTR chloride channel. *J Gen Physiol* 128:535-545.
- Bachmann, A., U.Russ, S.Waldegger, and U.Quast. 2000. Potent stimulation and inhibition of the CFTR Cl(-) current by phloxine B. *Br J Pharmacol* 131:433-440.
- Basso, C., P. Vergani, A.C. Nairn, and D.C. Gadsby. 2003. Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH2-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating. *J Gen Physiol* 122:333-348.

- Bear,C.E., F.Duguay, A.L.Naismith, N.Kartner, J.W.Hanrahan, and J.R.Riordan. 1991. Clchannel activity in Xenopus oocytes expressing the cystic fibrosis gene. J Biol Chem 266:19142-19145.
- Bear,C.E., C.H.Li, N.Kartner, R.J.Bridges, T.J.Jensen, M.Ramjeesingh, and J.R.Riordan. 1992. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68:809-818.
- Becq,F., T.J.Jensen, X.B.Chang, A.Savoia, J.M.Rommens, L.C.Tsui, M.Buchwald, J.R.Riordan, and J.W.Hanrahan. 1994. Phosphatase inhibitors activate normal and defective CFTR chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9160-9164.
- Becq,F., Y.Mettey, M.A.Gray, L.J.Galietta, R.L.Dormer, M.Merten, T.Metaye, V.Chappe, C.Marvingt-Mounir, O.Zegarra-Moran, R.Tarran, L.Bulteau, R.Derand, M.M.Pereira, M.A.McPherson, C.Rogier, M.Joffre, B.E.Argent, D.Sarrouilhe, W.Kammouni, C.Figarella, B.Verrier, M.Gola, and J.M.Vierfond. 1999. Development of substituted Benzo[c]quinolizinium compounds as novel activators of the cystic fibrosis chloride channel. J Biol Chem 274:27415-27425.
- Berger,H.A., M.P.Anderson, R.J.Gregory, S.Thompson, P.W.Howard, R.A.Maurer, R.Mulligan, A.E.Smith, and M.J.Welsh. 1991. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. J *Clin Invest* 88:1422-1431.
- Bertrand, C.A. and R.A.Frizzell. 2003. The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C1-18.
- Bertrand, J., B.Boucherle, A.Billet, P.Melin-Heschel, L.Dannhoffer, C.Vandebrouck, C.Jayle, C.Routaboul, M.C.Molina, J.L.Decout, F.Becq, and C.Norez. 2010. Identification of a novel water soluble activator of wild-type and F508del CFTR: GPact-11a. *Eur Respir J*.
- Bianchet, M.A., Y.H.Ko, L.M.Amzel, and P.L.Pedersen. 1997. Modeling of nucleotide binding domains of ABC transporter proteins based on a F1-ATPase/recA topology: structural model of the nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Bioenerg Biomembr* 29:503-524.
- Biemans-Oldehinkel, E., M.K.Doeven, and B.Poolman. 2006. ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* 580:1023-1035.
- Billet,A., P.Melin, M.Jollivet, J.P.Mornon, I.Callebaut, and F.Becq. 2010. C terminus of nucleotide binding domain 1 contains critical features for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking and activation. J Biol Chem 285:22132-22140.
- Bonvin, E., P.Le Rouzic, J.F.Bernaudin, C.H.Cottart, C.Vandebrouck, A.Crie, T.Leal, A.Clement, and M.Bonora. 2008. Congenital tracheal malformation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *J Physiol* 586:3231-3243.
- Boucher,R.C., M.J.Stutts, M.R.Knowles, L.Cantley, and J.T.Gatzy. 1986. Na+ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* 78:1245-1252.

- Boucherot, A., R.Schreiber, and K.Kunzelmann. 2001. Role of CFTR's PDZ1-binding domain, NBF1 and Cl(-) conductance in inhibition of epithelial Na(+) channels in Xenopus oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1515:64-71.
- Braman, J., C.Papworth, and A.Greener. 1996. Site-directed mutagenesis using doublestranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol* 57:31-44.
- Bränden, C.-I., J.Tooze, and B.trad.Lubochinsky. 1996. Introduction à la structure des protéines. De Boeck Université.
- Briel,M., R.Greger, and K.Kunzelmann. 1998. Cl- transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) contributes to the inhibition of epithelial Na+ channels (ENaCs) in Xenopus oocytes co-expressing CFTR and ENaC. J Physiol 508 (Pt 3):825-836.
- Bulteau,L., R.Derand, Y.Mettey, T.Metaye, M.R.Morris, C.M.McNeilly, C.Folli, L.J.Galietta, O.Zegarra-Moran, M.M.Pereira, C.Jougla, R.L.Dormer, J.M.Vierfond, M.Joffre, and F.Becq. 2000. Properties of CFTR activated by the xanthine derivative X-33 in human airway Calu-3 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C1925-C1937.
- Bulteau-Pignoux,L., R.Derand, T.Metaye, M.Joffre, and F.Becq. 2002. Genistein modifies the activation kinetics and magnitude of phosphorylated wild-type and G551D-CFTR chloride currents. *J Membr Biol* 188:175-182.
- Caci,E., A.Caputo, A.Hinzpeter, N.Arous, P.Fanen, N.Sonawane, A.S.Verkman, R.Ravazzolo, O.Zegarra-Moran, and L.J.Galietta. 2008. Evidence for direct CFTR inhibition by CFTR(inh)-172 based on Arg347 mutagenesis. *Biochem J* 413:135-142.
- Cahill, P., M.W.Nason, Jr., C.Ambrose, T.Y.Yao, P.Thomas, and M.E.Egan. 2000. Identification of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator domains that are important for interactions with ROMK2. *J Biol Chem* 275:16697-16701.
- Cai,Z. and D.N.Sheppard. 2002. Phloxine B interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple sites to modulate channel activity. *J Biol Chem* 277:19546-19553.
- Callebaut,I., R.Eudes, J.P.Mornon, and P.Lehn. 2004. Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modeling of the heterodimer. *Cell Mol Life Sci* 61:230-242.
- Canessa, C.M., J.D.Horisberger, and B.C.Rossier. 1993. Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 361:467-470.
- Carson, M.R., S.M.Travis, and M.J.Welsh. 1995. The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J Biol Chem* 270:1711-1717.
- Chan,K.W., L.Csanady, D.Seto-Young, A.C.Nairn, and D.C.Gadsby. 2000. Severed molecules functionally define the boundaries of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator's NH(2)-terminal nucleotide binding domain. *J Gen Physiol* 116:163-180.

- Chang,G. and C.B.Roth. 2001. Structure of MsbA from E. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 293:1793-1800.
- Chang,X.B., Y.X.Hou, T.J.Jensen, and J.R.Riordan. 1994. Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J Biol Chem* 269:18572-18575.
- Chang,X.B., J.A.Tabcharani, Y.X.Hou, T.J.Jensen, N.Kartner, N.Alon, J.W.Hanrahan, and J.R.Riordan. 1993. Protein kinase A (PKA) still activates CFTR chloride channel after mutagenesis of all 10 PKA consensus phosphorylation sites. *J Biol Chem* 268:11304-11311.
- Chanson, M., I.Scerri, and S.Suter. 1999. Defective regulation of gap junctional coupling in cystic fibrosis pancreatic duct cells. *J Clin Invest* 103:1677-1684.
- Chappe, V., D.A.Hinkson, L.D.Howell, A.Evagelidis, J.Liao, X.B.Chang, J.R.Riordan, and J.W.Hanrahan. 2004. Stimulatory and inhibitory protein kinase C consensus sequences regulate the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:390-395.
- Chappe, V., D.A.Hinkson, T.Zhu, X.B.Chang, J.R.Riordan, and J.W.Hanrahan. 2003. Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J Physiol* 548:39-52.
- Chappe, V., T.Irvine, J.Liao, A.Evagelidis, and J.W.Hanrahan. 2005. Phosphorylation of CFTR by PKA promotes binding of the regulatory domain. *EMBO J* 24:2730-2740.
- Chappe, V., Y.Mettey, J.M.Vierfond, J.W.Hanrahan, M.Gola, B.Verrier, and F.Becq. 1998. Structural basis for specificity and potency of xanthine derivatives as activators of the CFTR chloride channel. *Br J Pharmacol* 123:683-693.
- Chen, J.H., X.B.Chang, A.A.Aleksandrov, and J.R.Riordan. 2002. CFTR is a monomer: biochemical and functional evidence. *J Membr Biol* 188:55-71.
- Cheng,J., V.Cebotaru, L.Cebotaru, and W.B.Guggino. 2010. Syntaxin 6 and CAL mediate the degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell* 21:1178-1187.
- Cheng,J., B.D.Moyer, M.Milewski, J.Loffing, M.Ikeda, J.E.Mickle, G.R.Cutting, M.Li, B.A.Stanton, and W.B.Guggino. 2002. A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. J Biol Chem 277:3520-3529.
- Cheng, J., H.Wang, and W.B.Guggino. 2004. Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J Biol Chem* 279:1892-1898.
- Cheng,S.H., R.J.Gregory, J.Marshall, S.Paul, D.W.Souza, G.A.White, C.R.O'Riordan, and A.E.Smith. 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63:827-834.

- Cheng,S.H., D.P.Rich, J.Marshall, R.J.Gregory, M.J.Welsh, and A.E.Smith. 1991. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66:1027-1036.
- Chinet, T. 1999. [Physiopathology of cystic fibrosis lung disease]. *Rev Mal Respir* 16:339-345.
- Cobb,B.R., L.Fan, T.E.Kovacs, E.J.Sorscher, and J.P.Clancy. 2003. Adenosine receptors and phosphodiesterase inhibitors stimulate Cl- secretion in Calu-3 cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:410-418.
- Cotten, J.F., L.S.Ostedgaard, M.R.Carson, and M.J.Welsh. 1996. Effect of cystic fibrosisassociated mutations in the fourth intracellular loop of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 271:21279-21284.
- Crawford,I., P.C.Maloney, P.L.Zeitlin, W.B.Guggino, S.C.Hyde, H.Turley, K.C.Gatter, A.Harris, and C.F.Higgins. 1991. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9262-9266.
- Csanady,L., K.W.Chan, D.Seto-Young, D.C.Kopsco, A.C.Nairn, and D.C.Gadsby. 2000. Severed channels probe regulation of gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by its cytoplasmic domains. *J Gen Physiol* 116:477-500.
- Dannhoffer,L., S.Blouquit-Laye, A.Regnier, and T.Chinet. 2009. Functional properties of mixed cystic fibrosis and normal bronchial epithelial cell cultures. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:717-723.
- Davis, P.B., M.Drumm, and M.W.Konstan. 1996. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1229-1256.
- Dawson, R.J. and K.P.Locher. 2007. Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from Staphylococcus aureus in complex with AMP-PNP. *FEBS Lett* 581:935-938.
- De Rose, V. 2002. Mechanisms and markers of airway inflammation in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 19:333-340.
- Dean, M., Y.Hamon, and G.Chimini. 2001. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 42:1007-1017.
- Dean,M., M.B.White, J.Amos, B.Gerrard, C.Stewart, K.T.Khaw, and M.Leppert. 1990. Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell* 61:863-870.
- Denning,G.M., M.P.Anderson, J.F.Amara, J.Marshall, A.E.Smith, and M.J.Welsh. 1992. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 358:761-764.
- Derand, R., L.Bulteau-Pignoux, Y.Mettey, O.Zegarra-Moran, L.D.Howell, C.Randak, L.J.Galietta, J.A.Cohn, C.Norez, L.Romio, J.M.Vierfond, M.Joffre, and F.Becq. 2001. Activation of G551D CFTR channel with MPB-91: regulation by ATPase activity and phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1657-C1666.

- Devuyst,O., C.R.Burrow, E.M.Schwiebert, W.B.Guggino, and P.D.Wilson. 1996. Developmental regulation of CFTR expression during human nephrogenesis. *Am J Physiol* 271:F723-F735.
- di Sant'Agnese, P.A., R.C.DARLING, G.A.PERERA, and E.SHEA. 1953. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 12:549-563.
- Dormer, R.L., R.Derand, C.M.McNeilly, Y.Mettey, L.Bulteau-Pignoux, T.Metaye, J.M.Vierfond, M.A.Gray, L.J.Galietta, M.R.Morris, M.M.Pereira, I.J.Doull, F.Becq, and M.A.McPherson. 2001. Correction of delF508-CFTR activity with benzo(c)quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells. *J Cell Sci* 114:4073-4081.
- Drumm, M.L., H.A.Pope, W.H.Cliff, J.M.Rommens, S.A.Marvin, L.C.Tsui, F.S.Collins, R.A.Frizzell, and J.M.Wilson. 1990. Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* 62:1227-1233.
- Drumm,M.L., D.J.Wilkinson, L.S.Smit, R.T.Worrell, T.V.Strong, R.A.Frizzell, D.C.Dawson, and F.S.Collins. 1991. Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in Xenopus oocytes. *Science* 254:1797-1799.
- Dulhanty,A.M. and J.R.Riordan. 1994. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase causes a conformational change in the R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry* 33:4072-4079.
- Dutzler, R., E.B.Campbell, and R.MacKinnon. 2003. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science* 300:108-112.
- Egan, M., T.Flotte, S.Afione, R.Solow, P.L.Zeitlin, B.J.Carter, and W.B.Guggino. 1992. Defective regulation of outwardly rectifying Cl- channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* 358:581-584.
- Eidelman,O., C.Guay-Broder, P.J.van Galen, K.A.Jacobson, C.Fox, R.J.Turner, Z.I.Cabantchik, and H.B.Pollard. 1992. A1 adenosine-receptor antagonists activate chloride efflux from cystic fibrosis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5562-5566.
- Fanconi,G., E.Uehlinger, and C.Knauer. 1936. Das coeliakiesyndrom bei angeborener zysticher pankreasfibromatose und bronchiektasien. *Wiener Klin Wochen* 86:753-756.
- Farber, S. 1943. Pancreatic insufficiency and the celiac syndrome. *New Engl J Med* 229:653-682.
- Fatehi,M. and P.Linsdell. 2009. Novel residues lining the CFTR chloride channel pore identified by functional modification of introduced cysteines. *J Membr Biol* 228:151-164.
- Frye,J.J., V.A.Klenchin, C.R.Bagshaw, and I.Rayment. 2010. Insights into the importance of hydrogen bonding in the gamma-phosphate binding pocket of myosin: structural and functional studies of serine 236. *Biochemistry* 49:4897-4907.

- Fu,J., H.L.Ji, A.P.Naren, and K.L.Kirk. 2001. A cluster of negative charges at the amino terminal tail of CFTR regulates ATP-dependent channel gating. J Physiol 536:459-470.
- Gabriel,S.E., L.L.Clarke, R.C.Boucher, and M.J.Stutts. 1993. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363:263-268.
- Gadsby,D.C. and A.C.Nairn. 1999. Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev* 79:S77-S107.
- Ge,N., C.N.Muise, X.Gong, and P.Linsdell. 2004. Direct comparison of the functional roles played by different transmembrane regions in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *J Biol Chem* 279:55283-55289.
- Gentzsch,M. and J.R.Riordan. 2001. Localization of sequences within the C-terminal domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator which impact maturation and stability. *J Biol Chem* 276:1291-1298.
- Graham, F.L., J.Smiley, W.C.Russell, and R.Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.
- Guggino,W.B. 2004. The cystic fibrosis transmembrane regulator forms macromolecular complexes with PDZ domain scaffold proteins. *Proc Am Thorac Soc* 1:28-32.
- Hamill,O.P., A.Marty, E.Neher, B.Sakmann, and F.J.Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hammerle, M.M., A.A.Aleksandrov, X.B.Chang, and J.R.Riordan. 2000. A novel CFTR disease-associated mutation causes addition of an extra N-linked oligosaccharide. *Glycoconj J* 17:807-813.
- Hammerle, M.M., A.A.Aleksandrov, and J.R.Riordan. 2001. Disease-associated mutations in the extracytoplasmic loops of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator do not impede biosynthetic processing but impair chloride channel stability. *J Biol Chem* 276:14848-14854.
- Hamutcu,R., J.M.Rowland, M.V.Horn, C.Kaminsky, E.F.MacLaughlin, V.A.Starnes, and M.S.Woo. 2002. Clinical findings and lung pathology in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1172-1175.
- Heaton, N.D. and J.P.Pryor. 1990. Vasa aplasia and cystic fibrosis. Br J Urol 66:538-540.
- Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8:67-113.
- Higgins, C.F. and K.J.Linton. 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol* 11:918-926.

- Hopfner,K.P., A.Karcher, D.S.Shin, L.Craig, L.M.Arthur, J.P.Carney, and J.A.Tainer. 2000. Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* 101:789-800.
- Hung, L.W., I.X.Wang, K.Nikaido, P.Q.Liu, G.F.Ames, and S.H.Kim. 1998. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* 396:703-707.
- Hwang, T.C., L.Lu, P.L.Zeitlin, D.C.Gruenert, R.Huganir, and W.B.Guggino. 1989. Clchannels in CF: lack of activation by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* 244:1351-1353.
- Ji,H.L., M.L.Chalfant, B.Jovov, J.P.Lockhart, S.B.Parker, C.M.Fuller, B.A.Stanton, and D.J.Benos. 2000. The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 275:27947-27956.
- Jia,Y., C.J.Mathews, and J.W.Hanrahan. 1997. Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J Biol Chem* 272:4978-4984.
- Johnson, L.G., J.C.Olsen, B.Sarkadi, K.L.Moore, R.Swanstrom, and R.C.Boucher. 1992. Efficiency of gene transfer for restoration of normal airway epithelial function in cystic fibrosis. *Nat Genet* 2:21-25.
- Jones, P.M. and A.M.George. 2002. Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12639-12644.
- Karpowich, N., O.Martsinkevich, L.Millen, Y.R.Yuan, P.L.Dai, K.MacVey, P.J.Thomas, and J.F.Hunt. 2001. Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure* 9:571-586.
- Kerem,B., J.M.Rommens, J.A.Buchanan, D.Markiewicz, T.K.Cox, A.Chakravarti, M.Buchwald, and L.C.Tsui. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245:1073-1080.
- Kerem, E. 2006. Mutation specific therapy in CF. Paediatr Respir Rev 7 Suppl 1:S166-S169.
- Kerppola,R.E. and G.F.Ames. 1992. Topology of the hydrophobic membrane-bound components of the histidine periplasmic permease. Comparison with other members of the family. *J Biol Chem* 267:2329-2336.
- Kidd,J.F., I.Kogan, and C.E.Bear. 2004. Molecular basis for the chloride channel activity of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the consequences of disease-causing mutations. *Curr Top Dev Biol* 60:215-249.
- Knowles, M., J.Gatzy, and R.Boucher. 1983. Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium. *J Clin Invest* 71:1410-1417.
- Knowles, M.R., J.T.Gatzy, and R.C.Boucher. 1981. Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis. *New Engl J Med* 305:1489-1495.

- Ko,S.B., N.Shcheynikov, J.Y.Choi, X.Luo, K.Ishibashi, P.J.Thomas, J.Y.Kim, K.H.Kim, M.G.Lee, S.Naruse, and S.Muallem. 2002. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO(3)(-) transport in cystic fibrosis. *EMBO J* 21:5662-5672.
- Ko,Y.H. and P.L.Pedersen. 2001. Cystic fibrosis: a brief look at some highlights of a decade of research focused on elucidating and correcting the molecular basis of the disease. *J Bioenerg Biomembr* 33:513-521.
- Kogan, I., M.Ramjeesingh, C.Li, J.F.Kidd, Y.Wang, E.M.Leslie, S.P.Cole, and C.E.Bear. 2003. CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J* 22:1981-1989.
- Konig, J., R.Schreiber, T.Voelcker, M.Mall, and K.Kunzelmann. 2001. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) inhibits ENaC through an increase in the intracellular Cl- concentration. *EMBO Rep* 2:1047-1051.
- Kopito, L.E., H.J.Kosasky, and H.Shwachman. 1973. Water and electrolytes in cervical mucus from patients with cystic fibrosis. *Fertil Steril* 24:512-516.
- Kotsias, B.A. and C.Peracchia. 2005. Functional interaction between CFTR and Cx45 gap junction channels expressed in oocytes. *J Membr Biol* 203:143-150.
- Kotsias,B.A., M.Salim, L.L.Peracchia, and C.Peracchia. 2006. Interplay between cystic fibrosis transmembrane regulator and gap junction channels made of connexins 45, 40, 32 and 50 expressed in oocytes. *J Membr Biol* 214:1-8.
- Krouse, M.E. and J.J.Wine. 2001. Evidence that CFTR channels can regulate the open duration of other CFTR channels: cooperativity. *J Membr Biol* 182:223-232.
- Kunkel, T.A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:488-492.
- Kunzelmann,K., G.L.Kiser, R.Schreiber, and J.R.Riordan. 1997. Inhibition of epithelial Na+ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* 400:341-344.
- Letz,B. and C.Korbmacher. 1997. cAMP stimulates CFTR-like Cl- channels and inhibits amiloride-sensitive Na+ channels in mouse CCD cells. *Am J Physiol* 272:C657-C666.
- Lewarchik, C.M., K.W.Peters, J.Qi, and R.A.Frizzell. 2008. Regulation of CFTR trafficking by its R domain. *J Biol Chem* 283:28401-28412.
- Lewis,H.A., S.G.Buchanan, S.K.Burley, K.Conners, M.Dickey, M.Dorwart, R.Fowler, X.Gao, W.B.Guggino, W.A.Hendrickson, J.F.Hunt, M.C.Kearins, D.Lorimer, P.C.Maloney, K.W.Post, K.R.Rajashankar, M.E.Rutter, J.M.Sauder, S.Shriver, P.H.Thibodeau, P.J.Thomas, M.Zhang, X.Zhao, and S.Emtage. 2004. Structure of nucleotide-binding domain 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J* 23:282-293.
- Ling,B.N., J.B.Zuckerman, C.Lin, B.J.Harte, K.A.McNulty, P.R.Smith, L.M.Gomez, R.T.Worrell, D.C.Eaton, and T.R.Kleyman. 1997. Expression of the cystic fibrosis phenotype in a renal amphibian epithelial cell line. *J Biol Chem* 272:594-600.

- Linsdell, P. 2006. Mechanism of chloride permeation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Exp Physiol* 91:123-129.
- Lobet,S. and R.Dutzler. 2006. Ion-binding properties of the ClC chloride selectivity filter. *EMBO J* 25:24-33.
- Locher, K.P. 2004. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* 14:426-431.
- Locher,K.P., A.T.Lee, and D.C.Rees. 2002. The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296:1091-1098.
- Long, F.R., R.S.Williams, and R.G.Castile. 2004. Structural airway abnormalities in infants and young children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 144:154-161.
- Lu,M., K.Dong, M.E.Egan, G.H.Giebisch, E.L.Boulpaep, and S.C.Hebert. 2010. Mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator forms cAMP-PKA-regulated apical chloride channels in cortical collecting duct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6082-6087.
- Lu,M., Q.Leng, M.E.Egan, M.J.Caplan, E.L.Boulpaep, G.H.Giebisch, and S.C.Hebert. 2006. CFTR is required for PKA-regulated ATP sensitivity of Kir1.1 potassium channels in mouse kidney. J Clin Invest 116:797-807.
- Lukacs,G.L., A.Mohamed, N.Kartner, X.B.Chang, J.R.Riordan, and S.Grinstein. 1994. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J* 13:6076-6086.
- Luo, J., M.D.Pato, J.R.Riordan, and J.W.Hanrahan. 1998. Differential regulation of single CFTR channels by PP2C, PP2A, and other phosphatases. *Am J Physiol* 274:C1397-C1410.
- Lyczak, J.B., C.L.Cannon, and G.B.Pier. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15:194-222.
- Ma,J., J.E.Tasch, T.Tao, J.Zhao, J.Xie, M.L.Drumm, and P.B.Davis. 1996. Phosphorylationdependent block of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel by exogenous R domain protein. *J Biol Chem* 271:7351-7356.
- Ma,T., J.R.Thiagarajah, H.Yang, N.D.Sonawane, C.Folli, L.J.Galietta, and A.S.Verkman. 2002. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest* 110:1651-1658.
- Macpherson, I. and M.STOKER. 1962. Polyoma transformation of hamster cell clones--an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 16:147-151.
- Mansoura,M.K., S.S.Smith, A.D.Choi, N.W.Richards, T.V.Strong, M.L.Drumm, F.S.Collins, and D.C.Dawson. 1998. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) anion binding as a probe of the pore. *Biophys J* 74:1320-1332.
- Marivingt-Mounir, C., C.Norez, R.Derand, L.Bulteau-Pignoux, D.Nguyen-Huy, B.Viossat, G.Morgant, F.Becq, J.M.Vierfond, and Y.Mettey. 2004. Synthesis, SAR, crystal

structure, and biological evaluation of benzoquinoliziniums as activators of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels. *J Med Chem* 47:962-972.

- McCarty,N.A. 2000. Permeation through the CFTR chloride channel. J Exp Biol 203:1947-1962.
- McCarty,N.A., S.McDonough, B.N.Cohen, J.R.Riordan, N.Davidson, and H.A.Lester. 1993. Voltage-dependent block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channel by two closely related arylaminobenzoates. *J Gen Physiol* 102:1-23.
- McDonough, S., N.Davidson, H.A.Lester, and N.A.McCarty. 1994. Novel pore-lining residues in CFTR that govern permeation and open-channel block. *Neuron* 13:623-634.
- McNicholas, C.M., W.B.Guggino, E.M.Schwiebert, S.C.Hebert, G.Giebisch, and M.E.Egan. 1996a. Sensitivity of a renal K+ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8083-8088.
- McNicholas, C.M., M.W.Nason, Jr., W.B.Guggino, E.M.Schwiebert, S.C.Hebert, G.Giebisch, and M.E.Egan. 1997. A functional CFTR-NBF1 is required for ROMK2-CFTR interaction. *Am J Physiol* 273:F843-F848.
- McNicholas, C.M., Y.Yang, G.Giebisch, and S.C.Hebert. 1996b. Molecular site for nucleotide binding on an ATP-sensitive renal K+ channel (ROMK2). *Am J Physiol* 271:F275-F285.
- Melin, P., E.Hosy, M.Vivaudou, and F.Becq. 2007. CFTR inhibition by glibenclamide requires a positive charge in cytoplasmic loop three. *Biochim Biophys Acta* 1768:2438-2446.
- Melin,P., C.Norez, I.Callebaut, and F.Becq. 2005. The glycine residues G551 and G1349 within the ATP-binding cassette signature motifs play critical roles in the activation and inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by phloxine B. *J Membr Biol* 208:203-212.
- Meyerholz, D.K., D.A.Stoltz, E.Namati, S.Ramachandran, A.A.Pezzulo, A.R.Smith, M.V.Rector, M.J.Suter, S.Kao, G.McLennan, G.J.Tearney, J.Zabner, P.B.McCray Jr, and M.J.Welsh. 2010. Loss of CFTR Function Produces Abnormalities in Tracheal Development in Neonatal Pigs and Young Children. Am J Respir Crit Care Med.
- Mio,K., T.Ogura, M.Mio, H.Shimizu, T.C.Hwang, C.Sato, and Y.Sohma. 2008. Threedimensional reconstruction of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel revealed an ellipsoidal structure with orifices beneath the putative transmembrane domain. *J Biol Chem* 283:30300-30310.
- Mornon, J.P., P.Lehn, and I.Callebaut. 2008. Atomic model of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: membrane-spanning domains and coupling interfaces. *Cell Mol Life Sci* 65:2594-2612.

- Mornon, J.P., P.Lehn, and I.Callebaut. 2009. Molecular models of the open and closed states of the whole human CFTR protein. *Cell Mol Life Sci* 66:3469-3486.
- Moyer, B.D., J.Denton, K.H.Karlson, D.Reynolds, S.Wang, J.E.Mickle, M.Milewski, G.R.Cutting, W.B.Guggino, M.Li, and B.A.Stanton. 1999. A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest* 104:1353-1361.
- Moyer,B.D., J.Loffing, E.M.Schwiebert, D.Loffing-Cueni, P.A.Halpin, K.H.Karlson, I.I.Ismailov, W.B.Guggino, G.M.Langford, and B.A.Stanton. 1998. Membrane trafficking of the cystic fibrosis gene product, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, tagged with green fluorescent protein in madin-darby canine kidney cells. J Biol Chem 273:21759-21768.
- Muanprasat, C., N.D.Sonawane, D.Salinas, A.Taddei, L.J.Galietta, and A.S.Verkman. 2004. Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism, structure-activity analysis, and in vivo efficacy. *J Gen Physiol* 124:125-137.
- Nagel, G. 1999. Differential function of the two nucleotide binding domains on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochim Biophys Acta* 1461:263-274.
- Naren, A.P., E.Cormet-Boyaka, J.Fu, M.Villain, J.E.Blalock, M.W.Quick, and K.L.Kirk. 1999. CFTR chloride channel regulation by an interdomain interaction. *Science* 286:544-548.
- Naren, A.P. and K.L.Kirk. 2000. CFTR Chloride Channels: Binding Partners and Regulatory Networks. *News Physiol Sci* 15:57-61.
- Naren, A.P., D.J.Nelson, W.Xie, B.Jovov, J.Pevsner, M.K.Bennett, D.J.Benos, M.W.Quick, and K.L.Kirk. 1997. Regulation of CFTR chloride channels by syntaxin and Munc18 isoforms. *Nature* 390:302-305.
- Naren, A.P., M.W.Quick, J.F.Collawn, D.J.Nelson, and K.L.Kirk. 1998. Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10972-10977.
- Neher, E. and B.Sakmann. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Noel,S., C.Faveau, C.Norez, C.Rogier, Y.Mettey, and F.Becq. 2006. Discovery of pyrrolo[2,3-b]pyrazines derivatives as submicromolar affinity activators of wild type, G551D, and F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels. *J Pharmacol Exp Ther* 319:349-359.
- Norez, C., F.Bilan, A.Kitzis, Y.Mettey, and F.Becq. 2008. Proteasome-dependent pharmacological rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator revealed by mutation of glycine 622. *J Pharmacol Exp Ther* 325:89-99.
- Ostedgaard,L.S., O.Baldursson, D.W.Vermeer, M.J.Welsh, and A.D.Robertson. 2000. A functional R domain from cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is predominantly unstructured in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5657-5662.

- Ostedgaard,L.S., O.Baldursson, and M.J.Welsh. 2001. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channel by its R domain. *J Biol Chem* 276:7689-7692.
- Pasyk,E.A., X.K.Morin, P.Zeman, E.Garami, K.Galley, L.J.Huan, Y.Wang, and C.E.Bear. 1998. A conserved region of the R domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is important in processing and function. J Biol Chem 273:31759-31764.
- Payen,L.F., M.Gao, C.J.Westlake, S.P.Cole, and R.G.Deeley. 2003. Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core Walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *J Biol Chem* 278:38537-38547.
- Pereira, M.M., J.Parker, F.L.Stratford, M.McPherson, and R.L.Dormer. 2007. Activation mechanisms for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein involve direct binding of cAMP. *Biochem J* 405:181-189.
- Peters, K.W., J.Qi, S.C.Watkins, and R.A.Frizzell. 1999. Syntaxin 1A inhibits regulated CFTR trafficking in xenopus oocytes. *Am J Physiol* 277:C174-C180.
- Picciotto, M.R., J.A.Cohn, G.Bertuzzi, P.Greengard, and A.C.Nairn. 1992. Phosphorylation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 267:12742-12752.
- Prasher, D.C., V.K.Eckenrode, W.W.Ward, F.G.Prendergast, and M.J.Cormier. 1992. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 111:229-233.
- Prince,L.S., K.Peter, S.R.Hatton, L.Zaliauskiene, L.F.Cotlin, J.P.Clancy, R.B.Marchase, and J.F.Collawn. 1999. Efficient endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a tyrosine-based signal. *J Biol Chem* 274:3602-3609.
- Qi,J., K.W.Peters, C.Liu, J.M.Wang, R.S.Edinger, J.P.Johnson, S.C.Watkins, and R.A.Frizzell. 1999. Regulation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by syntaxin 1A. *J Biol Chem* 274:30345-30348.
- Quinton, P.M. 1983. Chloride impermeability in cystic fibrosis. Nature 301:421-422.
- Raghuram, V., D.O.Mak, and J.K.Foskett. 2001. Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1300-1305.
- Ramjeesingh, M., J.F.Kidd, L.J.Huan, Y.Wang, and C.E.Bear. 2003. Dimeric cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exists in the plasma membrane. *Biochem J* 374:793-797.
- Ramjeesingh,M., C.Li, E.Garami, L.J.Huan, K.Galley, Y.Wang, and C.E.Bear. 1999. Walker mutations reveal loose relationship between catalytic and channel-gating activities of purified CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). *Biochemistry* 38:1463-1468.

Rhodes, G. 2006. Crystallography Made Crystal Clear. 3e edition ed.

- Rich,D.P., M.P.Anderson, R.J.Gregory, S.H.Cheng, S.Paul, D.M.Jefferson, J.D.McCann, K.W.Klinger, A.E.Smith, and M.J.Welsh. 1990. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* 347:358-363.
- Rich,D.P., H.A.Berger, S.H.Cheng, S.M.Travis, M.Saxena, A.E.Smith, and M.J.Welsh. 1993. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channel by negative charge in the R domain. *J Biol Chem* 268:20259-20267.
- Riordan, J.R., J.M.Rommens, B.Kerem, N.Alon, R.Rozmahel, Z.Grzelczak, J.Zielenski, S.Lok, N.Plavsic, J.L.Chou, and . 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073.
- Rommens, J.M., S.Dho, C.E.Bear, N.Kartner, D.Kennedy, J.R.Riordan, L.C.Tsui, and J.K.Foskett. 1991. cAMP-inducible chloride conductance in mouse fibroblast lines stably expressing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7500-7504.
- Rommens, J.M., M.C.Iannuzzi, B.Kerem, M.L.Drumm, G.Melmer, M.Dean, R.Rozmahel, J.L.Cole, D.Kennedy, N.Hidaka, and . 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245:1059-1065.
- Rosenberg, M.F., A.B.Kamis, L.A.Aleksandrov, R.C.Ford, and J.R.Riordan. 2004. Purification and crystallization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *J Biol Chem* 279:39051-39057.
- Routaboul, C., C.Norez, P.Melin, M.C.Molina, B.Boucherle, F.Bossard, S.Noel, R.Robert, C.Gauthier, F.Becq, and J.L.Decout. 2007. Discovery of alpha-aminoazaheterocyclemethylglyoxal adducts as a new class of high-affinity inhibitors of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels. *J Pharmacol Exp Ther* 322:1023-1035.
- Saurin, W., M.Hofnung, and E.Dassa. 1999. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* 48:22-41.
- Schmitt,L. and R.Tampe. 2002. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* 12:754-760.
- Schoumacher, R.A., R.L.Shoemaker, D.R.Halm, E.A.Tallant, R.W.Wallace, and R.A.Frizzell. 1987. Phosphorylation fails to activate chloride channels from cystic fibrosis airway cells. *Nature* 330:752-754.
- Schreiber, R., H.Pavenstadt, R.Greger, and K.Kunzelmann. 2000. Aquaporin 3 cloned from Xenopus laevis is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* 475:291-295.
- Seavilleklein, G., N.Amer, A.Evagelidis, F.Chappe, T.Irvine, J.W.Hanrahan, and V.Chappe. 2008. PKC phosphorylation modulates PKA-dependent binding of the R domain to other domains of CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C1366-C1375.
- Seibert, F.S., X.B.Chang, A.A.Aleksandrov, D.M.Clarke, J.W.Hanrahan, and J.R.Riordan. 1999. Influence of phosphorylation by protein kinase A on CFTR at the cell surface and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1461:275-283.
- Seibert,F.S., Y.Jia, C.J.Mathews, J.W.Hanrahan, J.R.Riordan, T.W.Loo, and D.M.Clarke. 1997. Disease-associated mutations in cytoplasmic loops 1 and 2 of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator impede processing or opening of the channel. *Biochemistry* 36:11966-11974.
- Seibert,F.S., P.Linsdell, T.W.Loo, J.W.Hanrahan, D.M.Clarke, and J.R.Riordan. 1996a. Disease-associated mutations in the fourth cytoplasmic loop of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator compromise biosynthetic processing and chloride channel activity. *J Biol Chem* 271:15139-15145.
- Seibert,F.S., P.Linsdell, T.W.Loo, J.W.Hanrahan, J.R.Riordan, and D.M.Clarke. 1996b. Cytoplasmic loop three of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator contributes to regulation of chloride channel activity. *J Biol Chem* 271:27493-27499.
- Seibert,F.S., J.A.Tabcharani, X.B.Chang, A.M.Dulhanty, C.Mathews, J.W.Hanrahan, and J.R.Riordan. 1995. cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator residue Ser-753 and its role in channel activation. J Biol Chem 270:2158-2162.
- Serohijos,A.W., T.Hegedus, A.A.Aleksandrov, L.He, L.Cui, N.V.Dokholyan, and J.R.Riordan. 2008. Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3256-3261.
- Sheppard,D.N., D.P.Rich, L.S.Ostedgaard, R.J.Gregory, A.E.Smith, and M.J.Welsh. 1993. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl- channels with altered pore properties. *Nature* 362:160-164.
- Shimomura,O. 2009. Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). Angew Chem Int Ed Engl 48:5590-5602.
- Short,D.B., K.W.Trotter, D.Reczek, S.M.Kreda, A.Bretscher, R.C.Boucher, M.J.Stutts, and S.L.Milgram. 1998. An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 273:19797-19801.
- Silvis, M.R., J.A.Picciano, C.Bertrand, K.Weixel, R.J.Bridges, and N.A.Bradbury. 2003. A mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator generates a novel internalization sequence and enhances endocytic rates. *J Biol Chem* 278:11554-11560.
- Smith,P.C., N.Karpowich, L.Millen, J.E.Moody, J.Rosen, P.J.Thomas, and J.F.Hunt. 2002. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* 10:139-149.
- Smith,S.S., X.Liu, Z.R.Zhang, F.Sun, T.E.Kriewall, N.A.McCarty, and D.C.Dawson. 2001. CFTR: covalent and noncovalent modification suggests a role for fixed charges in anion conduction. *J Gen Physiol* 118:407-431.

- Springsteel,M.F., L.J.Galietta, T.Ma, K.By, G.O.Berger, H.Yang, C.W.Dicus, W.Choung, C.Quan, A.A.Shelat, R.K.Guy, A.S.Verkman, M.J.Kurth, and M.H.Nantz. 2003. Benzoflavone activators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: towards a pharmacophore model for the nucleotide-binding domain. *Bioorg Med Chem* 11:4113-4120.
- Stratford,F.L., M.M.Pereira, F.Becq, M.A.McPherson, and R.L.Dormer. 2003. Benzo(c)quinolizinium drugs inhibit degradation of Delta F508-CFTR cytoplasmic domain. *Biochem Biophys Res Commun* 300:524-530.
- Stutts, M.J., C.M.Canessa, J.C.Olsen, M.Hamrick, J.A.Cohn, B.C.Rossier, and R.C.Boucher. 1995. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269:847-850.
- Sullivan, S.K., L.B.Agellon, and R.Schick. 1995. Identification and partial characterization of a domain in CFTR that may bind cyclic nucleotides directly. *Curr Biol* 5:1159-1167.
- Tabcharani, J.A., X.B.Chang, J.R.Riordan, and J.W.Hanrahan. 1991. Phosphorylationregulated Cl- channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* 352:628-631.
- Thomas, P.M., G.J.Cote, N.Wohllk, B.Haddad, P.M.Mathew, W.Rabl, L.Aguilar-Bryan, R.F.Gagel, and J.Bryan. 1995. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268:426-429.
- Tsai,M.F., M.Li, and T.C.Hwang. 2010. Stable ATP binding mediated by a partial NBD dimer of the CFTR chloride channel. *J Gen Physiol* 135:399-414.
- Tusnady,G.E., E.Bakos, A.Varadi, and B.Sarkadi. 1997. Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* 402:1-3.
- Van Goor,F., S.Hadida, P.D.Grootenhuis, B.Burton, D.Cao, T.Neuberger, A.Turnbull, A.Singh, J.Joubran, A.Hazlewood, J.Zhou, J.McCartney, V.Arumugam, C.Decker, J.Yang, C.Young, E.R.Olson, J.J.Wine, R.A.Frizzell, M.Ashlock, and P.Negulescu. 2009. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18825-18830.
- Vankeerberghen, A., L.Wei, M.Jaspers, J.J.Cassiman, B.Nilius, and H.Cuppens. 1998. Characterization of 19 disease-associated missense mutations in the regulatory domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Hum Mol Genet* 7:1761-1769.
- Venglarik, C.J., R.J.Bridges, and R.A.Frizzell. 1990. A simple assay for agonist-regulated Cl and K conductances in salt-secreting epithelial cells. *Am J Physiol* 259:C358-C364.
- Vergani, P., C.Basso, M.Mense, A.C.Nairn, and D.C.Gadsby. 2005a. Control of the CFTR channel's gates. *Biochem Soc Trans* 33:1003-1007.
- Vergani, P., S.W.Lockless, A.C.Nairn, and D.C.Gadsby. 2005b. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* 433:876-880.

- Wang, F., S.Zeltwanger, I.C.Yang, A.C.Nairn, and T.C.Hwang. 1998. Actions of genistein on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating. Evidence for two binding sites with opposite effects. *J Gen Physiol* 111:477-490.
- Ward, A., C.L.Reyes, J.Yu, C.B.Roth, and G.Chang. 2007. Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19005-19010.
- White, M.B., J.Amos, J.M.Hsu, B.Gerrard, P.Finn, and M.Dean. 1990. A frame-shift mutation in the cystic fibrosis gene. *Nature* 344:665-667.
- Winter, M.C. and M.J.Welsh. 1997. Stimulation of CFTR activity by its phosphorylated R domain. *Nature* 389:294-296.
- Wolde, M., A.Fellows, J.Cheng, A.Kivenson, B.Coutermarsh, L.Talebian, K.Karlson, A.Piserchio, D.F.Mierke, B.A.Stanton, W.B.Guggino, and D.R.Madden. 2007. Targeting CAL as a negative regulator of DeltaF508-CFTR cell-surface expression: an RNA interference and structure-based mutagenetic approach. J Biol Chem 282:8099-8109.
- Xie,J., M.L.Drumm, J.Ma, and P.B.Davis. 1995. 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* 270:28084-28091.
- Yoo, D., T.P.Flagg, O.Olsen, V.Raghuram, J.K.Foskett, and P.A.Welling. 2004. Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem* 279:6863-6873.
- Yuan,Y.R., S.Blecker, O.Martsinkevich, L.Millen, P.J.Thomas, and J.F.Hunt. 2001. The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol Chem* 276:32313-32321.
- Zeltwanger, S., F.Wang, G.T.Wang, K.D.Gillis, and T.C.Hwang. 1999. Gating of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by adenosine triphosphate hydrolysis. Quantitative analysis of a cyclic gating scheme. *J Gen Physiol* 113:541-554.
- Zhang,G., V.Gurtu, and S.R.Kain. 1996. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227:707-711.
- Zhou, J.J., M.Fatehi, and P.Linsdell. 2008. Identification of positive charges situated at the outer mouth of the CFTR chloride channel pore. *Pflugers Arch* 457:351-360.
- Zhou,J.J., M.S.Li, J.Qi, and P.Linsdell. 2010. Regulation of conductance by the number of fixed positive charges in the intracellular vestibule of the CFTR chloride channel pore. *J Gen Physiol* 135:229-245.
- Zhou,J.J. and P.Linsdell. 2009. Evidence that extracellular anions interact with a site outside the CFTR chloride channel pore to modify channel properties. *Can J Physiol Pharmacol* 87:387-395.

- Zhou,Z., X.Wang, H.Y.Liu, X.Zou, M.Li, and T.C.Hwang. 2006. The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *J Gen Physiol* 128:413-422.
- Zielenski, J., D.Bozon, B.Kerem, D.Markiewicz, P.Durie, J.M.Rommens, and L.C.Tsui. 1991. Identification of mutations in exons 1 through 8 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 10:229-235.

Liste des publications

Revues scientifiques à comité de lecture :

Understanding nucleotide binding and CFTR ion channel gating: where is the limit? Becq F and <u>Billet A.</u> **Expert Rev Respir Med.** (2010) Aug;4(4):451-4.

The C-terminus of nucleotide binding domain 1 contains critical features for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking and activation <u>Billet A</u>, Melin P, Jollivet M, Mornon JP, Callebaut I and Becq F. J Biol Chem. 2010 Jul 16;285(29):22132-40.

Identification of a novel water soluble activator of wild-type and F508del CFTR: GPact-11a.

Bertrand J, Boucherle B, <u>Billet A</u>, Melin-Heschel P, Dannhoffer L, Vandebrouck C, Jayle C, Routaboul C, Molina MC, Décout JL, Becq F and Norez C. Eur Respir J. 2010 Aug;36(2):311-22.

Communications avec actes dans un congrès international ou national :

Pharmacological and molecular dissection of the extremity of NBD1 of CFTR.

<u>Billet A</u>, Melin P, Callebaut I, Cuppens H and Becq F. *PEDIATRIC PULMONOLOGY Pages: 216-217 Supplement: Suppl. 32.* 2009 North American Cystic Fibrosis Conference, Minneapolis, USA

Molecular dissection of the MPB interacting site of CFTR.

<u>Billet A</u>, Melin P, Cuppens H and Becq F. *J.Cystic. Fibrosis vol 8 Suppl 2 :S18.* 32th European Cystic Fibrosis Conference, Brest, France, 2009.

G622 amino acid has a crucial role in pharmacological activation of CFTR chloride channel by benzo[*c*]quinolizinium.

<u>Billet A</u>, Melin P, Norez C, Bilan F, Mettey Y and Becq F. compounds. *J.Cystic. Fibrosis vol 7 Suppl 2 :S18.* 31st ECFS European Cystic Fibrosis Conference, Pragua, Czech Republic, 2008

The CF mutation G622D abolished CFTR chloride channel activation by benzo[*c*]quinolizinium compounds.

<u>Billet A</u>, Melin P, Norez C, Bilan F, Vandebrouck C, Mettey Y and Becq F. *PEDIATRIC PULMONOLOGY Pages: 220-220 Supplement: Suppl. 30.* 2007 North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, USA

Liste des communications

Présentations orales

Présentations en symposium & workshop :

- 7th ECFS Basic Science Conference, Carcavelos, Portugal, 2010. **Role of the C-terminal extremity of CFTR NBD1 in the control of CFTR activity.** <u>Billet A,</u> Jollivet M, Mornon J.P, Callebaut I and Becq F.
- 23th North American Cystic Fibrosis Conference, Minneapolis, USA, 2009. **Pharmacological and molecular dissection of the extremity of NBD1 of CFTR.** <u>Billet A</u>, Melin P, Callebaut I, Cuppens H and Becq F. *PEDIATRIC PULMONOLOGY Pages: 216-217 Supplement: Suppl. 32.*
- 1^{ère} journée des doctorants de l'école doctorale de Poitiers, Poitiers, France, 2009.
 Implication de l'extrémité c-terminale du NBD1 dans le mécanisme d'action des MPBs, activateur de CFTR.
 Billet A, Melin P and Becq F

Présentations orales de poster :

- 32th European Cystic Fibrosis Conference, Brest, France, 2009. **Molecular dissection of the MPB interacting site of CFTR.** <u>Billet A</u>, Melin P, Cuppens H and Becq F. *J.Cystic. Fibrosis vol 8 Suppl 2 :S18.*
- 31st ECFS European Cystic Fibrosis Conference, Pragua, Czech Republic, 2008
 G622 amino acid has a crucial role in pharmacological activation of CFTR chloride channel by benzo[c]quinolizinium compounds.
 <u>Billet A</u>, Melin P, Norez C, Bilan F, Mettey Y and Becq F.
 J.Cystic. Fibrosis vol 7 Suppl 2 :S18.

Présentations affichées

7th ECFS Basic Science Conference, Carcavelos, Portugal, 2010. **Role of the C-terminal extremity of CFTR NBD1 in the control of CFTR activity.** <u>Billet A</u>, Jollivet M, Mornon J.P, Callebaut I and Becq F.

Physiology & Pharmacology meeting (P2T), Bordeaux, France, 2010. Molecular dissection of the MPB interacting site of CFTR. Billet A, Melin P, Mornon J.P, Callebaut I and Becq F.

 23th North American Cystic Fibrosis Conference, Minneapolis, USA, 2009.
 Pharmacological and molecular dissection of the extremity of NBD1 of CFTR. <u>Billet A</u>, Melin P, Callebaut I, Cuppens H and Becq F. *PEDIATRIC PULMONOLOGY Pages: 216-217 Supplement: Suppl. 32.*

32th European Cystic Fibrosis Conference, Brest, France, 2009. **Molecular dissection of the MPB interacting site of CFTR.** <u>Billet A</u>, Melin P, Cuppens H and Becq F. *J.Cystic. Fibrosis vol 8 Suppl 2 :S18.*

Meeting of the "Association Canaux Ioniques", Giens, France, 2008.
 G622 amino acid has a crucial role in pharmacological activation of CFTR chloride channel by benzo[c]quinolizinium compounds.
 <u>Billet A</u>, Melin P, Norez C, Bilan F, Mettey Y and Becq F.

31st ECFS European Cystic Fibrosis Conference, Pragua, Czech Republic, 2008
 G622 amino acid has a crucial role in pharmacological activation of CFTR chloride channel by benzo[c]quinolizinium.
 <u>Billet A</u>, Melin P, Norez C, Bilan F, Mettey Y and Becq F. compounds.
 J.Cystic. Fibrosis vol 7 Suppl 2 :S18.

21st North American Cystic Fibrosis Conference, Anaheim, USA, 2007.
 The CF mutation G622D abolished CFTR chloride channel activation by benzo[c]quinolizinium compounds.
 <u>Billet A</u>, Melin P, Norez C, Bilan F, Vandebrouck C, Mettey Y and Becq F.
 PEDIATRIC PULMONOLOGY Pages: 220-220 Supplement: Suppl. 30.

Curriculum Vitae

BILLET Arnaud 3 av de la liberté app77 86180 Buxerolles Tel : 06.13.16.74.51 E-mail : arnaud.billet@univ-poitiers.fr

Formation :

- o 2010 : Doctorat en physiologie animale. Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie.
- o 2007 : Master 2 recherche, mention Biologie Santé et Agronomie, spécialité physiologie et biologie cellulaire et moléculaire (Poitiers 2006-2007), obtenu avec mention bien.
- o 2006 : Master 1, mention Biologie Santé et Agronomie, spécialité physiologie et biologie cellulaire, option physiologie animale et pharmacologie (Poitiers 2006), obtenu avec mention bien.
- o 2005 : Licence 3 de biologie, option physiologie cellulaire et moléculaire animale (Poitiers 2005), obtenu avec mention assez bien.
- o 2004 : DEUG Science de la vie (Dijon 2004).
- o 2002 : Diplôme Universitaire de Technologie, spécialité génie biologique option analyses biologiques et biochimiques (La Rochelle 2002).
- o 2000 : Baccalauréat scientifique option science de la vie et de la terre (Saintes 2000).

Expérience professionnelle :

Emplois Scientifiques :

Octobre 2007 - septembre 2010 : Allocataire de recherche (bourse de doctorat) au sein de l'équipe « Physiologie et Pharmacologie des Canaux Ionique » du laboratoire CNRS UMR 6187 de l'institut de physiologie et de biologie cellulaire de Poitiers (86).

<u>Projet :</u> Relations structure-fonction du CFTR : Étude de l'influence de l'extrémité C-terminale du NBD1 et de son environnement moléculaire sur l'adressage, l'activité et la pharmacologie des canaux

Marié 1 enfant o **Janvier-juin 2007**: Stage de recherche au sein de l'équipe « Canaux ionique et épithéliums » du laboratoire CNRS UMR 6187 de l'institut de physiologie et de biologie cellulaire de Poitiers (86).

<u>Projet :</u> Caractérisation électrophysiologique de deux mutants CFTR – Étude du mécanisme d'action des composés Benzo[c]quinolizinium.

o **Avril mai 2006**: Stage de recherche au sein de l'équipe Physiologie et Physiopathologie Musculaires du laboratoire CNRS UMR 6187 de l'institut de physiologie et de biologie cellulaire de Poitiers (86).

Projet : Étude de la cytotoxicité de bloqueurs de récepteurs IP3.

- o Mai 2005 : Stage d'observation en entreprise au sein d'un laboratoire d'analyses médicales à Poitiers (86) (laboratoire Muraine Blanchon Lhomme).
- o **Avril-juin 2002** : Stage en entreprise au sein d'un laboratoire d'analyses médicales à La Rochelle (17) (laboratoire Ferru Clerc).

Enseignement :

o **Octobre 2007 - septembre 2010**: Contrat de monitorat au sein de l'équipe pédagogique du département de physiologie animale de l'UFR SFA Poitiers, département 66a (physiologie animale):

200 heures d'enseignements de travaux pratiques :

- niveau L1 : notions de neurosciences et d'histologie.
- o niveau L3 : méthodologie scientifique
- niveau M1 : régulation des processus physiologiques, physiopathologie cellulaire expérimentale, pathologie des grandes fonctions (mise en place des TP).

40 heures d'enseignements de travaux dirigés :

- o niveau L1 : Biomolécules et organisme.
- o niveau M1 : Génétique moléculaire du développement.

Outils et compétences:

<u>Compétences techniques :</u>

- o Biologie moléculaire : mutagenèse dirigée, amplification et extraction des vecteurs plasmidiques, séquençage d'ADN, Western blot.
- o Maîtrise des tests de radio immunofluorescence, de survie cellulaire MTT et ELISA.

- o Biologie cellulaire : maîtrise des techniques de culture cellulaire et de transfection transitoire de plasmides.
- o Electrophysiologie moléculaire : Patch clamp : maîtrise de la configuration cellule entière et notions de canal unitaire ; notion de double microélectrodes.
- o Maîtrise des techniques d'efflux d'iodure manuelles et robotisées.

Connaissances informatiques :

- o Traitement de données et grapheurs scientifiques : Origin 6.0 et GraphPad Prism
- o Traitement d'image : Photopshop, Gimp, Confocal Assistant
- o Acquisition de données : pClamp 6 et 10 (*Molecular device*), Clampex 7.0 (*Axon Instrument*), Labchart 6 (*AD instrument*)
- o Maîtrise des outils internet et des logiciels courants de bureautique (word, excel, powerpoint)

Langues :

- o Langue maternelle : français
- o Bonnes connaissances en anglais

Fonction d'encadrement

2010 : Encadrement d'un étudiant de master recherche biologie santé. Stage de 6 mois sur l'étude de l'effet de l'extinction de l'expression de TRPC6 sur l'activité du canal CFTR.

Responsabilités collectives

2009/2010 : Représentant des doctorants et post-doctorants au sein du conseil de l'IPBC UMR CNRS 6187.

Résumé

Résumé : La protéine transmembranaire CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), impliquée dans la mucoviscidose est un canal chlorure régulée par l'ATP et l'AMPc. Les mécanismes de régulation des processus d'ouverture/fermeture du canal ne sont pas encore clairement démontrés mais depuis quelques années, les nouvelles données sur la structure moléculaire de la protéine ont permis des avancés dans ce domaine. Les objectifs de ce travail de recherche ont été de caractériser, par une étude de relation structure/fonction, le rôle de l'extrémité C-terminale du NBD1 et de son environnement moléculaire dans la régulation de la maturation ou de l'activité du canal ainsi que dans sa pharmacologie. Certains résidus déterminés par l'exploration des modèles moléculaires ont été mutés par mutagenèse dirigée puis les conséquences de ces mutations ont été analysées par les techniques de western blot, de patch clamp et d'efflux d'iodure. Nos travaux ont permis de mettre en évidence l'importance de l'intégrité de la structure en épingle à cheveux de l'extrémité C-terminale du NBD1 ainsi que de ses différentes liaisons, dans la maturation et l'activité du canal. Concernant le mécanisme d'action des composés MPB, composés à double action (activateur et correcteur de CFTR), nous avons montré que la perturbation directe de la structure de la β -hairpin rendait l'action des composés impossible alors que la perturbation de la liaison avec le Walker A du NBD2 induisait une meilleure action des MPB. Nos travaux ont donc permis de mettre en évidence un rôle important de l'extrémité Cterminale du NBD1 dans la régulation de l'adressage, de l'activité et de la pharmacologie du canal CFTR.

<u>Mots clés :</u> CFTR, mutations, électrophysiologie, structure des protéines, mutagenèse dirigée, régulation de l'activité, pharmacologie

<u>Abstract</u>: Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations of the gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). CFTR is a chloride channel regulated by ATP and cAMP. The regulation of the CFTR gating remains unclear. In this study we have investigated the role of the last β hairpin of NBD1 and its direct environment in the maturation, the activation and the pharmacology of the channel. We also performed a

molecular dissection of CFTR by examining several CFTR mutants (constructed by site directed mutagenesis and tested by western blot, patch clamp recording and iodide efflux) located in the last β hairpin of NBD1 or in contact with it. Our results indicated that the integrity of the beta hairpin (and in particular the orientation of the two latest β strands) and its links with other domains is important for the maturation, the activity but also the pharmacology of the channel. All these results suggest an important influence of the C-terminus of the NBD1 for the control of CFTR channel gating and protein trafficking.

Keywords: CFTR, mutations, electrophysiology, protein structure, site-directed mutagenesis, activity regulation, pharmacology