

## THÈSE

Pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS  
UFR des sciences fondamentales et appliquées  
Institut de physiologie et biologie cellulaires - IPBC (Poitiers)  
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)  
Secteur de recherche : Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie

Présentée par :  
Raëd Farhat

### **Multiples conséquences physiopathologiques de mutations et d'allèles complexes du gène CFTR : l'importance des études génétique, moléculaire, cellulaire & in silico dans la détermination de l'impact de ces variations sur l'épissage et la protéine**

Directeur(s) de Thèse :  
Véronique Ladeveze

Soutenue le 03 juillet 2014 devant le jury

#### Jury :

Président	<b>Alain Kitzis</b>	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Rapporteur	<b>Isabelle Creveaux</b>	Professeur des Universités, Université de Clermont-Ferrand 1
Rapporteur	<b>Jean-Paul Bonnefont</b>	Professeur des Universités, Université René Descartes
Membre	<b>Véronique Ladeveze</b>	Maître de conférences, Université de Poitiers
Membre	<b>Faten El Hage</b>	Docteur, Université Saint-Esprit de Kaslik, Liban
Membre	<b>Naim Ouaini</b>	Professeur, Université Saint-Esprit de Kaslik, Liban

#### **Pour citer cette thèse :**

Raëd Farhat. *Multiples conséquences physiopathologiques de mutations et d'allèles complexes du gène CFTR : l'importance des études génétique, moléculaire, cellulaire & in silico dans la détermination de l'impact de ces variations sur l'épissage et la protéine* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2014. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

# THESE

Pour l'obtention du Grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS**  
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)  
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

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

\*\*\*\*\*

Présentée par :

**Raëd FARHAT**

\*\*\*\*\*

## **MULTIPLES CONSÉQUENCES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE MUTATIONS ET D'ALLÈLES COMPLEXES DU GÈNE *CFTR* :**

L'IMPORTANCE DES ÉTUDES GÉNÉTIQUE, MOLÉCULAIRE, CELLULAIRE & *IN SILICO* DANS  
LA DÉTERMINATION DE L'IMPACT DE CES VARIATIONS SUR L'ÉPISSAGE ET LA PROTÉINE.

\*\*\*\*\*

Directeur de Thèse : **Dr. Véronique LADEVEZE**

\*\*\*\*\*

Soutenue le 3 Juillet 2014

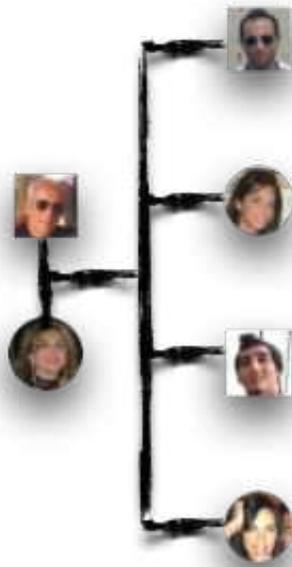
devant la Commission d'Examen

\*\*\*\*\*

## **JURY**

Rapporteurs :	Professeur <b>Isabelle CREVEAUX</b>	Université de Clermont-Ferrand
	Professeur <b>Jean-Paul BONNEFONT</b>	Université René Descartes
Examineurs :	Professeur <b>Naïm OUAINI</b>	Université Saint-Esprit du Kaslik, Liban
	Docteur <b>Faten EL HAGE</b>	Université Saint-Esprit du Kaslik, Liban
	Professeur <b>Alain KITZIS</b>	Université de Poitiers
	Docteur <b>Véronique LADEVEZE</b>	Université de Poitiers





*A vous...  
Papa, Maman...  
Dina, Bassel, Acif*

## REMERCIEMENTS

Je remercie d'abord le Professeur Alain Kitzis, directeur du laboratoire de Génétique Moléculaire des Maladies Rares, qui m'a accueilli durant les années de ma thèse au sein de son équipe et qui a continuellement assuré l'avancement de mes travaux administrativement et scientifiquement.

Je tiens à exprimer ma plus profonde et sincère reconnaissance à ma directrice de thèse, Dr. Véronique Ladeveze, pour m'avoir offert la possibilité d'entamer mes études doctorales. Grâce à ses compétences scientifiques, ses qualités personnelles et sa disponibilité ininterrompue, j'ai réussi à accomplir ce travail dans les meilleures conditions professionnelles et humaines. Je la remercie pour tous les efforts fournis durant les quatre années de doctorat et pour l'impact positif qu'elle a certainement apporté à mon avenir.

Ma reconnaissance va également, et avec une forte ampleur, à notre assistante de recherche, Madame Marie-Claude Pasquet. Grâce à son soutien technique et moral, j'ai pu surmonter avec succès les moments les plus difficiles aussi bien au niveau de la thèse qu'au niveau personnel. Sa présence dans notre équipe a sûrement ajouté une touche exceptionnelle et irremplaçable à ma thèse et à mon séjour à Poitiers.

Je remercie le Dr. Ayman El-Seedy pour ses conseils pertinents et son aide continue, Géraldine Puissesseau, Kamal El-Moussaoui, Leyla Bellion, Ariestya Indah Permata Sari, Konstantin Masliantsev pour avoir chacun participé à la réalisation de plusieurs parties de ces travaux durant leurs stages de licences et de master. Je remercie aussi le personnel du laboratoire de Génétique Moléculaire des Maladies Rares qui m'a marqué par sa solidarité, l'esprit d'équipe et l'ambiance familiale.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé à l'accomplissement de ce travail, notamment le Dr. Caroline Norez pour son investissement, son temps et ses compétences lors de la réalisation des expériences de fonctionnalité et le Dr Anne Cantereau pour

m'avoir transmis ses connaissances et son expérience et m'a permis ainsi d'obtenir les images de la microscopie confocale.

Je remercie Madame Catherine Adolphe pour l'aide perpétuelle qu'elle a apportée dans toutes les expériences de culture cellulaire, ainsi que Mr. James Habrioux pour consacrer plusieurs journées à la résolution des problèmes informatiques qui ont failli être irréversibles. Je remercie aussi Madame Marie-Claude Martin pour son aide continue.

Je remercie l'école doctorale BioSanté, représentée par son directeur le Pr. Gérard Mauco, pour me permettre de m'inscrire dans le cycle de doctoral. Je remercie le Pr. Frédéric Becq pour m'avoir admis à l'Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaire en 2011. Je remercie aussi Madame Sabrina Biais et Madame Sylvie Perez qui ont assuré toutes les procédures administratives relatives aux inscriptions et autres aspects de la thèse. De même, je remercie Mr. François Baty-Sorel pour ses conseils utiles à la valorisation du rôle du doctorant dans son équipe et de la thèse.

Je remercie le Pr. Alain Kitzis pour accepter de présider le jury de thèse. Je remercie particulièrement le Pr. Isabelle Creveaux et le Pr. Jean-Paul Bonnefont pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse et le Pr. Naim Ouaini et le Dr. Faten El Hage pour accepter d'examiner ce travail.

Je remercie le CNRS-Libanais, représenté par son directeur général le Pr. Mouïñ Hamzé, pour avoir financé mes études doctorales. De même, je remercie le Pr. Charles Tabet, responsable du programme de bourse au CNRS-Libanais, pour son soutien continu et ses réponses rapides aux demandes répétitives et variables. Je tiens à remercier fortement l'association Vaincre la Mucoviscidose au Liban et spécialement sa présidente Madame Bella Kabbout qui, par son soutien, a été à l'initiation de ce projet.

Je remercie l'Université Saint-Esprit du Kaslik pour l'aide qu'elle m'a apportée pour amorcer le contact avec l'Université de Poitiers. Je tiens ainsi à remercier le Pr. Naim Ouaini, le Dr Faten El Hage, le Dr. Claude Daou et Dr. Magida Jalbout pour avoir participé, chacun à sa manière, à mon arrivée en doctorat.

Je remercie également le Pr. André Mégarbané, responsable de l'unité de Génétique Médicale à la Faculté de Médecine de l'Université Saint-Joseph à Beyrouth, Madame Sandra Corbani et le Dr. Nancy Choucair pour l'énorme travail fourni lors de l'obtention des ADN des patients libanais.

Je remercie tous mes amis, particulièrement Joëlle Jandry. Grâce à son amitié, je suis arrivé à Poitiers où nous avons concrétisé plusieurs rêves et vécu pleins d'aventures. Je remercie mes amis Pamela Abdallah, Nasma Najjar, Soumaya Hamieh, Gizlan Abdelli, Nicol Nehme, Majed Moubarak, Mario Abboud, Dritan Tola, Nicoleta Nastase, Alina Bot, Joana Xhemali et Christina Mezher pour avoir marqué, à jamais, ma vie en partageant des moments inoubliables. Je remercie aussi mes amis du « Nede » et tous mes amis au Liban pour avoir gardé toujours le même lien quelles que soient les distances.

Je remercie tous les membres de ma grande famille ; mes grands-parents, mes tantes, mes oncles, mes cousines et cousins. Vous êtes pour moi, la plus grande motivation pour aller plus loin.

Enfin, je dédie cette thèse ; A Papa et Maman. Vous êtes la source de tous les succès de ma vie et j'espère pouvoir valoriser une partie de vos sacrifices et de votre amour inconditionnel à travers l'accomplissement de mes études doctorales. A ma sœur Dina, mon frère Bassel et ma sœur Acil, je vous aime infiniment.

## LISTE DES ABBREVIATIONS

A	Absorbance
ABC	ATP Binding Cassette
ABCD	Absence bilatérale congénitale des canaux déférents
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adenosine Monophosphate cyclique
APS	Ammonium Persulfate
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adenosine triphosphate
BCA	Bicinchoninic acid
BET	Bromure d'éthidium
bp	base pair(s)
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CBAVD	Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CF	Cystic fibrosis
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CFTR-RD	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator-Related Diseases
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CMV	Cytomégalovirus

DC	Dichroïsme Circulaire
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Diméthyl Sulfoxide
dNTP	Désoxyribonucléotide
DTM	Domaine TransMembranaire
DTT	Dithiothréitol
DOC	Deoxycholate
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
ENaC	Epithélial NA <sup>+</sup> channel, (canal sodique épithélial)
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	Endoplasmic reticulum associated degradation
ESE	Exonic Splicing Enhancers
ESS	Exonic Splicing Silencers
GFP	Green fluorescent protein
HSF	Human Splice Finder
Kb	Kilo base
LB	Luria-Bertani
LPC	Liquide Periciliaire
mRNA	messenger ribonucleic acid
NBD	Nucleotide Binding Domain
NMD	nonsense-mediated Decay
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
pdb	paire de bases
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldéhyde
PI	Pancreatic-insufficient cystic fibrosis
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C

PP2A	Protéine phosphatase 2A
PP2C	Protéine phosphatase 2C
PS	Pancreatic-sufficient cystic fibrosis
RE	Réticulum Endoplasmique
rpm	révolution par minute
RT	Reverse transcriptase
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression
TAE	Tris-acetate, EDTA buffer
TIR	Trypsine Immuno-Réactive
TEMED	N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline Tween
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane
UV	Ultra-Violet

# TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS .....</b>	<b>VII</b>
<b>Chapitre 1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1. La mucoviscidose.....</b>	<b>1</b>
1.1. Définition de la mucoviscidose .....	1
1.2. Les éléments du phénotype de la mucoviscidose .....	1
1.3. CF et CFTR-RD .....	2
1.4. Physiopathologie de la mucoviscidose .....	4
1.4.1. Physiopathologie de la mucoviscidose au niveau respiratoire.....	4
1.4.2. Physiopathologie de la mucoviscidose au niveau digestif.....	5
1.5. Epidémiologie de la mucoviscidose .....	6
1.6. Techniques de diagnostic et de dépistage.....	8
1.6.1. Trypsine Immuno-réactive .....	8
1.6.2. Test de la sueur .....	8
1.6.3. Tests de biologie moléculaire .....	9
1.7. Les traitements symptomatiques de la mucoviscidose.....	10
1.8. Les axes de recherche .....	10
1.8.1. Les axes de recherche de la microbiologie et de l'immunologie .....	10
1.8.2. Les axes de recherche de la génétique et la thérapie génique.....	10
1.8.3. Les axes de recherche de la pharmacothérapie.....	11
<b>2. La protéine CFTR .....</b>	<b>11</b>
2.1. CFTR : une protéine de la superfamille ABC .....	11
2.1.1. Propriétés des Transporteurs ABC.....	11
2.1.2. Domaines et fonctionnement d'un Transporteur ABC .....	12
2.1.3. Caractéristiques de la protéine CFTR par rapport aux autres transporteurs ABC.....	14
2.1.4. Le domaine R de la protéine CFTR .....	15
2.2. Propriétés, localisations, fonctions et synthèse de la protéine CFTR.....	17
2.2.1. Propriétés de la protéine CFTR.....	17
2.2.2. Tissus exprimant la protéine CFTR.....	17
2.2.3. Fonctions de la protéine CFTR .....	17
2.2.4. Biosynthèse et maturation de la protéine CFTR.....	19
<b>3. Le Gène CFTR.....</b>	<b>22</b>
3.1. Localisation du gène <i>CFTR</i> .....	22
3.2. Séquence et taille du gène <i>CFTR</i> .....	22
3.3. Régulation de la transcription du gène <i>CFTR</i> .....	23
3.4. Duplication de la région de l'exon 10 chez l'Humain .....	23
<b>4. Les mutations du gène CFTR .....</b>	<b>24</b>
4.1. Origines et répartitions mondiales des mutations les plus fréquentes.....	25
4.2. La mutation c.1521_1523delCTT (p.Phe508del) .....	26
4.3. Les classes de mutations.....	28
4.3.1. Mutations de classe I.....	28
4.3.2. Mutations de classe II .....	28
4.3.3. Mutations de classe III .....	28
4.3.4. Mutations de classe IV.....	29
4.3.5. Mutations de classe V .....	29
4.3.6. Mutations de classe VI.....	30
4.4. Traitements pharmacologiques des mutations .....	30
4.5. Epissage, épissage alternatif et mutations d'épissage. ....	33
4.5.1. Epissage.....	33

4.5.2.	Epissage alternatif .....	33
4.5.3.	Les mutations induisant un épissage alternatif .....	34
4.5.4.	L'épissage alternatif dans le gène CFTR : la séquence polymorphe c.[1210-35TG(m);-12T(n)] de l'intron 9 .....	35
<b>5.</b>	<b>Corrélation génotypes-phénotypes.....</b>	<b>38</b>
5.1.	La variabilité des tableaux cliniques .....	38
5.2.	Rareté de la plupart des mutations.....	38
5.3.	Variabilité de la gravité des mutations.....	39
5.4.	Diversité des associations des mutations en trans .....	39
5.5.	Diversité des associations des mutations en cis.....	40
5.6.	Présence des séquences polymorphes induisant un épissage alternatif variable.....	40
5.7.	Influence d'autres facteurs .....	40
<b>6.</b>	<b>Les mutations et les allèles complexes étudiés dans ces travaux.....</b>	<b>41</b>
<b>Chapitre 2</b>	<b>Matériels et Méthodes .....</b>	<b>44</b>
<b>1.</b>	<b>Techniques de biologie moléculaire .....</b>	<b>44</b>
1.1.	Les acides nucléiques utilisés .....	44
1.1.1.	ADN génomique .....	44
1.1.2.	Plasmides.....	45
1.1.3.	ARN.....	47
1.2.	Les techniques de base utilisées.....	47
1.2.1.	Techniques d'extraction.....	47
1.2.2.	Dosage des acides nucléiques.....	49
1.2.3.	Amplification par Polymerase Chain Reaction.....	50
1.2.4.	Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	50
1.2.5.	Electrophorèse d'ADN sur gel de polyacrylamide .....	51
1.2.6.	Séquençage .....	51
1.3.	La construction de minigène hybride .....	52
1.3.1.	Préparation du plasmide pTBNdeI.....	53
1.3.2.	Préparation de l'insert.....	54
1.3.3.	Ligature .....	55
1.4.	La mutagenèse dirigée .....	55
1.4.1.	Méthylation.....	56
1.4.2.	Insertion de la mutation.....	56
1.4.3.	Dégradation des plasmides parentaux .....	56
1.5.	Manipulation de l'ARN .....	57
1.5.1.	Préparation de l'ADN complémentaire (ADNc) .....	57
1.5.2.	Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) .....	58
<b>2.</b>	<b>Techniques de microbiologie .....</b>	<b>59</b>
2.1.	Type, maintien et conservation du matériel biologique .....	59
2.1.1.	Type de bactéries utilisées.....	59
2.1.2.	Culture bactérienne.....	59
2.1.3.	Stockage des bactéries.....	59
2.2.	Transformation des bactéries .....	60
2.2.1.	Préparation des cellules compétentes .....	60
2.2.2.	Technique de la transformation bactérienne .....	60
<b>3.</b>	<b>Techniques de culture cellulaire.....</b>	<b>61</b>
3.1.	Types de lignées cellulaires.....	61
3.2.	Congélation des lignées cellulaires .....	61
3.3.	Décongélation des lignées cellulaires .....	62
3.4.	Entretien des lignées cellulaires.....	62
3.5.	Transfection des lignées cellulaires.....	63
<b>4.</b>	<b>Techniques de Biochimie et biologie cellulaire .....</b>	<b>64</b>

4.1.	Détermination de la localisation protéique par microscopie confocale .....	64
4.1.1.	Fixation et perméabilisation des cellules .....	64
4.1.2.	Incubation avec les anticorps .....	65
4.1.3.	Observation par microscopie confocale.....	65
4.2.	Détermination de la maturation protéique par western blotting.....	66
4.2.1.	Extraction des protéines .....	66
4.2.2.	Dosage des protéines.....	66
4.2.3.	Dénaturation des protéines .....	67
4.2.4.	Western Blotting .....	67
<b>5.</b>	<b>Techniques de physiologie cellulaire .....</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>Etudes <i>in silico</i> .....</b>	<b>72</b>
6.1.	Programme informatique pour déterminer les effets des mutations sur l'épissage.....	72
6.2.	Programme pour estimer la gravité d'une substitution d'un acide aminé dans CFTR.....	73
6.3.	Programme pour déterminer la conservation d'un acide aminé dans une protéine au cours de l'évolution.....	74
6.4.	Programme pour modéliser la structure tridimensionnelle de CFTR.....	74
<b>Chapitre 3</b>	<b>Résultats et Discussions .....</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>Etudes de la mutation c.1392G&gt;T et de ses allèles complexes .....</b>	<b>76</b>
7.1.	Contexte des études de la mutation c.1392G>T .....	76
7.2.	Etude <i>in silico</i> de la mutation c.1392G>T .....	77
7.3.	Article concernant les études de la mutation c.1392G>T.....	79
7.4.	Annexes .....	108
<b>8.</b>	<b>Etudes de la mutation c.3909C&gt;G et de son allele complexe dans la population libanaise.....</b>	<b>110</b>
8.1.	Contexte des études de la mutation c.3909C>G.....	110
8.2.	Mise en évidence d'un allèle complexe.....	111
8.3.	Contexte géographique et historique de la mutation c.3909C>G .....	111
8.4.	Etude <i>in silico</i> de la mutation c.3909C>G.....	113
8.5.	Article concernant les études de la mutation c.3909C>G.....	114
8.6.	Annexes .....	146
<b>9.</b>	<b>Etude de la mutation c.965T&gt;C.....</b>	<b>148</b>
9.1.	Contexte des études de la mutation c.965T>C .....	148
9.2.	Etude <i>in silico</i> de la mutation p.Val322Ala.....	148
9.3.	Article concernant les études de la mutation c.965T>C.....	149
9.4.	Annexes .....	165
<b>Chapitre 4</b>	<b>Conclusions et Perspectives .....</b>	<b>166</b>
<b>1.</b>	<b>Conclusions générales .....</b>	<b>166</b>
1.1.	« Les études d'une mutation » et non pas « L'étude d'une mutation » .....	168
1.2.	Les études d'une mutation dans le cadre de ses allèles complexes .....	169
1.3.	Utilité de la prédiction des effets d'une mutation par les programmes informatiques ?	170
1.4.	Les études d'une mutation dans une population : Cas de c.3909C>G .....	172
1.5.	Situation de la Mucoviscidose au Liban .....	173
<b>2.</b>	<b>Perspectives .....</b>	<b>175</b>
<b>REFERENCES.....</b>		<b>177</b>
<b>CURRICULUM VITAE ET PUBLICATIONS .....</b>		<b>196</b>
<b>RESUME.....</b>		<b>219</b>
<b>ABSTRACT.....</b>		<b>220</b>

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

### 1. LA MUCOVISCIDOSE

#### 1.1. Définition de la mucoviscidose

La mucoviscidose est la maladie rare la plus fréquente chez la population caucasienne. La Haute Autorité de Santé en France a établi en 2009 un état des lieux concernant la mucoviscidose après 5 ans de mise en place du dépistage néonatal systématique en France (Haute Autorité de Santé, 2006). Dans son rapport elle définit la mucoviscidose en se basant sur le travail de Rosenstein et Cutting: « Selon le consensus de la Cystic Fibrosis Foundation établi en 1998, la mucoviscidose se définit par la présence d'au moins une des manifestations cliniques de la maladie, un antécédent de mucoviscidose dans la fratrie, ou un résultat positif du dépistage néonatal, plus une anomalie du fonctionnement de la protéine CFTR identifiée par une élévation de la concentration de chlorure dans la sueur ou l'identification de deux mutations à l'origine de la mucoviscidose, ou la démonstration *in vivo* d'anomalies caractéristiques du transport d'ions dans l'épithélium nasal (Rosenstein et Cutting, 1998 ) ».

#### 1.2. Les éléments du phénotype de la mucoviscidose

Les éléments du phénotype de la mucoviscidose ont été déterminés en 1998 par Rosenstein et Cutting puis une meilleure compréhension de la maladie a conduit la *Cystic Fibrosis Foundation* à établir une nouvelle définition sur la base d'un consensus d'experts (Farrell *et al.*, 2008). En effet, selon ces auteurs, les éléments du phénotype de la mucoviscidose sont les suivants : maladie sino-pulmonaire chronique, anomalies gastro-intestinales ou nutritionnelles, syndrome de déplétion sodique et/ou anomalies urogénitales masculines.

Les symptômes sino-pulmonaires sont dûs à une colonisation persistante par des germes pathogènes caractéristiques de la mucoviscidose dont *S. aureus*, *H. influenzae* non typable, *P. aeruginosa* mucoïde et non mucoïde, *S. maltophilia* et *B. cepacia*, une toux chronique productive, une anomalie persistante de la radiographie pulmonaire, une obstruction des voies aériennes qui se traduit par un sifflement et un piégeage de l'air, des polypes nasaux, des anomalies des sinus paranasaux et un hippocratisme digital,...

Les symptômes gastro-intestinaux sont pancréatiques (insuffisance pancréatique, pancréatite chronique, anomalies pancréatiques identifiées par imagerie), intestinaux (ileus méconial, syndrome d'obstruction intestinale distale, prolapsus rectal), hépatiques (ictère néonatal prolongé, hépatopathie chronique avec aspects cliniques ou histologiques de cirrhose biliaire focale ou de cirrhose multilobaire).

Les symptômes nutritionnels se manifestent par un retard de croissance staturo-pondéral, une hypoprotéïnémie et de l'œdème ou des complications d'un déficit en vitamines liposolubles.

Le syndrome de déplétion sodique se caractérise de façon aiguë et une alcalose métabolique chronique.

Les anomalies urogénitales masculines entraînent une azoospermie obstructive. (Farrell *et al.*, 2008).

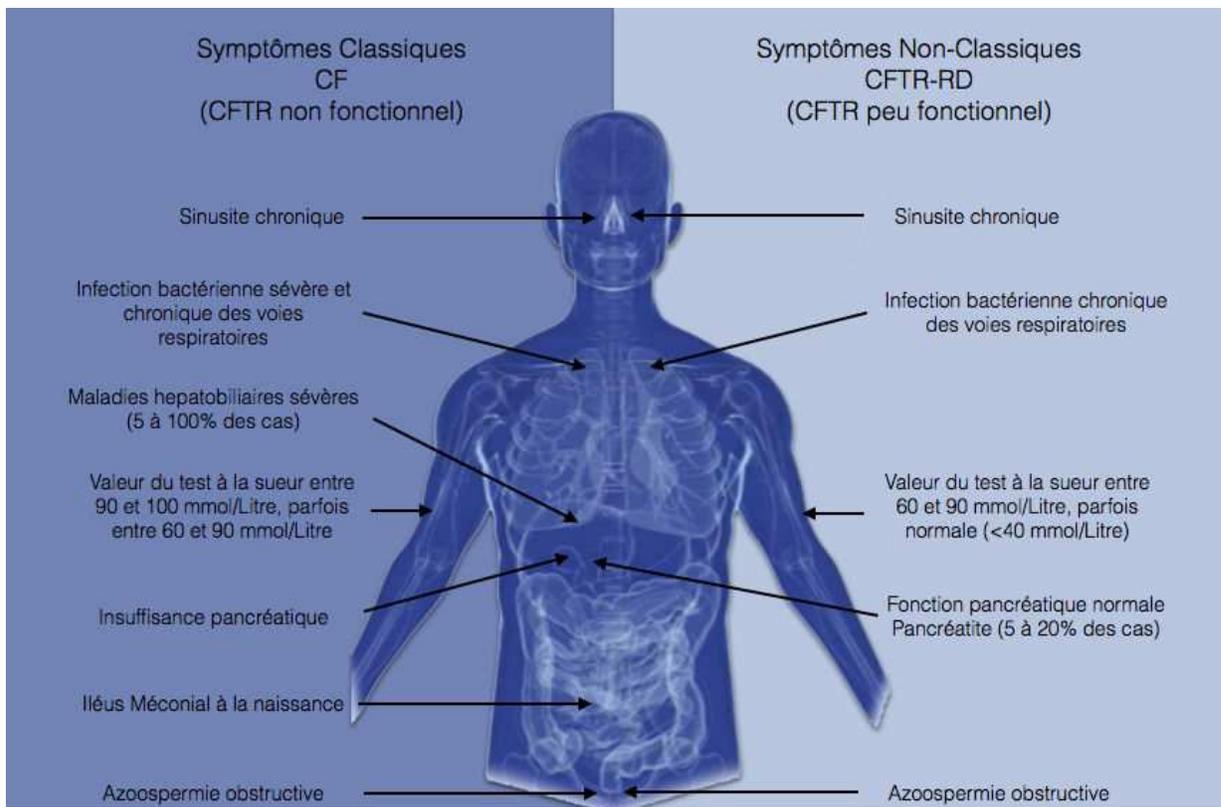
### 1.3. CF et CFTR-RD

Les éléments du phénotype de la mucoviscidose regroupent des manifestations cliniques très variables. Un phénotype peut présenter un tableau clinique classique avec l'atteinte sévère de plusieurs organes. Ainsi un consensus issu d'un travail européen a distingué deux formes de la mucoviscidose : la mucoviscidose classique ou typique (CF : *Cystic Fibrosis*) et la mucoviscidose non classique ou atypique (CFTR-RD : *CFTR-Related Disorder*) (**Figure 1**).

La mucoviscidose classique ou typique est définie par la présence d'au moins une manifestation clinique de la mucoviscidose et une concentration en chlorure de la sueur  $\geq 60$  mmol/L (Haute Autorité de Santé, 2006). La mucoviscidose non classique ou atypique est définie par la présence d'au moins une caractéristique phénotypique de la

mucoviscidose, un niveau de chlorure dans la sueur normal ( $< 30$  mmol/L chez le nourrisson,  $< 40$  mmol/L chez l'enfant) ou intermédiaire (30/40-59 mmol/L) (Haute Autorité de Santé, 2006).

Un phénotype CFTR-RD est connu comme une entité clinique associée avec un dysfonctionnement de CFTR et ne répond pas à tous les critères d'un phénotype CF. Trois entités cliniques résument le phénotype CFTR-RD : une Absence Congénitale Bilatérale des Canaux Déférents (ABCD), une pancréatite récurrente ou chronique et/ou une bronchectasie. Dans les trois entités cliniques indiquées, un dysfonctionnement de CFTR doit être visualisé pour déterminer un phénotype CFTR-RD (Bombieri *et al.*, 2011). En général, la forme atypique peut affecter un ou plusieurs organes, la fonction pancréatique exocrine est généralement conservée et l'atteinte pulmonaire moins sévère que dans la forme classique.



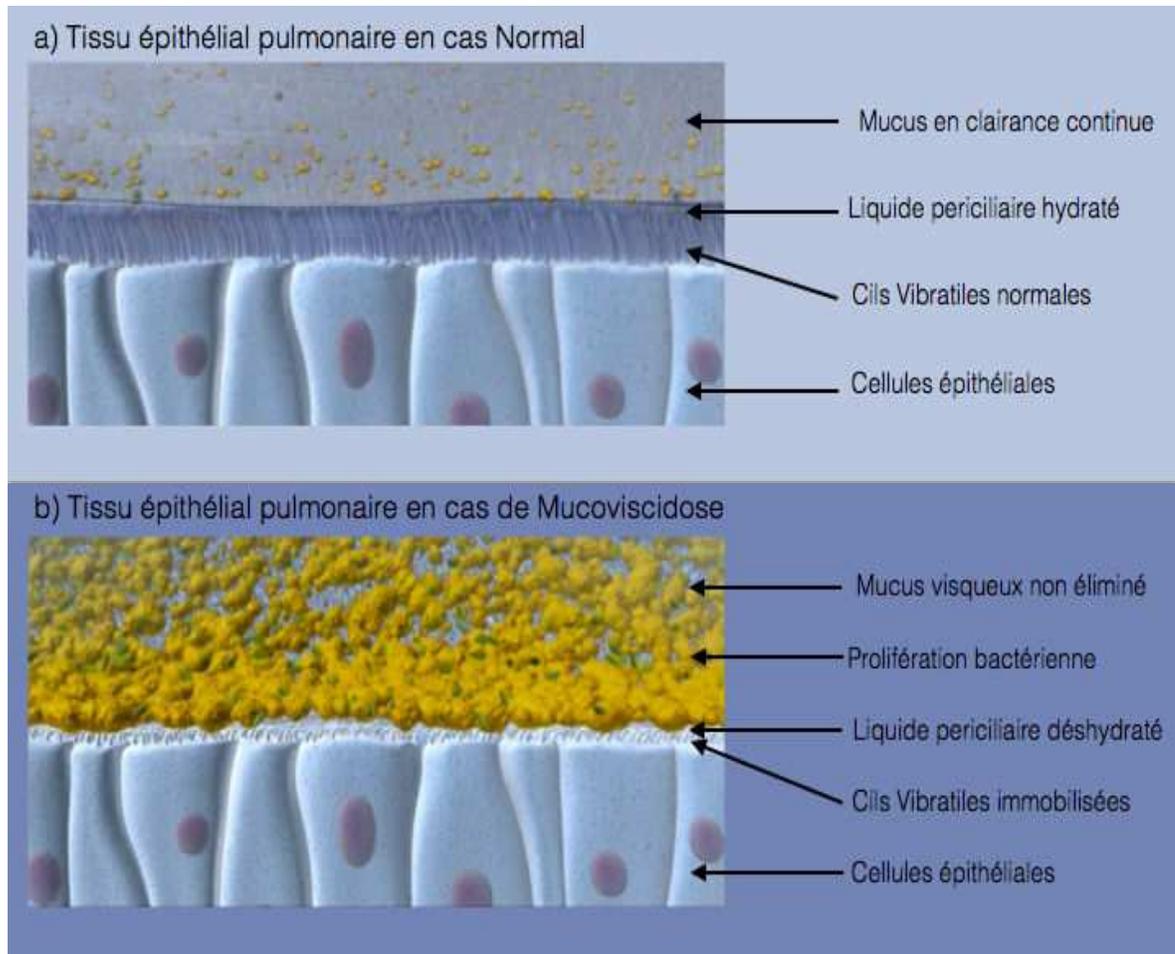
**Figure 1** : Les symptômes de la mucoviscidose classiques (CF) et non classiques (CFTR-RD).

(Source: Le dessin du corps provient du site <https://www.cfrscience.com/>)

## 1.4. Physiopathologie de la mucoviscidose

### 1.4.1. Physiopathologie de la mucoviscidose au niveau respiratoire

Plusieurs systèmes assurent la protection des voies respiratoires contre les agents nocifs auxquels elles sont continuellement exposées. Le système de clairance mucociliaire et le système immunitaire sont deux principaux mécanismes de défense du système respiratoire.



**Figure 2 :** Clairance mucociliaire dans des tissus épithéliaux pulmonaires normal et mucoviscidosique. a) Tissu épithélial normal : L'hydratation normale du liquide périciliaire permet le mouvement normal des cils vibratiles des cellules épithéliales. Ce mouvement induit la clairance continue du mucus. b) Tissu épithélial mucoviscidosique : L'absence de l'hydratation normale du liquide périciliaire empêche le mouvement normal des cils vibratiles des cellules épithéliales et induit en conséquence l'accumulation du mucus et la prolifération bactérienne.

(Source: Les dessins des tissus proviennent du site <https://www.cftrscience.com/>)

Les cellules épithéliales qui tapissent les parois respiratoires présentent, côté luminal, des cils vibratiles qui assurent par leurs battements continus l'expulsion des agents nocifs. Ces cils baignent dans une couche liquide appelée « sol » ou « liquide periciliaire » (LPC). Cette première couche se trouve au-dessous d'une autre couche plus visqueuse appelée « mucus ».

La couche de mucus contient une panoplie d'épitopes constitués d'hydrates de carbone où sont piégées les particules inhalées. Le LPC est très complexe et spécifiquement structuré afin de procurer un environnement ne freinant pas le battement ciliaire tout en permettant un couplage mécanique efficace entre l'extrémité des cils et la couche de mucus (Donaldson et Boucher, 2006). Le transport du chlorure et d'autres ions assure l'hydratation du LPC et le maintien d'une hauteur adéquate pour un battement normal des cils (Tarran *et al.*, 2001). Ainsi, le LPC peut également fonctionner comme un lubrifiant évitant que la couche muqueuse n'adhère aux surfaces cellulaires, ce qui facilite l'élimination du mucus sous l'effet des battements ciliaires (Raviv *et al.*, 2003) **(Figure 2a)**.

Dans le cas de la mucoviscidose, la raréfaction du LPC et la formation de plaques adhérentes de mucus sur la surface des voies aériennes induisent un environnement propice à la prolifération des bactéries spécifiques, favorisant une colonisation bactérienne et une infection des poumons et des voies respiratoires. (Matsui *et al.*, 2005 ; Donaldson et Boucher, 2006) **(Figure 2b)**.

#### 1.4.2. Physiopathologie de la mucoviscidose au niveau digestif

L'organe majeur du système digestif affecté par la mucoviscidose est le pancréas, toutefois l'estomac, le foie, l'intestin, la vésicule biliaire sont aussi plus ou moins touchés.

### 1.5. Epidémiologie de la mucoviscidose

La prévalence de la mucoviscidose est variable en fonction des populations et de leurs localisations géographiques. Cette variabilité résulte de la distribution et de la fréquence des mutations responsables de la maladie (Bobadilla *et al.*, 2002). La migration des populations et le mariage consanguin sont aussi des facteurs influents. La mucoviscidose a la fréquence la plus élevée dans les populations du nord de l'Europe et diminue dans les pays du sud du continent (**Figure 3**). Dans des pays comme l'Irlande et la Grande-Bretagne un nouveau né sur 1500 à 2500 naissances est atteint de la mucoviscidose. Par contre dans des pays comme l'Espagne et la Grèce, la fréquence est de 1/3500. Dans les pays comme la France et l'Italie, un gradient décroissant nord-sud est notable avec une incidence nationale de 1/2500. Toutefois, dans les pays Scandinaves et de l'Europe de l'Est, la fréquence varie entre 1/3500 et 1/7500 avec une incidence très faible en Finlande (1/25000).

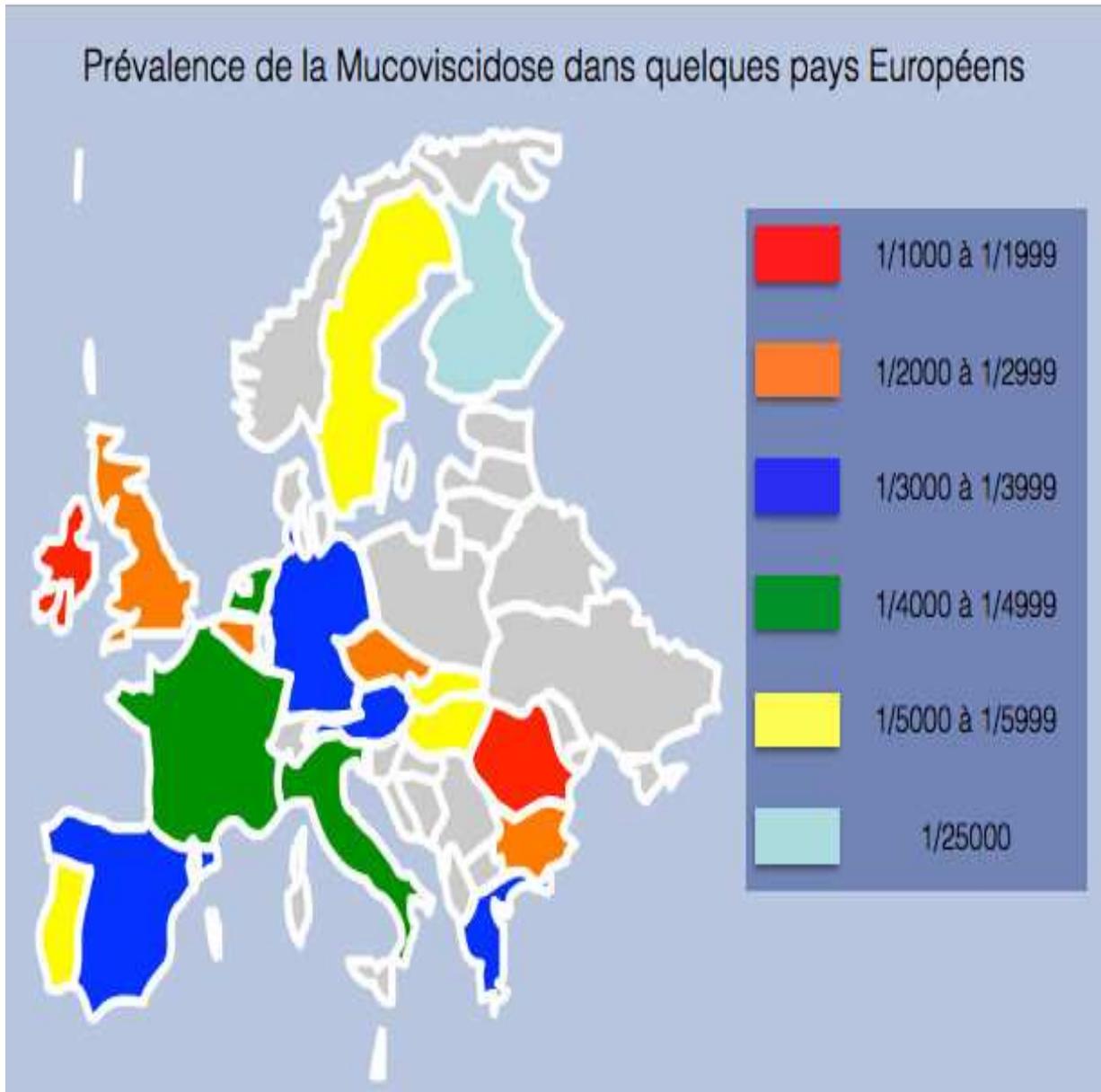
Aux Etats-Unis et au Canada, la fréquence de la maladie est proche de 1/3700. Cette fréquence est déterminée par la migration des populations caucasiennes dans ces pays. En Amérique du Sud, la fréquence est de 1/3900 dans des pays comme l'Uruguay et l'Argentine où la population est 90% caucasoïde et est réduite jusqu'à 1/8500 dans des pays comme le Mexique, la Colombie et le Chili où la population est composée de 57% à 85% de métis (caucasoïde et amérindien).

Au Moyen-Orient, l'incidence de la mucoviscidose varie en fonction des groupes ethniques et le taux de mariage consanguin. Lors des études effectuées dans ces pays, la fréquence maximale a été observée pour la Jordanie (1/2500) alors que la minimale est détectée pour les Emirats-Arabes (1/16000). A noter qu'en Turquie l'incidence est de 1/10000.

En Asie, les cas de mucoviscidose sont très limités. En Inde, l'incidence est de 1/100000 et au Japon elle est de 1/350000 indiquant une quasi-absence de la maladie dans les populations asiatiques.

En Océanie, la fréquence est similaire à celle de l'Europe avec une fréquence de 1/2500 en Australie.

En Afrique, il n'existe pas d'informations sur l'incidence de la maladie.



**Figure 3 :** Prévalence de la Mucoviscidose dans quelques pays Européens.

(Source : Les valeurs sont obtenues de la carte présente sur le site CFTRScience, <https://www.cftrscience.com/epidemiology.php>)

## 1.6. Techniques de diagnostic et de dépistage

### 1.6.1. Trypsine Immuno-réactive

La trypsine est une sérine protéase synthétisée par les cellules du pancréas. Elle est produite sous forme de précurseurs les trypsinogènes 1 et 2. Les trypsinogènes inactifs sont normalement sécrétés dans le duodénum où ils sont transformés en trypsine 1 et 2. Les trypsines 1 et 2 sont aussi présentes dans le sang. La détection du taux de trypsine dans le sang peut être réalisée par le test de Trypsine Immuno-Réactive (TIR). Le test s'effectue sur une goutte de sang séchée et les techniques de dosage sont des immunoessais capables de détecter le trypsinogène 1 et la trypsine 1 (Bossuyt et Boeynaems, 2001).

Il a été démontré que le taux de TIR augmente chez 90% des nouveau-nés atteints de la mucoviscidose (Parad et Comeau, 2005 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2006). En effet, chez ces patients les trypsinogènes s'infiltrant dans le sang suite à l'obstruction des canaux pancréatiques par le mucus visqueux. Le dépistage néonatal de la mucoviscidose est une technique fiable et facile. Le test de TIR est effectué trois jours après la naissance. Le seuil normal de TIR est inférieur à 60µg/L. Dans les cas où cette valeur dépasse le seuil, un génotypage sera demandé. Si aucune mutation *CFTR* n'est identifiée, un test de TIR est effectué à 21 jours après la naissance avec comme valeur seuil 30µg/L.

### 1.6.2. Test de la sueur

La production de la sueur est réglée par des processus de sécrétion et de réabsorption de chlorure de sodium. La sécrétion des cellules sudoripares vers les canaux sudoripares contrôle la composition de la sueur en eau et en sels. La réabsorption a lieu des canaux vers les cellules sudoripares et assure un ajustage précis de la concentration de sodium et chlore dans la sueur. Pour obtenir une concentration normale d'ions sodium et chlorure dans la sueur, une activité normale des canaux sodiques et de *CFTR* doit être assurée. Ce flux d'ions inversés au niveau des canaux *CFTR* des glandes sudoripares explique la contraction élevée de chlorure dans la sueur chez les patients atteints de la mucoviscidose.

La concentration en chlore d'un test de sueur négatif doit être inférieure à 40mmol/L. Chez les patients atteints de la mucoviscidose, elle est supérieure à 60mmol/L. Une valeur intermédiaire entre 40 et 59mmol/L peut être observée chez les patients avec une forme atypique de la mucoviscidose.

Le test de la sueur est considéré très fiable, cependant, 2% des patients présentent un test de la sueur normal alors qu'ils sont atteints de mucoviscidose atypique (Verhaeghe, 2007). Une analyse de différence de potentiel nasal peut être en plus réalisée, permettant de mesurer le courant produit par les mouvements ioniques à travers l'épithélium nasal. La généralisation de cette méthode permettrait d'identifier certains patients atteints de mucoviscidose et ayant un test de la sueur normal ou intermédiaire (Davis, 2006 ; De Boeck *et al.*, 2006).

### 1.6.3. Tests de biologie moléculaire

Plusieurs techniques de la biologie moléculaire sont réalisables pour la recherche des mutations du gène *CFTR*.

Comme la mutation c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del; Ancienne nomenclature F508del) est la plus fréquente chez les patients, souvent, et en première approche, la recherche de cette mutation est effectuée par simple amplification de l'exon 10 et migration sur un gel de séparation.

Pour la détection des mutations rares, des kits de détection d'une dizaine de mutations sont disponibles pour assurer un dépistage rapide, fiable et économique. Le choix du Kit dépend de la région géographique pour assurer le maximum de taux de détection de mutation. En Europe et dans les pays de la méditerranée, le Kit CF30 (Elucigene) est le plus utilisé ; il couvre les 30 mutations les plus fréquentes dans ces régions. En Amérique, l'utilisation du kit *xTAG® Cystic Fibrosis* (Luminex) permet un meilleur taux de détection.

Suite à l'utilisation de ces kits, si au moins l'une des mutations reste non détectée, un séquençage des 27 exons et une partie de leurs introns adjacents est réalisé. Malgré cela, il reste 1 à 2% des patients CF avec au moins une mutation non détectée. Ces mutations seraient introniques ou dans les régions régulatrices en 5' ou 3' du gène (Férec, 2011).

### 1.7. Les traitements symptomatiques de la mucoviscidose

L'espérance de vie chez les patients atteints de la mucoviscidose ne cesse de croître notamment dans les trois dernières décennies. En France, elle était de 7 ans en 1965 et en 2005 de 47 ans selon le bilan des données 2005 rassemblées par le « Registre Français de la Mucoviscidose » et les analyses de l'Institut National d'Etudes Démographiques. Bien évidemment, l'espérance de vie dépend des manifestations phénotypiques du patient et aussi de facteurs génétiques et environnementaux. Cependant, la prise en charge de la maladie est la principale cause du prolongement de l'espérance de vie et de l'amélioration de sa qualité. Cette observation sous-entend qu'un défaut d'une prise en charge correcte de la maladie est responsable de la différence qui existe au niveau des espérances de vie entre les pays. Actuellement, la prise en charge n'est que symptomatique et se divise en deux grandes catégories : le traitement des symptômes respiratoires et ceux digestifs.

### 1.8. Les axes de recherche

#### 1.8.1. *Les axes de recherche de la microbiologie et de l'immunologie*

Les études actuelles en mucoviscidose se concentrent sur l'atteinte pulmonaire. Elles se focalisent surtout pour mieux comprendre la résistance des bactéries chez les patients et les effets des antibiotiques sur les germes. De même, le recrutement et la migration intensive des neutrophiles sont étudiés afin de comprendre leur responsabilité dans la réponse immunitaire inflammatoire des tissus pulmonaires.

#### 1.8.2. *Les axes de recherche de la génétique et la thérapie génique*

L'idée traditionnelle de la thérapie génique proposerait d'introduire le gène *CFTR* dans les cellules du patient. L'avantage de cette approche est que indépendamment du génotype elle permettrait la guérison (Prickett et Jain, 2013). Cependant, plusieurs contraintes techniques freinent l'application de cette technologie (Griesenbach et Alton, 2011 ; McLachlan *et al.*, 2011). Comme l'atteinte pulmonaire est responsable de 90% des décès de patients atteints de la mucoviscidose, la recherche en thérapie génique se concentre sur les voies

respiratoires inférieures. La technique nécessite le contact direct du vecteur porteur du gène correcteur avec les cellules épithéliales des poumons en utilisant des méthodes comme l'aérosolisation et l'instillation endobronchique. Cependant, l'épaississement du mucus chez les patients empêcherait l'absorption du vecteur ainsi que son arrivée aux cavités respiratoires distales (Prickett et Jain, 2013). Les recherches visent à obtenir les vecteurs viraux et non viraux les plus adéquats pour une thérapie génique efficace. Certains vecteurs ont été déjà essayés chez des patients dans des études cliniques en phases 1 et 2.

### 1.8.3. Les axes de recherche de la pharmacothérapie

Dans ces dernières années, la recherche des stratégies thérapeutiques de la mucoviscidose se focalise sur des traitements causatifs plutôt que sur les traitements symptomatiques. De ce fait, un plus grand intérêt est accordé aux traitements pharmacologiques pour la rapidité des résultats et les effets bénéfiques qu'ils peuvent apporter aux patients. Comme les effets de mutations du gène *CFTR* sont variables, les traitements envisagés diffèrent en fonction des classes de mutation.

## 2. LA PROTEINE CFTR

### 2.1. CFTR : une protéine de la superfamille ABC

#### 2.1.1. Propriétés des Transporteurs ABC

La superfamille des transporteurs ABC renferme les protéines transmembranaires qui utilisent l'hydrolyse des nucléotides pour transporter des substrats à travers la bicouche lipidique (Holland *et al.*, 2003). Le rôle principal des transporteurs ABC est de déplacer des substrats vers le cytoplasme (*Importers*) ou vers le milieu extracellulaire (*Exporters*). Ce premier type de transporteur existe uniquement chez les procaryotes alors que le second type est présent chez les procaryotes et les eucaryotes (Rees *et al.*, 2009). Chez l'Homme 49 transporteurs ABC ont été identifiés dont la plupart sont impliqués dans diverses maladies (Borst et Elferink, 2001 ; Dean *et al.*, 2001 ; Gottesman et Ambudkar, 2001).

Les gènes codant pour les transporteurs ABC sont largement dispersés dans le génome et montrent un large degré de similitude au niveau des acides aminés chez

les eucaryotes (Dean *et al.*, 2001). Les analyses phylogénétiques ont permis la répartition des gènes de la superfamille en 7 sous-familles (ABCA-B-C-D-E-F et G). Chaque sous famille renferme un nombre variable de gènes. Le gène *CFTR* fait partie de la famille C et est nommé de ce fait ABCC7.

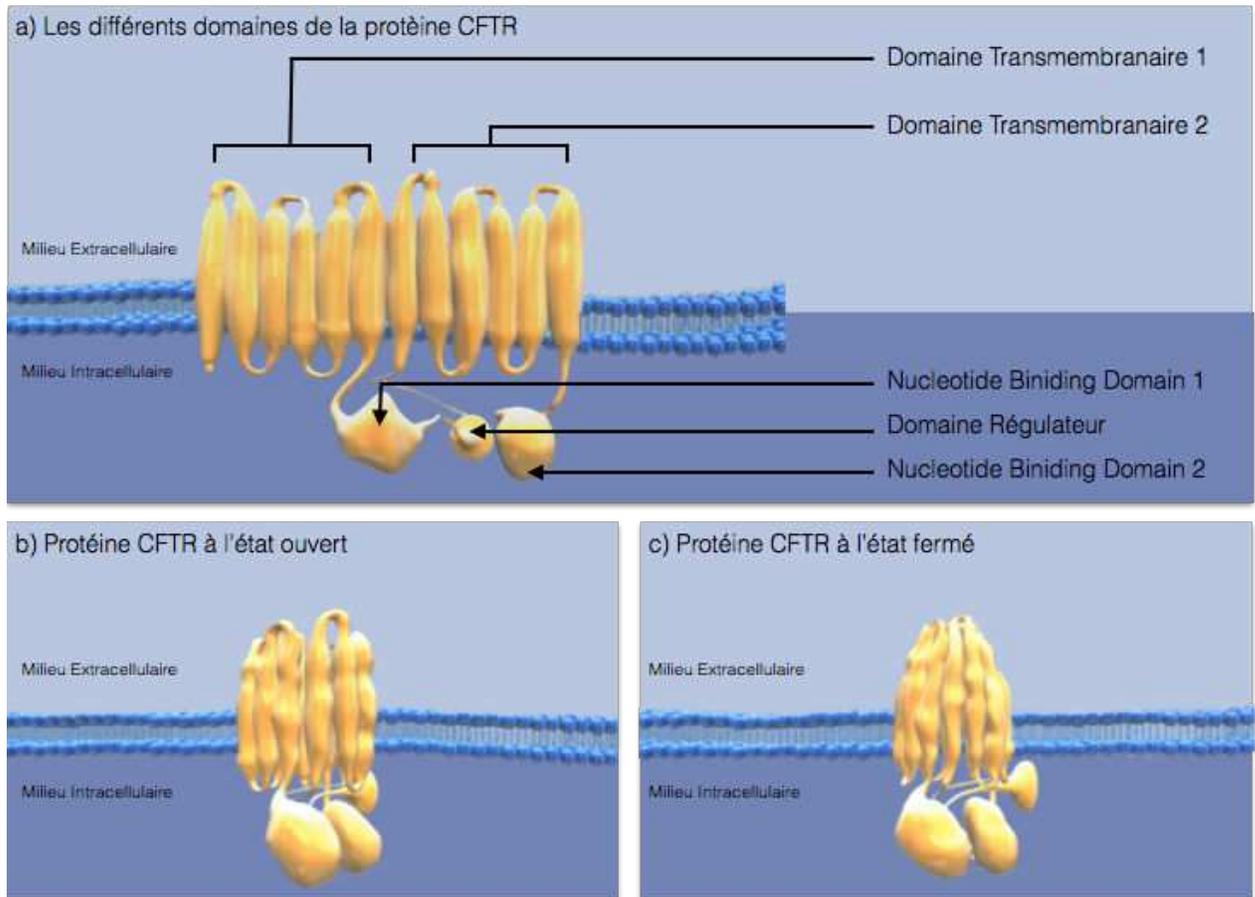
### 2.1.2. Domaines et fonctionnement d'un Transporteur ABC

Un transporteur ABC fonctionnel est constitué de quatre domaines principaux (Higgins *et al.*, 1986 ; Hyde *et al.*, 1990) : deux domaines transmembranaires (DTMs) et deux *Nucleotide Binding Domains* (NBDs) localisés dans la cellule (**Figure 4a**).

Les deux DTMs traversent la membrane plusieurs fois grâce à des hélices-alpha. Typiquement, il existe six hélices-alpha par DTM (Higgins, 2001). Les DTMs forment le passage à travers lequel les substrats franchissent la membrane et sont responsables de la spécificité de la protéine à son substrat.

Les deux NBDs, structurellement conservés, de nature hydrophile, lient et hydrolysent l'ATP (**Figure 5**). Chaque NBD contient deux sous-domaines. Le premier sous-domaine, nommé Béta (ou *Head*), contient un noyau ATPase de type F1 composé lui même des motifs Walker A et B pour l'interaction avec le phosphate de l'ATP et  $Mg^{2+}$  (Walker *et al.*, 1982). Ce sous-domaine Béta est complété par un feuillet- $\beta$  antiparallèle qui rentre en contact avec la base et le ribose de l'ATP (Szollosi *et al.*, 2010). Le deuxième sous-domaine, nommé Alpha (ou *Tail*), contient la séquence consensus LSGGQ qui représente la signature des protéines ABC. Les deux sous-domaines sont liés par une boucle Q, nommée ainsi pour la présence d'une glutamine conservée qui interagit avec le gamma-phosphate de l'ATP (Karpowich *et al.*, 2001). Cette interaction entre l'ATP et la boucle Q induit un changement de conformation qui se manifeste par un rapprochement de 15 degrés des deux sous-domaines (Szollosi *et al.*, 2010). La molécule d'ATP reliée au sous-domaine bêta se présente au sous-domaine alpha de l'autre NBD formant ainsi un site composite. Les deux NBDs constituent ainsi un « sandwich » autour de deux molécules d'ATP en adoptant une position « *Head-to-Tail* ». Cette position induit un changement conformationnel qui se transmet aux DTMs conduisant à leur ouverture (**Figure 4b**). L'hydrolyse de la molécule d'ATP, maintenue entre le sous-domaine alpha du NBD1

et le sous-domaine bêta du NBD2, et puis sa libération, sous forme d'ADP et Pi, induisent la fermeture du transporteur ABC (**Figure 4c**). Le deuxième site composite (formé du sous-domaine bêta du NBD1 et du sous-domaine alpha du NBD2) est catalytiquement inactif et la molécule d'ATP présente au niveau de ce site est libérée intacte (**Figure 6**).

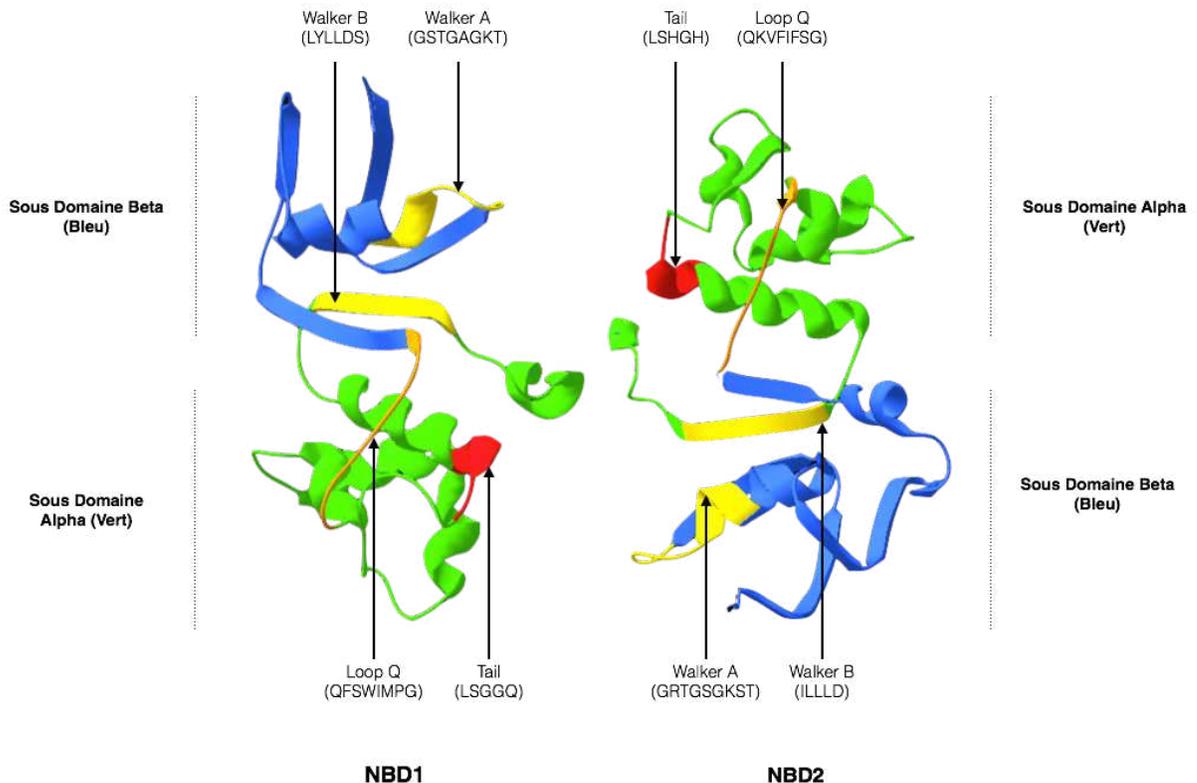


**Figure 4 :** Les différents domaines de la protéine CFTR et ses états ouvert et fermé. a) Les 5 domaines de la protéine CFTR insérée au niveau de la bicouche lipidique. b) La protéine CFTR à l'état ouvert permettant le passage des ions chlorés. c) La protéine CFTR dans son état fermé empêchant le passage des ions.

(Source: Les dessins des protéines proviennent du site <https://www.cftrscience.com/>)

### 2.1.3. Caractéristiques de la protéine CFTR par rapport aux autres transporteurs ABC

Dans la superfamille des transporteurs ABC, les protéines assurent le mouvement des substances à travers la membrane plasmidique contre le gradient de concentration (Kos et Ford, 2009). La protéine CFTR est unique dans cette superfamille dans la mesure où ses substrats (préférentiellement les ions chlorures) traversent passivement selon le gradient de concentration (Vergani *et al.*, 2005 ; Riordan, 2008). La liaison de l'ATP à CFTR a donc pour but de stabiliser l'état ouvert du canal au lieu d'assurer un transport actif (Vergani *et al.*, 2005 ; Riordan, 2008). La divergence de la protéine CFTR par rapport aux autres membres de cette superfamille a eu lieu relativement récemment. Cette divergence se caractérise par l'insertion au milieu de la protéine de près de 210 acides aminés assurant une fonction régulatrice (Baker *et al.*, 2007 ; Riordan, 2008) (**Figure 4**). La phosphorylation de résidus sérine et thréonine au niveau de cette région résulte dans l'activation du canal qui serait capable d'avoir un état d'ouverture suite à la liaison de l'ATP (Vergani *et al.*, 2005 ; Baker *et al.*, 2007 ; Riordan, 2008).



**Figure 5 :** Les différents sous domaines du NBD1 et NBD2 en position « Head to Tail » selon une modélisation avec le programme « Swiss-Model ».

#### 2.1.4. Le domaine R de la protéine CFTR

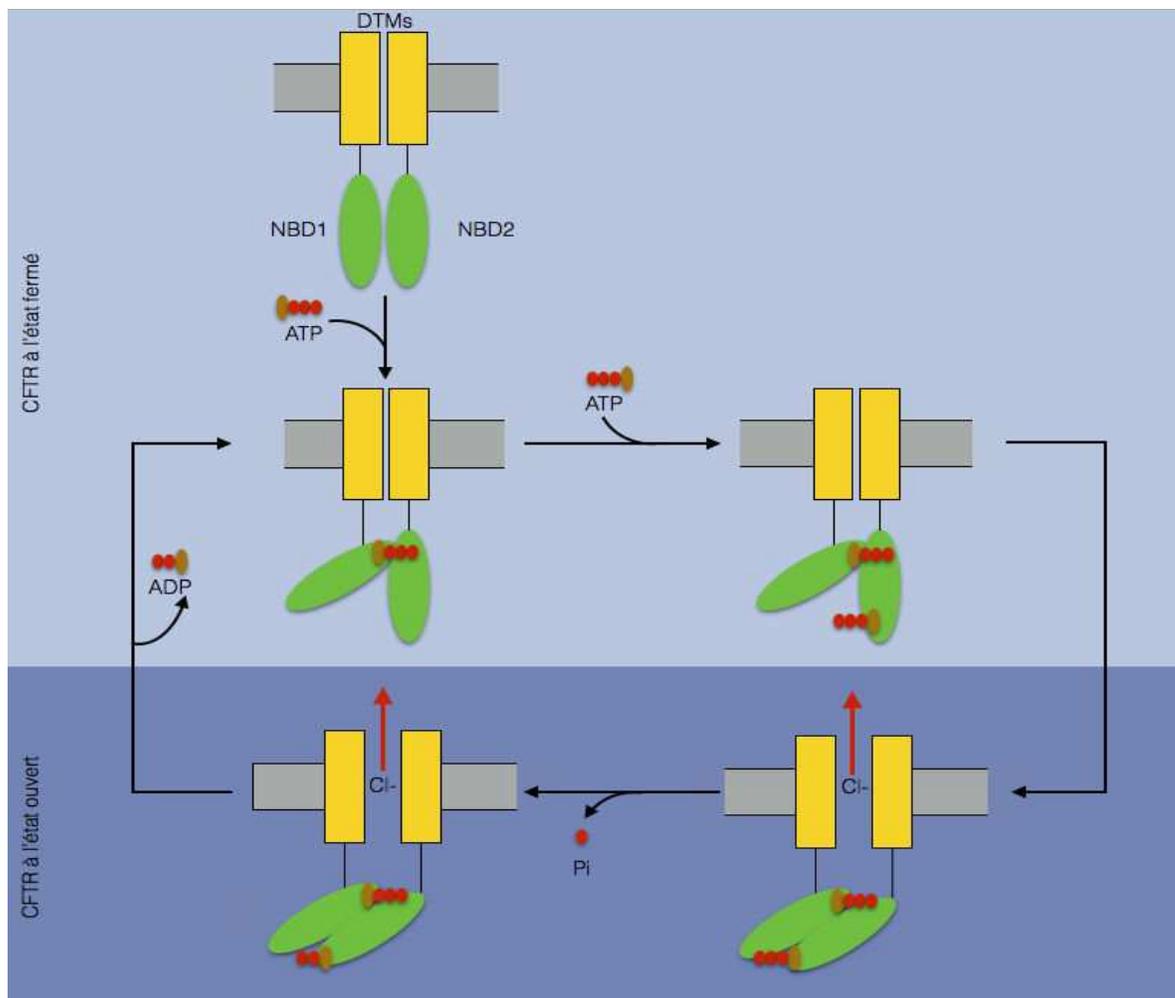
Le domaine R, spécifique de la protéine CFTR, est localisé entre les domaines NBD1 et NBD2 dans la structure tertiaire de la protéine. Cette localisation n'est pas obtenue par hasard car ce domaine interagit avec les deux NBDs et probablement de façon simultanée. Il est maintenant connu que cette interaction peut être allostérique et électrostatique.

Les limites exactes du domaine R n'ont pas été déterminées précisément. Le C-terminal (C-ter) du domaine NBD1 peut être présent entre les résidus 589 jusqu'à 670. Le C-ter du domaine R ne dépasse pas le résidu 708 car des délétions induites avant ce résidu conduisent à la formation d'une protéine qui n'ouvre pas correctement en présence de l'ATP (Riordan *et al.*, 1989).

Le domaine R contient jusqu'à 10 sérines qui sont phosphorylées par la Protéine Kinase A (PKA) *in vitro* et peuvent, dans certaines conditions, être phosphorylables *in vivo*. Il y a deux sites phosphorylables par la PKC (Ser-686 et -700) (Cheng *et al.*, 1991). Cependant, aucun changement dans le Dichroïsme Circulaire (DC) ni dans la migration sur gel de SDS-Page n'a été observé quand le domaine R est phosphorylé par la PKC seule (Dulhanty *et al.*, 1995). Il est possible que l'activité de la PKC potentialise celle de la PKA et favorise son action. D'autres sites existent sur le domaine R pour la PKG, la protéine kinase Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dépendente et les tyrosine Kinases (Dulhanty *et al.*, 1995). La déphosphorylation est assurée par les phosphatases PP2C et PP2A. Il est à noter que CFTR contient 5 sérines (Ser-660, -700, -737, -795 et -813) qui sont facilement phosphorylables quand la PKA est active dans des cellules qui expriment CFTR humain (Cheng *et al.*, 1991).

Des mesures biochimiques ont démontré qu'en présence des CFTR purifiés, l'hydrolyse de l'ATP et l'ouverture du canal sont couplées approximativement de façon proportionnelle (Li *et al.*, 1996). Après l'ajout de la PKA, l'activité ATPasique de CFTR est augmentée de 2 à 3 fois. Cependant, quand l'activité de la PKA a été inhibée par l'ajout de PP2A, l'activité ATPasique a été remarquablement inhibée. Cela implique que la protéine CFTR, d'une part, reste toujours phosphorylée après la

purification et que d'autre part, son affinité à l'ATP est dépendante de l'activité de la PKA (Li *et al.*, 1996). L'activité du canal est très peu dépendante de l'activité des PP2A, surtout à des niveaux élevés de concentration d'ATP. Il est probable que si le domaine R dans une protéine CFTR wild-type est dephosphorylé, il est capable d'inhiber le NBD1, et ceci directement en empêchant la liaison à l'ATP. Quand le domaine R est phosphorylé par la PKA, un changement conformationnel a été démontré par DC ce qui lui permet d'interagir avec le NBD1. Ce changement induit ainsi la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (comme pour les autres protéines ABC) et conduit à l'ouverture du canal (Dulhanty *et al.*, 1994 ; 1995).



**Figure 6** : Mécanisme de fonctionnement du canal CFTR et son passage de l'état fermé à l'état ouvert suite à la fixation et à l'hydrolyse de l'ATP.

## 2.2. Propriétés, localisations, fonctions et synthèse de la protéine CFTR

### 2.2.1. Propriétés de la protéine CFTR

Chez l'Homme, la protéine CFTR est codée par un ARN messager (ARNm) de 6,5Kb. Ce dernier est traduit en une glycoprotéine membranaire de 1480 acides aminés avec un point isoélectrique de 8,91. Cette protéine est localisée principalement dans la membrane apicale où elle assure un passage des ions chlorures à travers l'épithélium et régule le taux du flux des ions chlorures. Après la détermination de la séquence primaire des acides aminés de la protéine en 1989, Riordan *et al.* proposent une structure qui s'avère remarquablement précise. Le modèle a été proposé en comparant CFTR avec d'autres membres de la famille des transporteurs ABC. CFTR est donc composé des 5 domaines préalablement décrits. Il est estimé que 77% de la protéine est cytoplasmique (les deux NBDs, le domaine R et les boucles intracellulaires), 19% représentent les DTMs et les 4% restant sont sous forme de boucles extracellulaires (Du site : <http://www.montana.edu/>).

### 2.2.2. Tissus exprimant la protéine CFTR

La protéine CFTR est exprimée au niveau du pôle apical des cellules épithéliales de l'arbre trachéo-bronchique, des glandes sudoripares, des canaux pancréatiques, biliaires, des cryptes intestinales, des tubules rénaux et de l'appareil génital. Le niveau d'expression est variable selon les tissus et le stade du développement.

### 2.2.3. Fonctions de la protéine CFTR

#### 2.2.3.1. Activité canal de la protéine CFTR

Des mesures de potentiel d'inversion avec différentes concentrations de NaCl indiquent que la protéine CFTR est sélective pour les anions par rapport aux cations. La perméabilité pour le Na<sup>+</sup> par rapport au Cl<sup>-</sup> ( $P_{Na^+}/P_{Cl^-}$ ) est de 0,1 à 0,03 (Anderson *et al.*, 1991a; Bear *et al.*, 1992; Tabcharani *et al.*, 1997). La perméabilité aux anions a été déterminée par la technique de *patch-clamp* et elle suit le gradient Br<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > I<sup>-</sup> > F<sup>-</sup>. Ce type de perméabilité aux anions distingue la protéine CFTR par rapport aux autres canaux chlorures épithéliaux qui ont une

plus grande perméabilité aux  $I^-$  qu'aux  $Cl^-$ . La perméabilité de CFTR est caractérisée : 1) La protéine CFTR a une faible conductance de 6 à 10 pS, cette conductance varie entre les espèces et décroît en allant des Xénope > Homme > Souris > Requin (Tabcharani *et al.*, 1990 ; Price *et al.*, 1996 ; Lansdell *et al.*, 1998) 2) La relation entre le courant et la tension est linéaire. 3) La protéine présente une ouverture du canal dépendante du temps et du voltage d'excitation. 4) L'activité est régulée par la phosphorylation du domaine R dépendante de l'AMP cyclique. Ces caractéristiques résultent des différents domaines composant la protéine (Sheppard et Welsh, 1999). Les connaissances sur la contribution de chaque domaine dans l'activité de la protéine sont obtenues par des études effectuées sur CFTR WT, des variantes de mutagenèses dirigées et plusieurs agents qui altèrent la fonction (Sheppard et Welsh, 1999). Les DTMs confèrent une sélectivité aux ions  $Cl^-$  (Anderson *et al.*, 1991a), les NBDs hydrolysent l'ATP pour assurer l'ouverture du canal (Anderson *et al.*, 1991b) et le domaine R contrôle l'activité du canal (Berger *et al.*, 1991).

#### 2.2.3.2. La protéine CFTR régule l'activité des canaux sodiques ENaC

Les canaux sodiques ENaC (*Epithelial Na<sup>+</sup> Channel*) sont des protéines membranaires composées de 3 sous-unités ayant une grande similarité de séquence (Lucarelli *et al.*, 2012). Les sous unités alpha, bêta et gamma sont codées par trois gènes distincts : *SCNN1A*, *B* et *G* (Voilley *et al.*, 1994 ; 1995). Les ENaC sont exprimés au niveau des cellules épithéliales des tubules rénaux, du colon, de plusieurs glandes exocrines et du système respiratoire (Hummler *et al.*, 1996). L'activité principale de ces canaux est la réabsorption des ions de sodium vers les cellules épithéliales.

Comme les protéines CFTR et ENaC sont toutes les deux responsables de la régulation de la concentration ionique de  $Cl^-$  et  $Na^+$ , une possible interaction a été envisagée. En 1995, Stutts *et al.* démontrent un effet inhibiteur de CFTR sur ENaC réduisant la réabsorption de  $Na^+$ . Cette observation indique que l'absence de CFTR membranaire provoquerait l'augmentation de la réabsorption de  $Na^+$ .

Cette conséquence ainsi que l'absence de  $\text{Cl}^-$  extracellulaire résultant de la disparition de l'activité CFTR favorisent davantage la déshydratation du mucus.

Actuellement, le mécanisme d'interaction CFTR-ENaC est mal connu. Cependant, trois hypothèses sont envisagées. La première hypothèse serait que la concentration intracellulaire des ions  $\text{Cl}^-$  est responsable de la régulation des canaux ENaC (Chabot *et al.*, 1999 ; Bachhuber *et al.*, 2005 ; Suaud *et al.*, 2007). Cependant, les résultats obtenus sont contradictoires et aucun récepteur  $\text{Cl}^-$  n'a été identifié sur ENaC (Berdiev *et al.*, 2009). La deuxième hypothèse suggère que la régulation négative est médiée par l'intermédiaire d'autres protéines notamment la PKA (Stutts *et al.*, 1997). En effet, une activation de CFTR par AMPc est nécessaire pour observer une inactivation de ENaC. La dernière hypothèse est la plus simple mais la plus controversée. Elle propose que l'interaction CFTR-ENaC est directe *via* une interaction protéine-protéine (Berdiev *et al.*, 2009). Cependant, l'expression de ENaC sur les cils vibratiles des cellules épithéliales et l'absence de CFTR à ce niveau mettent en question cette hypothèse.

#### 2.2.4. Biosynthèse et maturation de la protéine CFTR

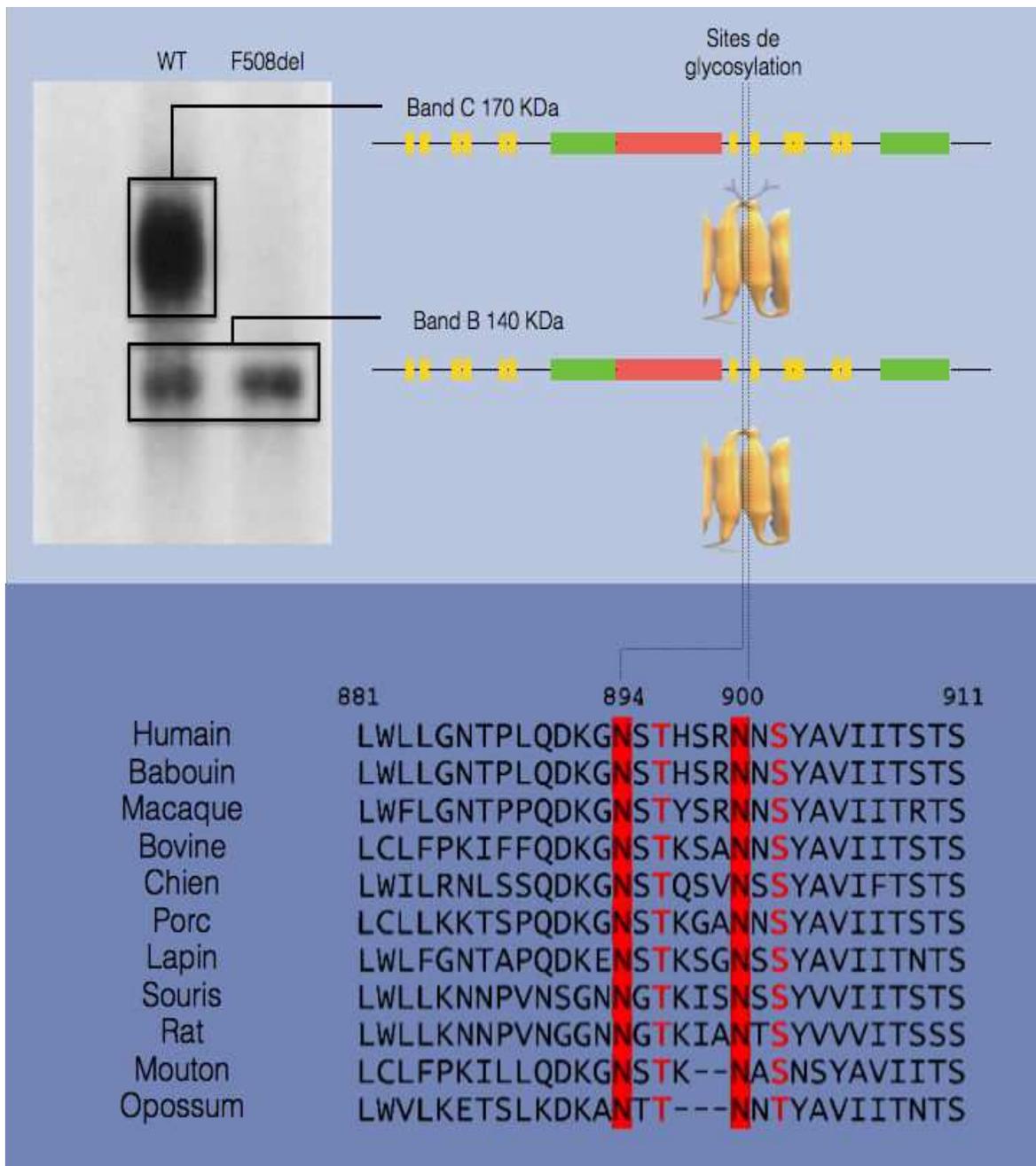
Comme pour toutes les protéines transmembranaires, la biosynthèse de CFTR a lieu au niveau du Réticulum Endoplasmique (RE), les repliements des domaines sont réalisés dans la membrane et la lumière du RE. La biosynthèse de CFTR dure approximativement 9 à 10 min dans la cellule eucaryote (Ward et Kopito, 1994). Cette durée relativement courte suppose que les structures secondaire et tertiaire sont obtenues de façon co-translationnelle. En effet, la translocation débute dès que la chaîne primaire naissante sort du ribosome, approximativement à partir de la traduction de 25% de la totalité de la protéine (Kim et Skach, 2012). A fur et à mesure que la traduction se poursuit, chaque domaine se forme et interagit avec les domaines préalablement formés pour donner un intermédiaire à multidomaines. La formation de l'intermédiaire DTM1-NBD1-R-DTM2 est essentielle pour la translocation dans le RE dans la mesure où l'ajout du DTM2 induit un changement conformationnel remarquable (Meacham *et al.*, 1999). L'ajout du NBD2 est réalisé en

dernier de façon post-traductionnelle (Du *et al.*, 2005) ce qui confère à la protéine un meilleur trafic mais n'est pas strictement nécessaire (Pollet *et al.*, 2000).

Plusieurs protéines sont impliquées dans la biosynthèse de la protéine CFTR et dans la correction des défauts de maturation. Parmi les protéines identifiées interagissant avec CFTR se trouvent des protéines cytoplasmiques comme les *Heat Shock Proteins* (HSP) 40, 70 et 90, la protéine RMA1 de la membrane du RE et la protéine de la lumière du cytoplasme la calnexine.

Dès que la protéine CFTR acquiert sa structure tridimensionnelle, elle est glycosylée (**Figure 6**). En effet, la protéine CFTR contient deux résidus Asn conservés pouvant lier deux chaînes d'oligosaccharides en positions 894 et 900 au niveau de la boucle extracellulaire 4 reliant les hélices alpha 7 et 8 du DTM2. Au niveau de ces deux résidus, la protéine subit une core-glycosylation et acquiert deux chaînes de mannoses sensibles à l'endoglycosidase H (endoH) (Cheng *et al.*, 1990 ; Lukacs *et al.*, 1994 ; Ward et Kopito, 1994). Cette étape a lieu au niveau du RE et donne un précurseur immature de poids moléculaire de 135 à 140 KDa (Bande B) dégradé par l'endoH. Ce précurseur subit une maturation au niveau de l'appareil de Golgi en incorporant, au niveau des résidus mannoses, une chaîne d'oligosaccharide complexe résistante à l'endoH. Cette étape, assurée par la mannosidase, donne la forme mature de la protéine de poids moléculaire de 160 à 170 KDa (Bande C) capable de remonter à la membrane plasmique (Kopito, 1999).

La glycosylation est une des modifications les plus marquantes durant la synthèse de la protéine dans le RE et joue un rôle crucial dans la maturation, l'adressage et la dégradation des polypeptides naissants. Les protéines CFTR ayant subi un défaut de maturation sont retenues dans le RE et dégradées au niveau du protéasome. En effet, les résidus mannoses déterminent si le polypeptide continuera son adressage ou s'il sera dégradé par le système *ER-associated degradation* (ERAD) (Kopito, 1999).

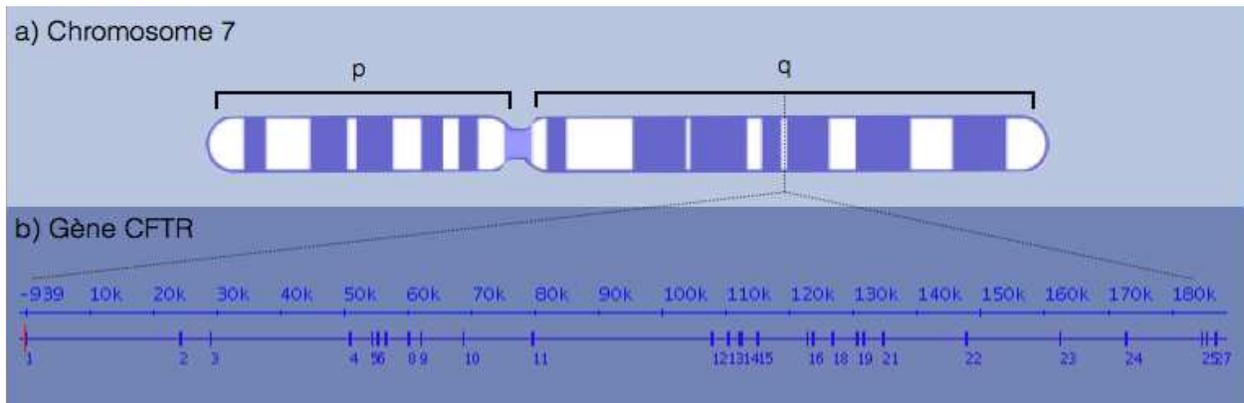


**Figure 6** : Maturation de la protéine CFTR suite à l'ajout de chaînes d'oligosaccharides au niveau des résidus Asparagine conservés chez diverses espèces. a) Western blot de CFTR WT et p.Phe508del. La présence d'une bande C mature de 170 KDa chez le WT est absente chez p.Phe508del. b) Localisation des sites de glycosylation au niveau de la *loop* extracellulaire reliant la première et la deuxième hélice du second DTM. c) Alignement des résidus 881 à 911 de la boucle extracellulaire de diverses espèces montrant la conservation des résidus Asparagine 894 et 900, lieu de l'insertion des chaînes d'oligosaccharides.

### 3. LE GENE *CFTR*

#### 3.1. Localisation du gène *CFTR*

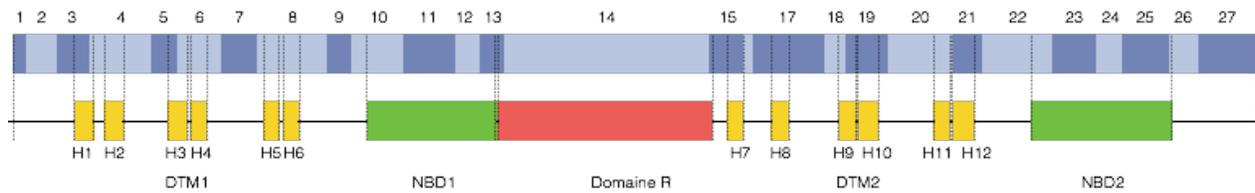
L'étude du gène *CFTR*, responsable de la mucoviscidose, est un exemple classique de l'identification d'un gène induisant une maladie en se basant sur des analyses de liaisons génétiques. Le gène a été localisé par rapport au marqueur génétique D7S15 (Tsui *et al.*, 1985), ce qui a permis de déterminer d'autres liaisons avec différents marqueurs génétiques du bras long du chromosome 7. Ainsi, le gène *CFTR* a été localisé sur le bras long de ce chromosome (7q21-34) (Wainwright *et al.*, 1985) (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Localisation chromosomique du gène *CFTR*. a) Le gène *CFTR* est localisé au niveau du bras q du chromosome 7 (7q21-34). b) Le gène *CFTR* est de 200000 pdb composé de 27 exons.

#### 3.2. Séquence et taille du gène *CFTR*

La séquence du gène a été identifiée en 1989 (Riordan *et al.*, 1989). Cette caractérisation s'est basée sur l'isolation et l'alignement d'ADNc obtenus des lignées cellulaires adénocarcinomiques humaines T84. Les séquences exoniques et introniques sont longues de 189,36 kb. De plus, le promoteur est localisé 20,9 kb en position 5' du gène. Cette région promotrice étendue contient le *regulatory binding element* qui est utile pour une expression normale du gène (Blackledge *et al.*, 2007). Un *insulator element* est situé à 6,8 kb en position 3' du gène (Blackledge *et al.*, 2009). En conséquence, l'unité transcriptionnelle du gène *CFTR* entre le promoteur et l'*insulator element* est de 217 kb approximativement. Le gène est composé de 27 exons codant pour un ARNm de 6128 nucléotides. Ces séquences exoniques correspondent à uniquement 2,45% du gène *CFTR* (**Figure 8**).



**Figure 8 :** ADNc du gène *CFTR* et les différents domaines de la protéine CFTR. Les exons de *CFTR* et les domaines de la protéine sont représentés de façon proportionnelle à leurs tailles réelles. Les parties exoniques qui codent pour chaque domaine de la protéine sont aussi déterminées.

### 3.3. Régulation de la transcription du gène *CFTR*

La région promotrice du gène *CFTR* ne présente pas de « TATA box ». Elle est riche en GC, qui est généralement non méthylé. La région promotrice contient un *Cis-acting element* avant 632 nucléotides en 5' du site de translation (Lewandowska *et al.*, 2010). La région promotrice immédiate est aussi caractérisée par une région consensus reconnue par plusieurs facteurs de transcription CTCF, AP-1, SP1, GRE, CRE, C/EBP, et Y-box protéines (McCarthy et Harris, 2005). Ces facteurs peuvent se lier à la chromatine pour ouvrir l'ADN et favorisent l'interaction de l'ADN polymérase avec le promoteur pour induire la transcription. Cependant, la compréhension du contrôle du gène *CFTR* reste loin d'être complète.

### 3.4. Duplication de la région de l'exon 10 chez l'Humain

Les analyses phylogénétiques menées sur la famille des transporteurs ABC montrent que la formation de cette famille résulte d'un processus de duplication actif chez les vertébrés (Annilo *et al.*, 2006). Ce processus de duplication pourrait être à l'origine de la variété de la famille, qui comporte des protéines dont les fonctions ont peu changé durant l'évolution. Des événements de mort de gène de la famille ont été documentés ce qui a maintenu le nombre de gènes dans la famille relativement constant (Hughes, 1994).

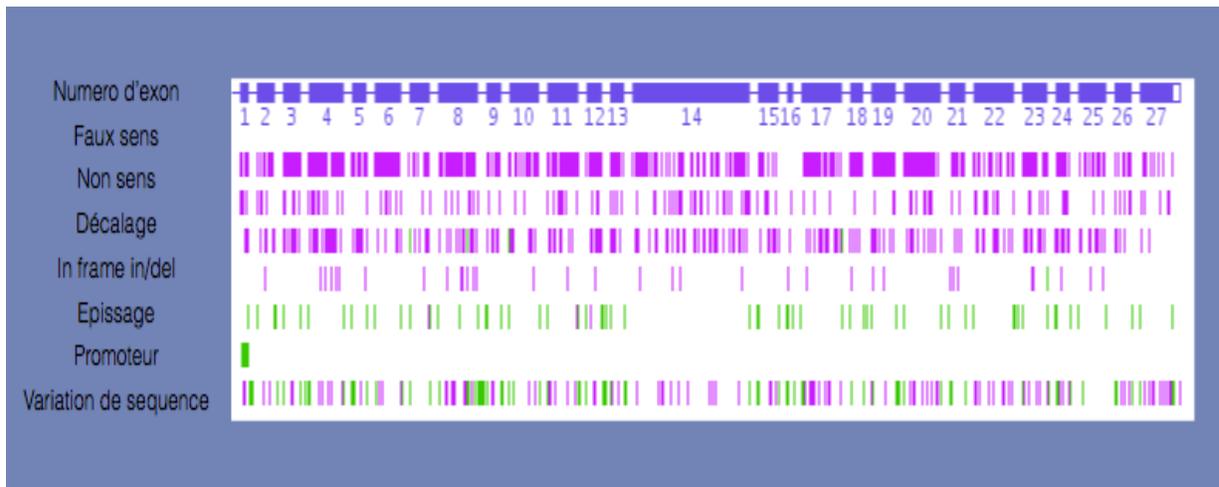
Cependant, le processus de duplication est présent dans le gène *CFTR* lui-même. En effet, des expériences de *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH) ont démontré que la région de l'exon 10 et ses parties adjacentes se trouvent sur plusieurs autres

chromosomes (Rozmahel *et al.*, 1997) : chromosome 20 (20p11.1, 20q11.1), 12 (12q11.1), 17 (17p.11.1), 9 (région centromérique), 14 (14q11.1), 13 (13q1) et 15 (15q15). L'amplification de la séquence apparaît suite à une série d'évènements complexes qui pourrait inclure une retrotransposition de l'exon 10 suivie d'une amplification du site d'intégration. La région de *CFTR* intégrée a été trouvée avec une séquence L1 réarrangée (Grimaldi *et al.*, 1984; Fanning et Singer, 1987). Cependant, la présence de la séquence L1 n'explique pas exactement comment cette région a été dupliquée. La recherche des mutations spécifiques du gène *CFTR* au niveau de cette séquence est devenue alors problématique, des amorces pouvant uniquement s'hybrider au gène *CFTR* doivent être utilisées pour ne pas détecter des mutations ectopiques (El-Seedy *et al.*, 2009, 2013).

#### 4. LES MUTATIONS DU GENE *CFTR*

Depuis l'identification du gène *CFTR* en 1989, plus de 1900 mutations ont été identifiées ([www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca)). La **Figure 9** représente le profil des mutations de *CFTR* dans ce site.

Des investigations précédentes ont prouvé que les mutations du gène ont existé depuis la période paléolithique (Morral *et al.*, 1994). La mutation la plus fréquente est la mutation c.1521\_1523delCTT qui est présente dans plus de 2/3 des allèles mutés en Europe. Les autres mutations ont des fréquences très hétérogènes et variables en fonction de la géographie et la plupart d'entre elles sont individuelles ou limitées à un nombre très réduit d'individus (Bobadilla *et al.*, 2002). Ces mutations, exoniques et introniques, peuvent avoir des effets moléculaires et cellulaires différents, ainsi que des conséquences physiologiques variables. L'étude de chaque mutation aux niveaux moléculaire, cellulaire et physiopathologique est nécessaire pour déterminer le rôle de la mutation. Un individu porteur d'un seul allèle muté présente un risque génétique mais d'autres mutations en trans doivent exister pour induire des symptômes cliniques. Chez certains individus, plusieurs mutations peuvent coexister en cis induisant un phénotype spécifique à l'allèle complexe formé.



**Figure 9 :** Les mutations du gène *CFTR*

(Source: <http://www.genet.sickkids.on.ca/app>)

#### 4.1. Origines et répartitions mondiales des mutations les plus fréquentes

Plusieurs mutations du gène *CFTR* sont connues à travers le monde. Leur existence aussi ancienne que c.1521\_1523delCTT a permis leur diffusion dans diverses populations (Morral *et al.*, 1994). Trois mutations appartiennent à cette catégorie : c.1624G>T (p.Gly542X), c.3909C>G (p.Asn1303Lys) et c.1652G>A (p.Gly551Asp) dont les deux premières sont liées aux populations de la méditerranée et la troisième a une Celtiques (Loirat *et al.*, 1997).

En Europe, des pays comme l'Autriche, la Biélorussie, la Belgique, le Danemark, l'Estonie, la Finlande, la France, l'Allemagne, la Lituanie, les Pays-Bas, le Norvège, la Pologne, la Suède, la Suisse et l'Ukraine présentent un plus grand degré d'homogénéité dans leurs mutations par rapport à d'autres pays comme l'Espagne, la Bulgarie, la Grèce et la Turquie (Bobadilla *et al.*, 2002). Leur situation géographique de ces derniers comme « passerelle historique » entre le Moyen-Orient et l'Afrique vers l'Europe expliquerait la raison de l'hétérogénéité de leurs mutations. Dans des pays comme la France, l'Italie et aussi l'Espagne ces trois mutations ont une incidence qui croit selon un gradient nord-sud pour avoir une fréquence maximale dans les régions au bord de la méditerranée.

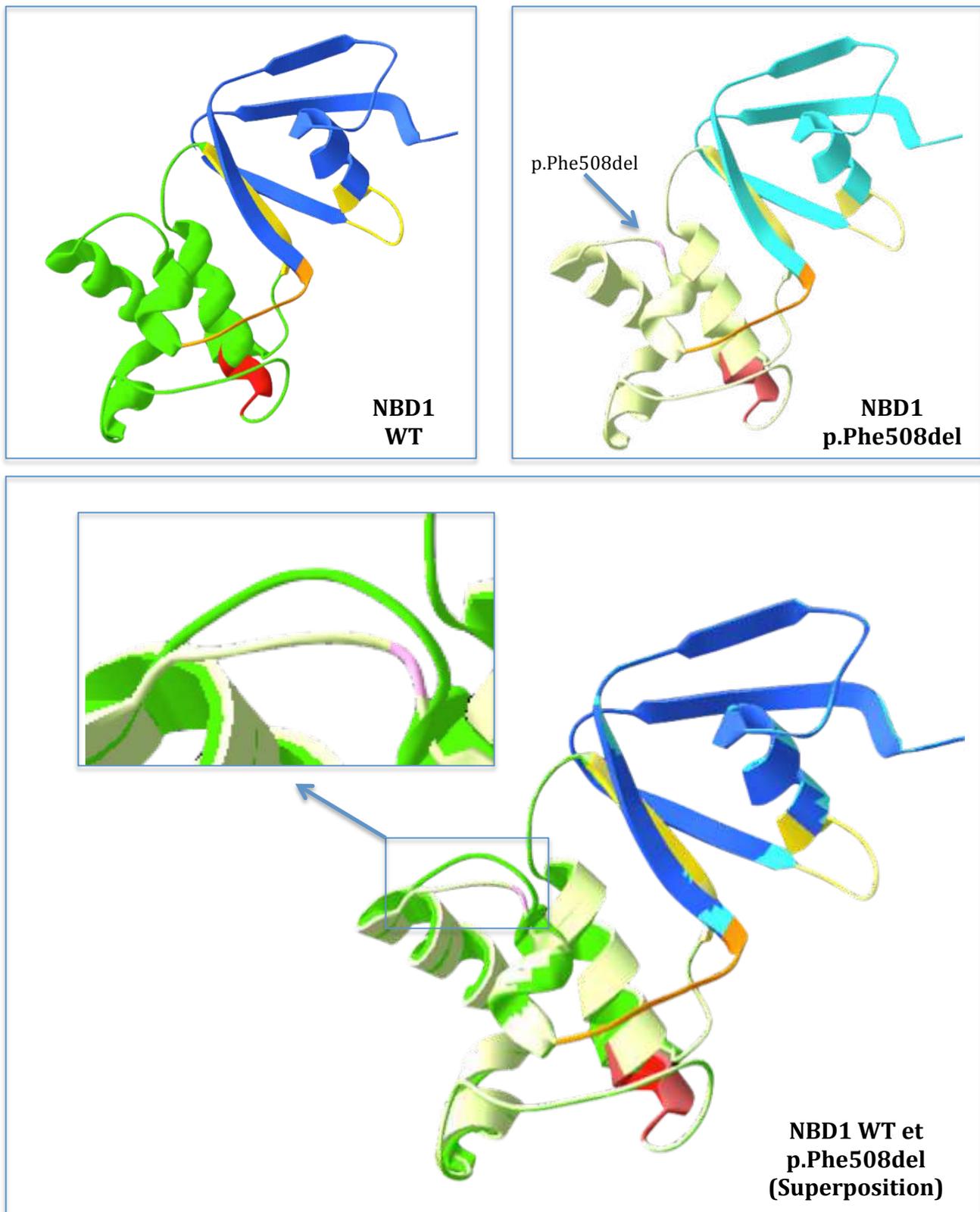
La présence des mutations de la méditerranée dans des pays européens comme la Hongrie, la Slovaquie, l'Autriche peut être expliquée par la colonisation de plusieurs parties de l'Europe par les voies fluviales comme le Danube (Serre *et al.*, 1990). Ces mutations sont aussi présentes dans les pays africains de la méditerranée notamment la Tunisie et l'Algérie.

Concernant la mutation c.1652G>A sa répartition est plus fréquente dans les pays de l'Europe du nord. Cette répartition dépend de la longue histoire de migration des tribus Celtes en Europe (James, 1993).

#### **4.2. La mutation c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del)**

c.1521\_1523delCTT est la mutation la plus fréquente. Elle induit une délétion du résidu phénylalanine 508 au niveau du NBD1 qui résulte d'une délétion de 3 nucléotides au niveau de l'exon 11. Cette mutation ne modifie pas le cadre de lecture et n'a pas d'effet sur la liaison de l'ATP mais perturbe le repliement du domaine NBD1 (**Figure 10**) et empêche la maturation complète de la protéine. L'acide aminé Phe508 est impliqué dans des interactions hydrophobes critiques pour assurer un repliement correct et une bonne structuration tridimensionnelle de la protéine, avant la structuration des sites de liaison à l'ATP (Qu *et al.*, 1997). En conséquence, la protéine CFTR portant la délétion est incapable d'acquies sa forme totalement glycosylée (Cheng *et al.*, 1990) et sera repérée par le système de contrôle qualité du RE où elle sera retenue puis dégradée. Ainsi, la protéine p.Phe508del est absente au niveau de la membrane des cellules épithéliales.

Il a été démontré que quand la température d'incubation des cellules est réduite à 23-30°C, quelques protéines CFTR p.Phe508del arrivent à échapper au système de contrôle du RE. Ces protéines sont entièrement glycosylées et sont délivrées au niveau de la membrane (Denning *et al.*, 1992). Cela indique que le processus de repliement de la protéine est capable d'être restauré à une température réduite. Au niveau de la membrane, la protéine p.Phe508del maintient quelque activité (Sondo *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2012).



**Figure 10** : Modélisation avec le programme « Swiss-Model » du changement conformationnel du NBD1 induit par la mutation p.Phe508del (rose). Le Sous domaine alpha est représenté en vert foncé (WT) claire (muté), le sous domaine bêta est en bleu foncé (WT) claire (muté). Wlaker A et B sont représentés en jaune et le *tail* en rouge. La *Loop Q* est en orange.

### 4.3. Les classes de mutations

Six classes de mutations ont été décrites (**Figure 11**) (Welsh et Smith, 1993).

#### 4.3.1. Mutations de classe I

Des mutations du gène *CFTR* induisent l'apparition d'un signal de terminaison prématuré résultant d'une anomalie au niveau d'un site d'épissage, d'un décalage de cadre de lecture ou d'une mutation non-sens (Tsui, 1992). Dans certains cas, la mutation conduit à la formation d'un ARNm instable et par la suite les protéines ne sont pas détectables (Hamosh *et al.*, 1991). Dans d'autres cas, des protéines tronquées peuvent être produites, cependant de telles protéines sont instables. Elles sont souvent dégradées rapidement ou possèdent peu ou aucune fonction. Dans tous les cas, aucune version de la protéine tronquée n'a été détectée dans les cellules de patients. Comme toutes les mutations de classe I conduisent à la production de peu ou pas de protéine, elles induisent la perte de l'activité du canal dans les cellules épithéliales.

#### 4.3.2. Mutations de classe II

Plusieurs mutations empêchent le trafic correct de la protéine CFTR vers la membrane cellulaire où elle assure sa fonction. Ces mutations peuvent conduire à l'absence totale ou une réduction de la quantité de la protéine au niveau apical. Les mutations de classe II, comme c.1521\_1523delCTT, induisent une modification dans le repliement de la protéine lors de sa maturation et empêche alors CFTR d'avoir sa conformation correcte. (Cheng *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1992).

#### 4.3.3. Mutations de classe III

Quelques protéines présentes à la membrane ont des mutations localisées dans les NBDs. Comme l'ATP intracellulaire influe l'ouverture de canal à travers une interaction directe avec les NBDs, cela expliquerait que les mutations au niveau de ces domaines peuvent altérer la fonction du canal. Les mutations de classe III peuvent avoir des effets variables sur l'activité de la protéine ; certaines mutations réduisent l'activité alors que d'autres induisent la non fonctionnalité du transport du Cl<sup>-</sup>. CFTR est aussi régulée par la phosphorylation du domaine R. Des mutations ont

été décrites au niveau de ce domaine mais sont relativement rares. Cela résulte du fait que l'altération d'un site phosphorylable peut être compensé par la phosphorylation d'autres sites qui sont nombreux sur le domaine R (Welsh et Smith, 1993).

#### 4.3.4. Mutations de classe IV

Les mutations de classe IV altèrent la conduction du canal. Les DTMs participent à la formation du pore ionique. Les mutations situées dans ces régions produisent une protéine correctement positionnée qui présente une activité canal Cl<sup>-</sup> AMPc dépendante. Cependant ces protéines mutées présentent des caractéristiques différentes de celles du canal CFTR endogène avec une diminution du flux d'ions et une sélectivité modifiée. Cette classe de mutations dans la plupart des cas est associée à un phénotype clinique peu sévère (Koch *et al.*, 2001).

#### 4.3.5. Mutations de classe V

Les mutations de classe V induisent la réduction de la quantité finale de protéines CFTR à la membrane. Ces mutations affectent les séquences consensus d'épissage et conduisent à un épissage alternatif aberrant. En conséquence, des séquences introniques peuvent être incluses et des parties exoniques peuvent être éliminées. Ces séquences, qui varient en taille de quelques nucléotides jusqu'à un exon complet, forment des ARNm aberrants. En général, ces ARNm sont éliminés par le système de *Nonsense-Mediated Decay* (NMD) si les séquences épissées de façon aberrante provoquent un décalage de cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré (Maquat *et al.*, 2001). En absence d'un décalage, les ARNm sont traduits en protéines qui sont dégradées ou inactives. Ces mutations varient en gravité en fonction de la quantité d'épissage aberrant induit par rapport à la quantité totale d'ARNm produit. Une réduction supérieure à 95% est nécessaire pour obtenir l'absence de la fonction CFTR. Les mutations 3849+10kbC>T, 3272-26A>G, 2789+5G>A sont des exemples de cette classe.

#### 4.3.6. Mutations de classe VI

Les mutations de classe VI sont des mutations qui n'affectent ni la localisation ni la fonctionnalité de la protéine CFTR mais plutôt sa stabilité au niveau membranaire. Cela induit une internalisation rapide de la protéine suivie par sa dégradation. Ces mutations se localisent souvent au niveau C-ter de la protéine (Haardt *et al.*, 1999). 1811+1.6kbA>G et c.1521\_1523delCTT (des protéines CFTR membranaires obtenues par l'effet de température ou de drogues) sont deux exemples de ce type de mutation.

#### 4.4. Traitements pharmacologiques des mutations

Pour les mutations de classe I, la gentamicine, un antibiotique aminoglycoside, est capable d'induire la continuation de la lecture même en présence d'un codon stop prématuré. Cela résulte dans la production d'une protéine CFTR complète (Bedwell *et al.*, 1997). L'administration directe sur les cellules épithéliales nasales (Wilschanski *et al.*, 2000 ; 2003) ou en intraveineuse (Clancy *et al.*, 2001 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007) de la gentamicine a montré un effet bénéfique chez les patients ayant des mutations de la classe I. Cependant, les résultats controversés et les effets secondaires de la dose requise pour un bon traitement limitent l'utilisation de la gentamicine.

Dans la même classe, l'Ataluren, une petite molécule permettant la traduction complète de la protéine contenant des mutations non-sens et induisant l'insertion précoce de codon stop, a montré un effet bénéfique chez les adultes et les enfants ayant des mutations non-sens (Kerem *et al.*, 2008 ; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2010). Cependant, la quantité d'ARNm CFTR présente est un facteur limitant dû à l'effet du NMD qui élimine la majorité de l'ARNm contenant un codon stop précoce.

La confirmation des études cliniques relatives aux molécules traitant des mutations de classe I est bénéfique uniquement pour une petite fraction des patients atteints de la mucoviscidose car ces mutations ne sont présentes que chez 5% des patients.

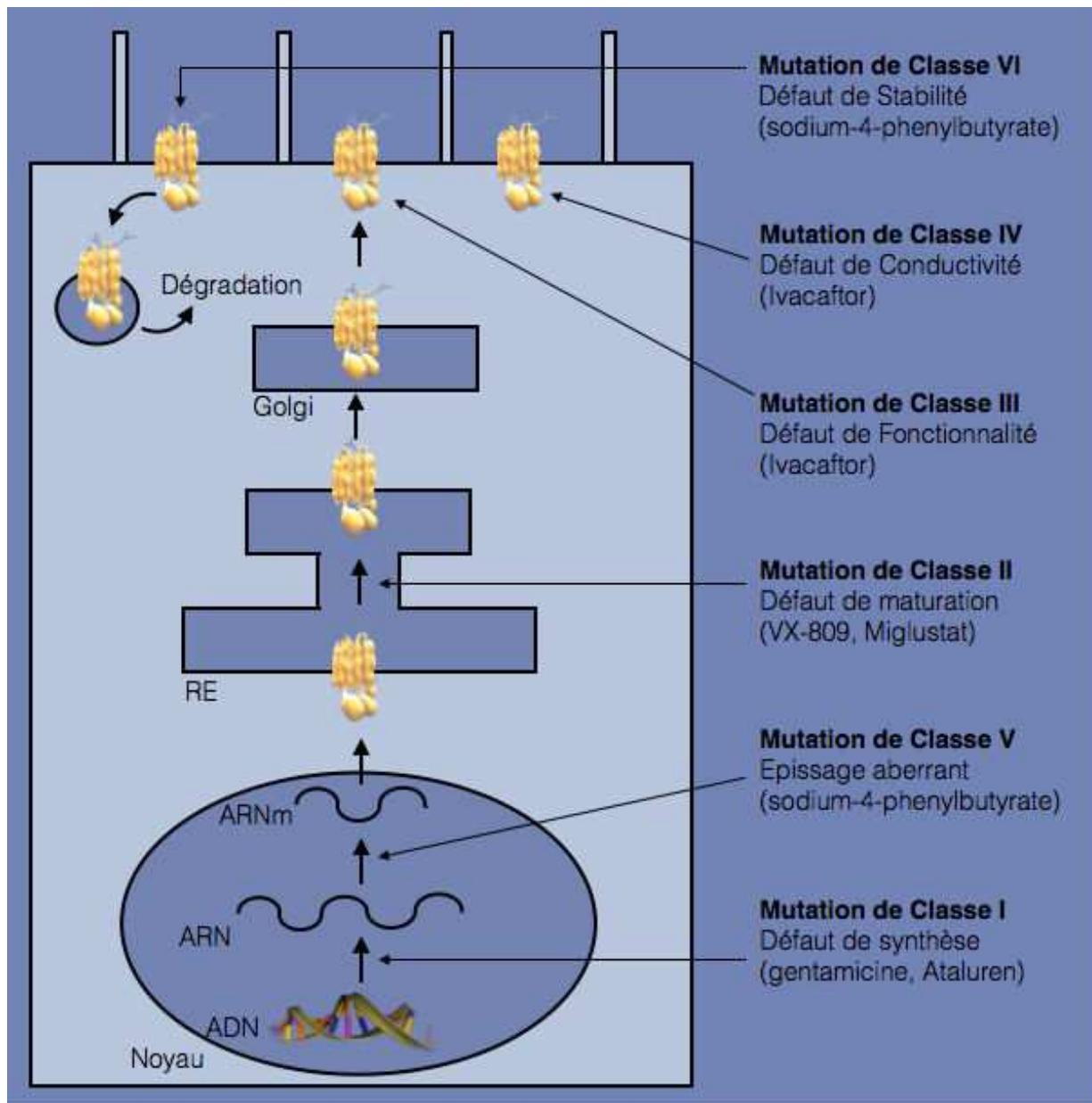
Pour les mutations de classe II, le but des recherches est d'amener les protéines CFTR p.Phe508del à la membrane. Cependant, cela n'est pas suffisant car la protéine CFTR p.Phe508del membranaire ne présente pas une activité complète et elle est

rapidement internalisée (Amaral, 2004 ; Grove *et al.*, 2011). Un traitement combiné de correcteurs (molécule capable d'induire le trafic correct de la protéine à la membrane) et de potentiateurs (molécule capable d'augmenter l'activité de la protéine) est nécessaire. Un correcteur particulier identifié par Vertex, le VX-809, favorise la maturation des protéines CFTR mutées dans les cellules épithéliales nasales humaines. Cependant, son utilisation n'a pas montré un effet sur le transport de chlore à travers la membrane. Des études combinant VX-809 avec le potentiateur VX-770 (Ivacaftor) chez des patients c.1521\_1523delCTT sont en cours.

Le Miglustat est un autre correcteur efficace sur le trafic de CFTR p.Phe508del vers la membrane dans des cellules épithéliales en culture ou isolées de la souris (Noël *et al.*, 2008 ; Lubamba *et al.*, 2009 ; Norez *et al.*, 2009). Toutefois, les différences ne sont pas significatives chez les patients (Leonard *et al.*, 2012) mais certains paramètres de l'étude empêchent l'obtention d'une conclusion définitive sur l'utilité du Miglustat.

Quant à la mutation de classe III c.1652G>A, une grande efficacité de l'**Ivacaftor** dans la stimulation de l'activité de CFTR p.Gly551Asp a été démontré chez les patients de l'étude avec peu d'effets secondaires (Accurso *et al.*, 2010). Ivacaftor est le premier médicament prescrit pour le gène *CFTR* à être approuvé par l'*U.S. regulator*. La combinaison de Ivacaftor avec des correcteurs comme VX-809 est le sujet de plusieurs études pour les mutations d'autres classes.

Pour les mutations de classe V et VI, la stabilité de l'ARNm et de la protéine sont affectées respectivement. Les traitements visent à augmenter le taux d'ARNm et d'induire l'activation maximale des protéines CFTR présentes. Des traitements comme la gentamicine et la sodium-4-phenylbutyrate peuvent être considérés comme utiles.



**Figure 11 :** Les différentes classes des mutations du gène *CFTR* et entre parenthèses les molécules pouvant corriger les défauts induits par les mutations

#### 4.5. Epissage, épissage alternatif et mutations d'épissage.

##### 4.5.1. Epissage

Dans les années 70, la comparaison des ARNm avec des séquences génomiques a montré qu'avant le transport vers le cytosol des séquences sont éliminées (les introns) du ARN-pre-messenger (ARN-pre-m) et les séquences restantes sont liées ensemble (les exons) (Berget et Sharp, 1977). Il a été ensuite rapidement démontré que chez les eucaryotes tous les transcrits subissent dans le noyau ce processus nommé épissage du ARN-pre-m. Chez l'Homme, les exons sont de 50 à 300 nucléotides (Berget, 1995). Les séquences exoniques sont relativement courtes en comparaison avec les séquences introniques qui ont une longueur moyenne de 3400 nucléotides (Deutsch et Long, 1999).

Dans la majorité des cas, l'épissage nécessite d'une part des séquences caractéristiques conservées identifiant les jonctions Exon/Intron, et d'une autre part l'intervention du complexe ribonucléoprotéique appelé spliceosome. En effet, un intron contient trois régions principales : un site donneur en extrémité 5' contenant très souvent un GU, un site accepteur en extrémité 3' se terminant presque toujours par un AG précédé par une région riche en pyrimidines (C et U) et un site de branchement en amont du tractus pyrimidine contenant une Adénine.

##### 4.5.2. Epissage alternatif

Après le séquençage du génome humain en 2004, 20000 à 25000 gènes ont été identifiés (Goodstadt et Ponting, 2006), un nombre relativement faible comparé au nombre de gènes chez des organismes peu complexes et au nombre de protéines produites par le génome humain pouvant atteindre les 100000 protéines au moins. L'épissage alternatif qui induit l'épissage d'un même transcrit primaire en plusieurs ARNm explique ce paradoxe, surtout que 70% des gènes au moins codent pour des transcrits qui subissent un épissage alternatif (Johnson *et al.*, 2003).

La grande majorité de l'ARN-pre-m peut contenir des exons qui peuvent être présents dans l'ARNm mature mais aussi qui peuvent être éliminés par un mécanisme d'épissage alternatif. La présence de ces exons alternatifs donne à l'épissage alternatif un rôle crucial dans la formation des organismes complexes,

augmente la diversité de l'ARNm exprimé d'un même génome et joue un rôle dans l'adaptation de l'organisme aux changements de l'environnement (Kelemen *et al.*, 2013).

L'identification d'un exon alternatif est modulée par la présence d'informations additionnelles données par une gamme extensive et complexe de *cis-acting elements*. Ces éléments peuvent être des *Enhancer* ou *Silencer* qui augmentent ou inhibent la reconnaissance de l'exon respectivement. Ce sont de courtes séquences de près de 10 nucléotides qui sont présentes sur l'ARN-pre-m au niveau des exons (ESEs, *Exonic Splicing Enhancers* et ESSs, *Exonic Splicing Silencers*) mais aussi au niveau des introns (ISEs, *Intronic Splicing Enhancers* et ISSs, *Intronic Splicing Silencers*) (Black, 2003).

Ces séquences caractéristiques des exons alternatifs sont aussi présentes dans les exons « normaux » mais ont subi des variations au cours de l'évolution pour acquérir une faible affinité au spliceosome et donc une faible identité exonique. En effet, les ESEs sont généralement plus faibles dans les exons alternatifs (Wang *et al.*, 2005), une caractéristique conservée au cours de l'évolution (Garg et Green, 2007). Cette conservation indique que c'est un avantage sélectif pour un exon d'être utilisé de façon alternative (Kelemen *et al.*, 2013).

Différents types d'épissage alternatif ont été observés : 1) Un exon qui peut être soit épissé soit présent de l'ARNm, 2) Plusieurs exons sont retenus ou épissés mais pas mutuellement (l'ARNm contient au moins un exon de choix parmi plusieurs exons possibles) 3) Un intron complet est retenu 4) une partie 5' de l'exon 5) ou 3' est épissée avec l'intron 6) ou une partie centrale de l'exon est éliminée.

#### 4.5.3. *Les mutations induisant un épissage alternatif*

Un changement dans l'épissage ou l'épissage alternatif peut conduire à des maladies. D'un point de vue mécanistique les différents types d'épissage alternatif résultent d'un problème d'identification de l'exon par le spliceosome. La décision de garder ou non un exon dépend de la reconnaissance ou l'utilisation du site d'épissage. La faiblesse de ces sites est la cause principale de la réduction de l'affinité envers les spliceosomes. Ainsi des mutations pouvant se produire dans un site

d'épissage ou un élément exonique peuvent induire une altération de ces sites et donc un épissage alternatif. Par la suite, une perte de fonction de l'allèle affecté peut être envisagée ce qui peut modifier la structure de la protéine et donc la gravité de la maladie. Approximativement, 35 % de l'épissage alternatif se produisant dans les cellules des mammifères induit la formation d'ARNm contenant un codon stop prématuré et peuvent être efficacement dégradés par le NMD (Green *et al.*, 2003). De même, les épissages alternatifs résultant des mutations qui ne conduisent pas à un décalage du cadre de lecture provoqueront la formation d'un ARNm tronqué. Ce type d'ARNm forme une protéine incomplète qui pourrait être dégradée lors de la maturation au niveau du RE ou avoir une altération de sa fonction. En conséquence, il n'est pas étonnant que la dérégulation de l'épissage alternatif par une mutation d'épissage est solidement liée à des maladies génétiques acquises ou héréditaires (Wang et Cooper, 2007).

#### 4.5.4. L'épissage alternatif dans le gène *CFTR*: la séquence polymorphe c.[1210-35TG(m);-12T(n)] de l'intron 9

Les études récentes ont démontré que le génome humain est composé à plus de 50% d'éléments répétitifs. Ces éléments varient en complexité en allant d'un gène complet ou d'un long fragment d'ADN à des séquences nucléotidiques très courtes (Sutherland et Richards, 1995). Ces courtes séquences (SSRs, Short Sequence Repeats) sont souvent très polymorphes et, en général, elles sont composées d'un motif contenant de 1 à 20 nucléotides qui se répètent jusqu'à plus de 100 fois (Sutherland et Richards, 1995 ; Csink et Henikoff, 2008). Les rôles de ces séquences sont peu connus mais sont impliquées dans plusieurs maladies comme la dystrophie myotonique (Redman *et al.*, 1993), le syndrome de l'X fragile (Yu *et al.*, 1991), la maladie du Huntington ou une série de maladies neurodégénératives (La Spada *et al.*, 1991).

Le gène *CFTR* est riche en séquences dupliquées et répétitives dont les origines et les fonctions sont souvent très mal connues. Parmi les SSRs du gène figurent la séquences polymorphe c.[1210-35TG(m);-12T(n)] (ou TG(m)T(n)) au niveau du site accepteur de l'intron 9 induisant un épissage alternatif de l'exon 10

adjacent (**Figure 12**) . Cette séquence présente un nombre variable de TG et de T en fonction des individus et des populations. Le transcrit résultant de l'épissage alternatif, provoqué par cette séquence, conduit à l'obtention d'un saut d'exon 10 complet en phase et donc une protéine tronquée ayant une perte de 21% dans la région terminale du NBD1. Cette dernière présente en conséquence un défaut de repliement et elle n'est pas fonctionnelle (Delaney *et al.*, 1993 ; Strong *et al.*, 1993). Le taux de saut d'exon 10 dépend de plusieurs facteurs : 1) Le nombre de répétitions T, 2) Le nombre de répétitions TG, et 3) Du tissu d'expression de la protéine.

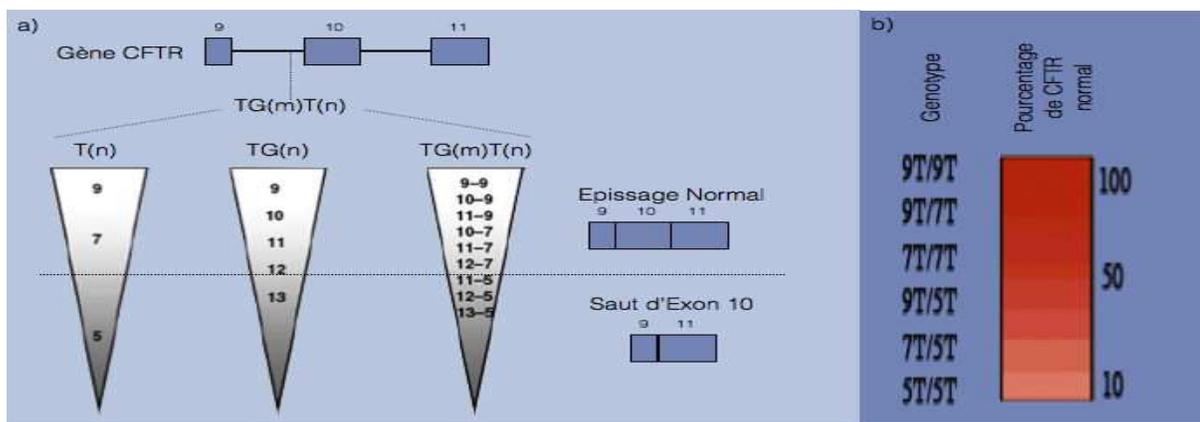
1) En effet, le nombre des répétitions T est généralement de 5, 7 ou 9 avec les fréquences respectives de 5%, 84% et 11% dans une population Caucasienne (Kiesewetter *et al.*, 1993 ; Cuppens *et al.*, 1994). Le taux de saut d'exon 10 est inversement proportionnel au nombre de répétitions T, ainsi les transcrits provenant d'un gène ayant T(5) ont un saut de l'exon 10 plus élevé que ceux provenant d'un gène ayant T(7) ou T(9) (Chu *et al.*, 1993). D'autres nombres de répétitions du T existent mais en fréquences très faibles, notamment un allèle T(3) qui a été reporté dans deux cas : chez un jeune patient allemand (Buratti et Baralle, 2001) et un patient CFTR-RD adulte (Disset *et al.*, 2005).

2) Généralement, le nombre des répétitions TG peut être 11, 12 ou 13. Ces répétitions sont directement localisées en amont des répétitions T et influent sur l'épissage alternatif de l'exon 10 (Niksic *et al.*, 1999 ; Pagani *et al.*, 2000 ; Hefferon *et al.*, 2002). Il a été démontré que plus le nombre de TG est élevé plus il est capable d'augmenter la pénétrance du T(5) et par suite le saut de l'exon 10. Les études conduites *in vitro* utilisant des constructions de minigènes, renfermant les différentes combinaisons des répétitions TG avec le T(5), montrent que l'épissage excluant l'exon 10 décroît en suivant ces combinaisons : TG(13)T(5) > TG(12)T(5) > TG(11)T(5) (Niksic *et al.*, 1999). Le TG(11) est mondialement l'allèle le plus fréquent en association avec le T(7), de ce fait il est considéré comme l'allèle sauvage.

3) Le taux d'épissage peut être aussi influencé par le tissu qui exprime le gène. Des études ont été effectuées sur des biopsies de tissus exprimant un allèle

court au niveau des répétitions T. Ces études montrent que la protéine CFTR fonctionnelle est moins produite dans les tissus reproductifs que dans le tissu respiratoire indépendamment du nombre de T (Teng *et al.*, 1997 ; Mak *et al.*, 1997 Rave-Harel *et al.*, 1997 et Larriba *et al.*, 1998).

Le mécanisme moléculaire expliquant l'effet du site TG(m)T(n) est très peu connu. Cependant, le facteur nucléaire TDP-43 a été identifié comme un nouveau facteur de régulation de l'épissage de l'exon 10 en se liant spécifiquement à l'élément UG(m) du ARN-pre-m (Buratti *et al.*, 2001). La liaison du TDP-43 aux répétitions UG réduit la reconnaissance du site d'épissage en 3' et induit le saut de l'exon 10. Dans des expériences réalisées en 2005 par Disset *et al.*, il a été montré que l'affinité de TDP-43 à l'ARN-pre-m augmente avec un nombre de TG élevé, ce qui expliquerait son effet inhibiteur de l'inclusion de l'exon 10. En revanche, la réduction du nombre de T induisant un saut d'exon 10 élevé n'est pas expliquée à l'heure actuelle, mais il est intéressant de spéculer qu'une moindre distance séparant les répétitions TG du site d'épissage AG rend le site plus accessible aux éléments de l'épissage (Disset *et al.*, 2005). La concentration de TDP-43 est la plus élevée dans les lignées cellulaires testiculaires (Disset *et al.*, 2005), ce qui expliquerait l'augmentation de l'exclusion de l'exon 10 dans ces tissus en comparaison avec les tissus pulmonaires en présence d'un même allèle TG(m)T(n).



**Figure 12 :** Epissage alternatif de l'exon 10 en fonction des différentes combinaisons TG(m)T(n). a) Partie du gène *CFTR* composée des exons 9, 10 et 11 et des introns 9 et 10. La séquence polymorphe TG(m)T(n) au niveau de l'intron 9. Les variantes des *tracts* T et TG avec leurs différentes combinaisons influent le taux du saut d'exon 10. Les triangles représentent la réduction du taux de l'épissage normal. b) pourcentage de CFTR normal (contenant exon 10) en fonction des associations T(n).

## 5. CORRELATION GENOTYPES-PHENOTYPES

La corrélation entre les manifestations cliniques de la mucoviscidose chez un patient avec son génotype ne peut pas être systématique. Diverses causes compliquent la corrélation génotype-phénotype :

### 5.1. La variabilité des tableaux cliniques

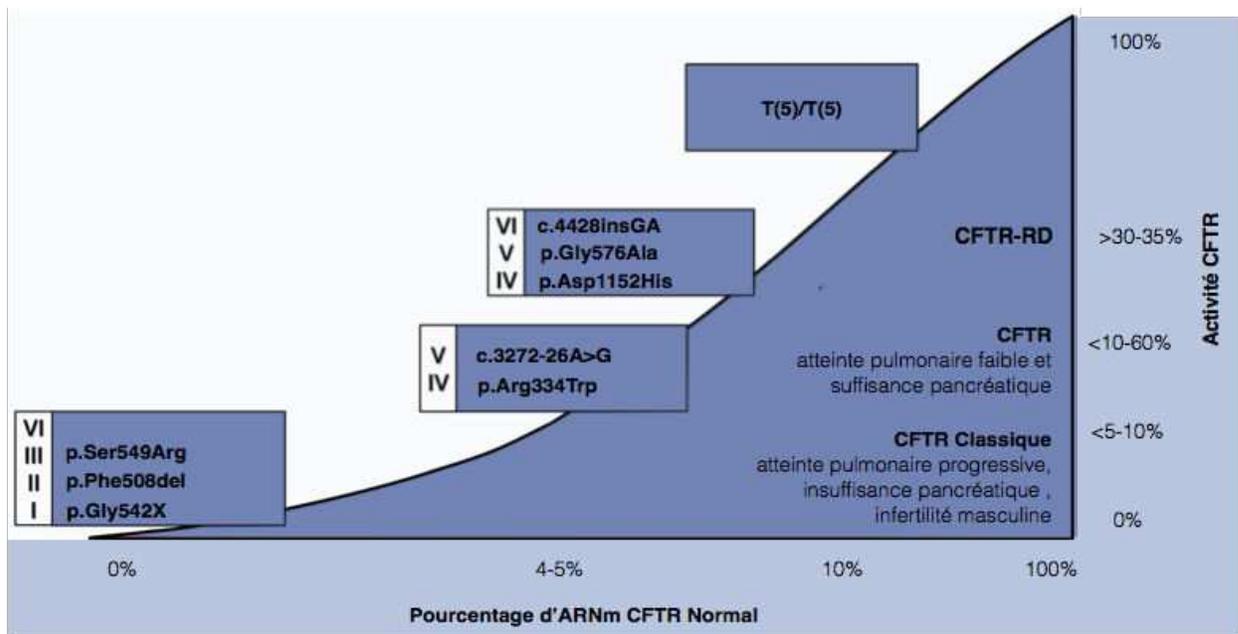
100% des patients mucoviscidoses typiques ont une atteinte pulmonaire et 98% des hommes présentent une azoospermie obstructive et 85% une insuffisance pancréatique (Fiel, 1993). Cependant, le degré de l'atteinte varie considérablement entre les patients ainsi que l'évolution de la maladie. Les iléus méconiaux, cirrhoses biliaires, les pancréatites, les diabètes sont des manifestations qui apparaissent dans 5 à 20% des cas (Fiel, 1993). Cette grande variabilité des tableaux cliniques fait que la mucoviscidose affecte avec des intensités variables des organes différents. Cela exige en premier lieu une approche plus ou moins individuelle des patients afin de déterminer les phénotypes exacts correspondants.

### 5.2. Rareté de la plupart des mutations

Les mutations identifiées peuvent être classées dans trois grandes catégories en fonction de leurs fréquences mondiales. La première catégorie regroupe la mutation c.1521\_1523delCTT qui représente, en moyenne mondiale, 66% de la fréquence des mutations *CFTR*. La deuxième catégorie regroupe une série de mutations rares dont les fréquences varient entre 1 et 3%, dans cette série de mutations figurent entre autres c.1624G>T, c.3846G>A (p.Trp1282X) et c.3909C>G. La troisième série, qui regroupe le plus grand nombre des mutations identifiées, correspond aux mutations très rares dont les fréquences atteignent un maximum de 1% et dont certaines peuvent être trouvées uniquement chez une famille (Bobadilla *et al.*, 2002). Cette grande hétérogénéité des mutations ainsi que la rareté du plus grand nombre des mutations impliquent une approche individuelle pour déterminer exactement les mutations de chaque patient et cela nécessite un séquençage complet des 27 exons du gène pour identifier les mutations non-incluses dans les kits de dépistage.

### 5.3. Variabilité de la gravité des mutations

Les mutations *CFTR* peuvent être classées en mutations dites sévères ou modérées. De façon générale, les mutations non-sens (c.1624G>T, c.1657C>T, c.3846G>A), celles touchant les séquences consensus d'épissage (1717-1G >A, 621+1G>T) et celles induisant un décalage du cadre de lecture (1677delTA, 1078delT par exemple) sont sévères. Par contre, les mutations faux-sens peuvent être modérées ou sévères (Bienvenu, 1997) (**Figure 13**).



**Figure 13 :** Variation du phénotype, dépendant de la mutation *CFTR*, en fonction du pourcentage d'ARNm normal et de l'activité de la protéine *CFTR*.

### 5.4. Diversité des associations des mutations en trans

Un des facteurs déterminant de la sévérité d'un phénotype est l'association des mutations *CFTR* en trans. Non seulement les possibilités d'association en trans sont très variables mais aussi une même association peut avoir des effets différents chez différents patients. Dans le cas de l'insuffisance pancréatique la corrélation est la plus évidente (Bienvenu, 1997). 99% des homozygotes c.1521\_1523delCTT ont une insuffisance pancréatique, alors que 28% des hétérozygotes composites c.1521\_1523delCTT/non-c.1521\_1523delCTT et 64% des patients non-c.1521\_1523delCTT/non-c.1521\_1523delCTT sont suffisants pancréatiques (Kerem *et al.*, 1990). L'hypothèse de ces auteurs postule qu'un enfant développerait une insuffisance

pancréatique s'il porte deux mutations sévères. Par contre, s'il porte seulement une mutation sévère et une mutation modérée ou deux mutations, il n'y aurait pas d'insuffisance pancréatique (Kerem *et al.*, 1990). Cette hypothèse a été confirmée par Kristidis *et al.* en 1992. L'existence d'homozygotes c.1521\_1523delCTT ou d'hétérozygotes composites c.1521\_1523delCTT/c.1652G>A suffisants pancréatiques, même s'ils sont rares, est toutefois un obstacle à une généralisation absolue de cette théorie (Bienvenu, 1997).

La corrélation entre le génotype et la sévérité de l'atteinte pulmonaire est très controversée (Bienvenu, 1997). En effet, des équipes avaient montré que les patients homozygotes c.1521\_1523delCTT pouvaient présenter une forme soit grave soit modérée de la maladie (Borgo *et al.*, 1990 ; Santis *et al.*, 1990).

### **5.5. Diversité des associations des mutations en cis**

Les associations de mutations sur un même allèle sont un facteur qui rend la corrélation entre un phénotype et un génotype plus complexe. En effet, une mutation peut avoir un effet modifié si elle est associée à une autre mutation ou polymorphisme intronique ou exonique en cis (Kiesewetter *et al.*, 1993 ; Fanen *et al.*, 1999, Claustre *et al.*, 2000). Ainsi, un séquençage complet des 27 exons et les régions introniques frontières s'avère être une nécessité chez chaque patient afin de déterminer son génotype et de découvrir de nouveaux allèles complexes (Storm *et al.*, 2002).

### **5.6. Présence des séquences polymorphes induisant un épissage alternatif variable**

La séquence la plus influente dans ce contexte est la séquence TG(m)T(n) de l'intron 9 développée dans une partie précédente.

### **5.7. Influence d'autres facteurs**

Les exemples de frères et sœurs ayant les mêmes profils génétiques au niveau du gène *CFTR* mais une hétérogénéité dans le degré de l'atteinte respiratoire (Borgo *et al.*, 1990) suppose que la maladie peut être modulée par d'autres facteurs. D'autres gènes comme les gènes contrôlant la réponse immunitaire cellulaire ainsi que la réponse inflammatoire pourraient avoir une influence sur la progression de l'atteinte

respiratoire (Bienvenu, 1997). De plus, des facteurs environnementaux peuvent avoir une influence sur le phénotype CF notamment la précocité du traitement, la nutrition et le tabagisme passif. La détermination et l'évaluation de ces facteurs ne sont pas évidentes, dues à la grande variabilité des génotypes. De ce fait, les effectifs des patients ayant le même génotype est réduit (Bienvenu, 1997). Pour contourner ce problème, des modèles animaux peuvent être utilisés.

## 6. LES MUTATIONS ET LES ALLELES COMPLEXES ETUDIES DANS CES TRAVAUX

Dans le cadre de ces travaux, trois études de mutations du gène *CFTR* ont été effectuées (**Tableau 1**).

1- Dans une première partie, les conséquences physiopathologiques de la mutation c.1392G>T de l'exon 10 (Nouvelle nomenclature : c.1392G>T et p.Lys464Asn, Ancienne nomenclature : K464N) ont été évaluées. Cette mutation a été identifiée la première fois à l'Hôpital Purpan de Toulouse chez un patient français en 2003. Depuis cette date, plusieurs analyses cliniques ont été effectuées sur le patient pour déterminer son phénotype exact. De plus, l'évaluation de l'activité canal CFTR a été réalisée directement sur le patient. Au niveau cellulaire, des études ont été réalisées *in silico*, *in cellulo* et *in vivo* pour déterminer les impacts de la mutation sur l'ARN et la protéine.

La présence de cette mutation au niveau du dernier nucléotide de l'exon 10 suggère un effet sur l'épissage. De ce fait, l'impact de la mutation sur l'épissage aberrant a été évalué d'abord *in cellulo*. L'effet du polymorphisme c.[1210-35TG(m);-12T(n)] (ou TG(m)T(n)) de l'intron 9 sur l'épissage a été aussi pris en considération en évaluant les impacts de la mutation c.1392G>T en association avec le c.[1210-35TG(11);-12T(7)] (TG(11)T(7)) et avec le c.[1210-35TG(11);-12T(5)] (TG(11)T(5)). Le polymorphisme TG(11)T(7) est considéré comme WT car il est le plus fréquent dans la population et le TG(11)T(5) est le polymorphisme associé à la mutation chez le patient. Ainsi, l'étude de l'épissage de la mutation c.1392G>T a été effectuée par le biais de quatre constructions plasmidiques c.[TG(11)T(5); c.1392G], c.[TG(11)T(7); c.1392G], c.[TG(11)T(5); c.1392G>T], c.[TG(11)T(7); c.1392G>T].

La détection d'ARNm porteur de la mutation, a conduit à l'étude de la protéine porteuse de la mutation p.Lys464Asn. Des expériences *in cellulo* ont été menées sur la localisation et la maturation de protéine, ainsi que la fonctionnalité de la protéine *in vivo*.

2- Dans une deuxième partie, la mutation c.3909C>G de l'exon 24 (Nouvelle nomenclature : c.3909C>G et p.Asn1303Lys, Ancienne nomenclature : N1303K), largement répondue mondialement, a fait l'objet d'une étude évaluant son effet seule et dans le cadre d'un allèle complexe. Le phénotype variable de la mutation chez les patients et sa fréquence élevée au Liban ont conduit à la meilleure compréhension de la mutation et à la recherche de mutations associées dans la population libanaise.

Les études de l'ARNm ont évalué l'effet de la mutation c.3909C>G sur l'épissage. De plus, l'effet sur l'épissage de deux polymorphismes ; c.744-33GATT(6-7) (ou GATT(6-7)) de l'intron 6 et le c.869+11C>T de l'intron 7, toujours associés à cette mutation a été étudié. Les deux polymorphismes sont présents sur tous les allèles c.3909C>G sous la forme mutée : GATT(6) et c.869+11C>T. Ainsi deux allèles complexes ont été détectés. Le premier allèle complexe, c.[744-33GATT(7) ; 869+11C] (ou c.[GATT(7) ; 869+11C]), est considéré comme WT car il est l'allèle le plus fréquent. Le second, c.[744-33GATT(6) ; 869+11C>T] (ou c.[GATT(6) ; 869+11C>T]), est l'allèle muté et il est toujours associé en cis avec la mutation c.3909C>G dans notre étude.

Au niveau de la protéine, l'effet de la mutation a été déterminé par diverses techniques. Les études de la maturation, la localisation et la fonctionnalité ont été réalisées afin de préciser les effets exacts de la mutation sur la protéine.

3- Dans une troisième partie, la mutation c.965T>C de l'exon 8 (Nouvelle nomenclature : c.965T>C et p.Val322Ala, Ancienne nomenclature : V322A) a été étudiée chez une famille Bretonne ayant un risque sur quatre d'avoir un enfant c.1521\_1523delCTT/c.965T>C. Cette mutation a été identifiée en 1995 mais aucune étude n'a indiqué son impact au niveau de la protéine. La recherche de son effet est nécessaire pour donner un diagnostic prénatal à la famille. Ainsi, des études de maturation, localisation et fonctionnalité ont été réalisées *in cellulo* sur le protéine p.Val322Ala.

**Tableau 1:** Tableau des mutations et alleles complexes étudiés dans ces travaux

Nomenclature utilisée dans le rapport		Ancienne nomenclature	Nomenclature	Nomenclature utilisée dans le rapport
ADN	Protéine	ADN/Protéine	Variantes des allèles complexes étudiés	
c.1392G>T	p.Lys464Asn	K464N	c.[1210-35TG(11);-12T(7); c.1392G]	c.[TG(11)T(7); 1392G]
			c.[1210-35TG(11);-12T(5); c.1392G]	c.[TG(11)T(5); 1392G]
c.[1210-35TG(m);-12T(n)]	-	TG(m)T(n)	c.[1210-35TG(11);-12T(7); c.1392G>T]	c.[TG(11)T(7); 1392G>T]
			c.[1210-35TG(11);-12T(5); c.1392G>T]	c.[TG(11)T(5); 1392G>T]
c.3909C>G	p.Asn1303Lys	N1303K	-	-
c.[744-33GATT(6-7)]	-	GATT(6-7)	c.[744-33GATT(7);869+11C]	c.[GATT(7); 869+11C]
c.[869+11C>T]	-	-	c.[744-33GATT(6);869+11T]	c.[GATT(6); 869+11C>T]
c.965T>C	p.Val322Ala	V322A	-	-

## CHAPITRE 2 MATERIELS ET METHODES

### 1. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

#### 1.1. Les acides nucléiques utilisés

##### 1.1.1. ADN génomique

Les échantillons d'ADN sont obtenus par prélèvement sanguin d'individus atteints de la mucoviscidose et d'individus sains. Les prélèvements sanguins sont effectués sur anticoagulant EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique). Chaque prélèvement est accompagné d'un formulaire recueillant des informations du patient et de sa famille relatives aux symptômes et aux origines ethniques.

Les échantillons d'ADN permettent d'identifier les mutations présentes sur le gène *CFTR*, de déterminer les allèles complexes et sont utilisés comme support pour la préparation des inserts lors de la construction des minigènes.

Pour l'étude de la mutation c.1392G>T (p.Lys464Asn), l'ADN du patient a été obtenu par le Service de génétique médicale à l'Hôpital Purpan de Toulouse, France. Cet échantillon a permis d'identifier pour la première fois cette mutation par l'équipe du Dr. Eric Bieth.

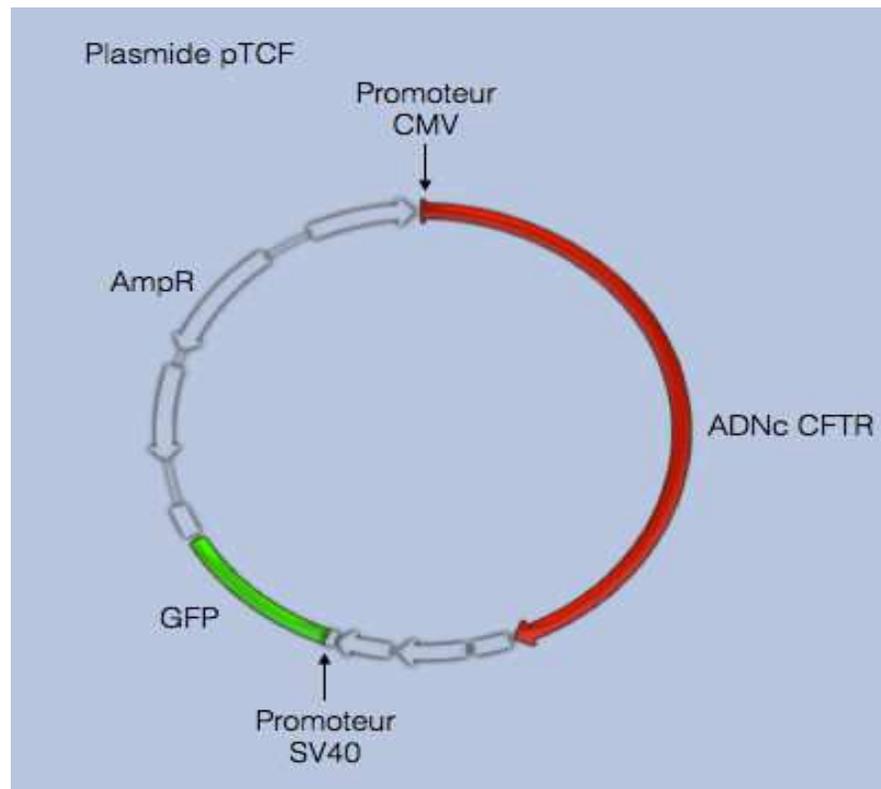
Pour l'étude de la mutation c.3909C>G (p.Asn1303Lys) et ses allèles complexes dans la population libanaise, les échantillons proviennent de patients libanais ayant au moins un allèle porteur de la mutation. Les échantillons d'ADN de ces patients et de leurs parents sont obtenus du laboratoire de génétique de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth, Liban.

Pour l'étude de la mutation c.965T>C (p.Val322Ala), l'ADN est obtenu à partir d'une famille bretonne étudiée au CHU de Poitiers.

### 1.1.2. Plasmides

#### 1.1.2.1. Plasmide pTCF

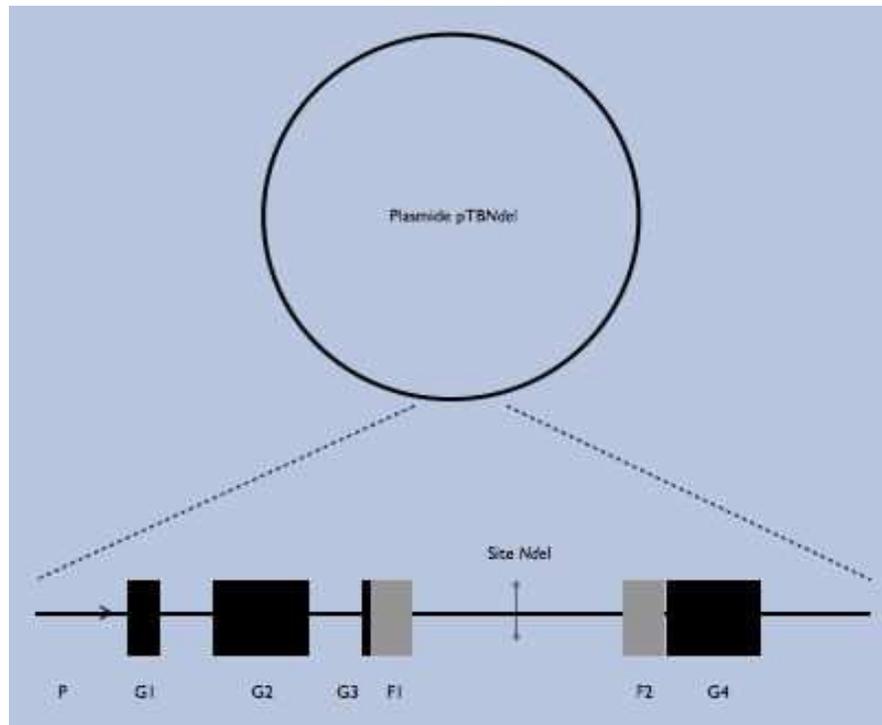
Pour l'évaluation des effets d'une mutation sur la maturation et la localisation de la protéine CFTR Le plasmide pTCF (don généreux du Dr. Fanen) est utilisé (**Figure 14**). pTCF est un vecteur conçu pour produire la protéine CFTR dans les cellules transfectées par ce plasmide. Il produit aussi la *Green Fluorescent Protein* (GFP) pour la visualisation des cellules transfectées et un gène de résistance à l'ampicilline (AmpR). Le plasmide contient l'ADN complémentaire (ADNc) de *CFTR* sous le contrôle du promoteur fort du cytomégalo virus (CMV) alors que la GFP est sous le contrôle du promoteur SV40. La présence de deux promoteurs différents est une caractéristique de ce plasmide.



**Figure 14 :** Le plasmide pTCF. L'ADNc *CFTR* est indiqué en rouge avec son promoteur CMV. L'ADNc de la *Green Fluorescent Protein* (GFP) est indiqué en vert avec son promoteur SV40. Un gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection des clones.

### 1.1.2.2. Plasmide *pTBNdeI*

Pour l'évaluation des effets d'une mutation sur un épissage alternatif aberrant, le plasmide *pTBNdeI* (don généreux du Pr. Pagani) est utilisé (**Figure 15**). *pTBNdeI* est un vecteur conçu pour la création d'un minigène et la transfection de cellules eucaryotes. Il contient en 5' le promoteur alpha-globine et un enhancer SV40 pour permettre à la polymérase II de réaliser son activité transcriptionnelle. Ces promoteurs sont suivis par des exons alpha-globines et fibronectines alternés par des séquences introniques. Un site fonctionnel de polyadénylation dérivé du gène de l'alpha globine est localisé dans la région 3'. L'ADN génomique d'intérêt, contenant des parties introniques, de part et d'autre d'un exon avec le site de la mutation à étudier, est introduit dans le minigène *via* un site unique de restriction pour l'enzyme *NdeI* localisé dans un intron fibronectine. Le plasmide contient aussi un gène de résistance à l'ampicilline.



**Figure 15** : Le plasmide *pTBNdeI* et le site d'insertion du minigène au niveau du site de restriction de l'enzyme *NdeI*. De part et d'autre de l'intron contenant le site de restriction *NdeI* se trouvent les exons Globine (rectangles noirs), les exons Fibronectine (rectangles gris) et les introns globine (ligne noire). La flèche représente la région promotrice contenant le promoteur alpha-globine et l'enhancer SV40.

### 1.1.3. ARN

Les échantillons d'ARN sont obtenus à partir de prélèvement de cellules nasales des parents du patient porteur de la mutation c.1392G>T. Les cellules du patient n'ont pas été prélevées suite au refus des parents. Les cellules ont été obtenues dans le Service de génétique médicale à l'Hôpital Purpan de Toulouse, France en suivant le protocole établi et validé par le Pr. Coste au service ORL et Chirurgie Cervico-Faciale au CHU Henri Mondor de Créteil.

Les cellules sont obtenues par grattage du tiers moyen du cornet inférieur sans appui excessif. La solution de Xylocaine 5%-naphazoline est utilisée comme anesthésique afin de réduire une possible douleur en l'appliquant pendant 10 min à l'aide d'une cotonnette. Le brossage du tiers moyen du cornet inférieur (face interne) est réalisé avec une brosse à cytologie vaginale humidifiée dans du sérum physiologique, sous contrôle endoscopique. Les cellules sont suspendues dans un tube de 2mL contenant une solution RNeasy® (Qiagen) qui évite la dégradation de l'ARNm et permet une conservation à 25°C pendant 1 semaine.

Dans les études *in cellulo*, les ARN sont extraits de cellules en culture après leurs transfections.

## 1.2. Les techniques de base utilisées

### 1.2.1. Techniques d'extraction

#### 1.2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait à partir de cellules du sang périphérique. L'extraction se fait en utilisant le QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) et en suivant le protocole du fournisseur. Dans un microtube, 200µL de sang, 20µL de protéase et 200µL de tampon AL sont mélangés puis incubés au bain-marie à 56°C pour assurer la dégradation des protéines. Après 10min d'incubation, 200µL d'éthanol sont ajoutés et mélangés à l'aide d'un vortex pendant 15 secondes. La solution est versée sur une colonne munie d'un tube collecteur. L'alcool ajouté à la solution imbibe la colonne et permet à l'ADN d'adhérer. Une première centrifugation de la colonne est alors effectuée durant 1min à 8000g

pour éliminer les débris indésirables. Après élimination du surnageant présent dans le tube collecteur, la colonne est lavée, pour éliminer les débris qui persistent, avec 500µL de AW1 puis centrifugée durant 1min à 8000g. Une fois le surnageant éliminé, la colonne est lavée, une deuxième fois, avec 500µL de AW2 et centrifugée 3min à 14000g. L'ADN est récupéré en ajoutant 200µL du tampon d'élution dans la colonne. Après au moins 5min, une dernière centrifugation est effectuée durant 1min à 8000g. L'ADN génomique obtenu est conservé à 4°C.

#### 1.2.1.2. Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction de l'ADN plasmidique est effectuée à partir des bactéries transformées contenant le plasmide d'intérêt. Les techniques d'extraction diffèrent en fonction de la quantité de plasmides obtenue. Pour une faible quantité de plasmides, une miniextraction est réalisée avec le kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Pour une plus grande quantité de plasmides, une mégaextraction est réalisée avec le kit QIAGEN Plasmid Mega (Qiagen). Les extractions sont réalisées selon les recommandations du fournisseur.

#### 1.2.1.3. Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN est effectuée à partir de cellules nasales épithéliales humaines et des lignées cellulaires transfectées. L'extraction est réalisée à l'aide du Mini kit QIAGEN RNeasy (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant. Afin de minimiser la contamination par l'ADN génomique, la préparation est digérée sur colonne par la DNase RNase-free (Qiagen).

Si l'extraction est réalisée sur des lignées de cellules adhérentes, les cellules sont d'abord lavées en ajoutant 2mL de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) (Sigma) pour éliminer les débris cellulaires. Les cellules sont ensuite détachées par la trypsine 0,05% (Sigma) et transférées dans un tube à centrifuger. Elles sont centrifugées pendant 5min à 300g et le surnageant est éliminé par aspiration. Les cellules sont solubilisées en ajoutant du tampon RLT du kit par pipetages successifs. S'il s'agit de cellules épithéliales nasales, les cellules, dans la solution de RNeasy Lysis Reagent (Qiagen), sont centrifugées pendant 5min à 300g. Une fois

la solution aspirée, les cellules sont solubilisées en ajoutant du tampon RLT du kit par pipetages successifs.

Le tampon RLT induit la lyse des cellules. Un volume d'éthanol 70% équivalent au volume du lysat est ajouté sur le lysat. L'éthanol imbibe la colonne utilisée dans l'étape suivante pour favoriser l'adhésion de l'ARN. 700 $\mu$ L de l'échantillon est transvasé dans une colonne placée dans un tube de collecteur de 2mL, puis centrifugé pendant 15s à 8000g. Cette étape permet l'élimination des débris indésirables. Après élimination du surnageant présent dans le tube collecteur, la colonne est lavée, pour éliminer les débris qui persistent en ajoutant 700 $\mu$ L de RW1. La colonne est centrifugée à 8000g pendant 20s et le surnageant est ensuite éliminé. Un deuxième lavage est effectué en ajoutant 500 $\mu$ L de RPE sur la colonne, suivi d'une centrifugation à 8000g pendant 1min. L'ARN est récupéré après l'ajout de 50 $\mu$ L d'eau RNase free. 3min de contact minimum entre la colonne et l'eau sont nécessaires avant une dernière centrifugation d'une minute à 8000g. Rapidement, l'ADNc est préparé à partir de l'extraction d'ARN, et le reste est ensuite conservé à -80°C.

### 1.2.2. Dosage des acides nucléiques

Le dosage des acides nucléiques est réalisé par spectrophotométrie. Le principe du dosage se base sur la capacité des bases puriques et pyrimidiques à absorber dans l'ultraviolet (UV) à 260nm. Une unité d'absorbance à 260nm correspond à l'absorption d'une solution d'ADN double brin à la concentration de 50 $\mu$ g/mL. Ainsi, le calcul de la concentration de l'ADN en  $\mu$ g/mL utilise la formule :  $[ADN] = A_{260nm} \times \text{facteur de dilution} \times 50$ . Certains contaminants peuvent être présents dans une solution d'ADN. Le dosage permet aussi de déterminer la qualité de la solution. Il permet de vérifier la présence une éventuelle contamination protéique dont le pic d'absorption maximal est à 280nm. De ce fait, une mesure de l'absorbance à 280nm est réalisée et un rapport  $A_{260nm}/A_{280nm}$  est calculé. Ce rapport indique une qualité correcte de l'ADN s'il est compris entre 1,6 et 1,8.

Pour déterminer la concentration de l'ARN, la formule suivante est utilisée :  $[ARN] = A_{260nm} \times \text{Facteur de dilution} \times 40$ .

### 1.2.3. Amplification par Polymerase Chain Reaction

La PCR est une technique largement utilisée dans la biologie moléculaire pour amplifier un fragment spécifique d'ADN. Elle nécessite la connaissance des séquences du fragment à amplifier. Le couple d'amorces est en conséquence déterminé en fonction des extrémités et son utilisation permet l'amplification spécifique du fragment désiré. L'amplification de fragments par PCR classique se fait dans un volume de 50 $\mu$ L de réaction contenant 100ng d'ADN, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25mM de chaque dNTP, 1U de Taq polymérase-2 (Amersham) et 20 pmoles de chaque amorce sont ajoutés. Le programme d'amplification par PCR contient les étapes suivantes : 5 min à 94°C, 30 cycles de 30s à 94°C, 30s à la température d'hybridation, et 30s à 72°C. Après amplification, une étape d'extension prolongée à 72°C est réalisée pendant 5 min.

### 1.2.4. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Suite à une amplification d'un fragment par PCR, les échantillons sont déposés dans un gel d'agarose pour vérifier la réalisation de l'amplification spécifique du fragment d'intérêt. Le gel utilisé est, dans la majorité de nos expériences, à 1,5% d'agarose (Eurogentec) dans un tampon de Tris-Acétate-EDTA 0.5X (TAE 0.5X). La migration est réalisée en plaçant le gel dans un champ électrique de 100 volts pendant 15 à 20min. Ainsi, les fragments, chargés négativement, migrent vers l'anode en fonction de leur poids moléculaire. L'ADN est visualisé par le Bromure d'Ethydium (BET) (Fermentas), ajouté lors de la préparation du gel, et qui est un intercalant de l'ADN. Le volume d'échantillon d'ADN déposé est de 6 $\mu$ L mélangé à 3 $\mu$ L de bleu de charge 3X (BioLabs). La taille des fragments obtenus est déterminée en les comparant au marqueur de taille  $\Phi$ X174DNA digéré par *Hae*III (Fermentas). Le marqueur de taille Lambda DNA/*Hind*III (Fermentas) est utilisé pour des fragments de plus grandes tailles, notamment lors de la migration de plasmides clivés ou non.

### 1.2.5. Electrophorèse d'ADN sur gel de polyacrylamide

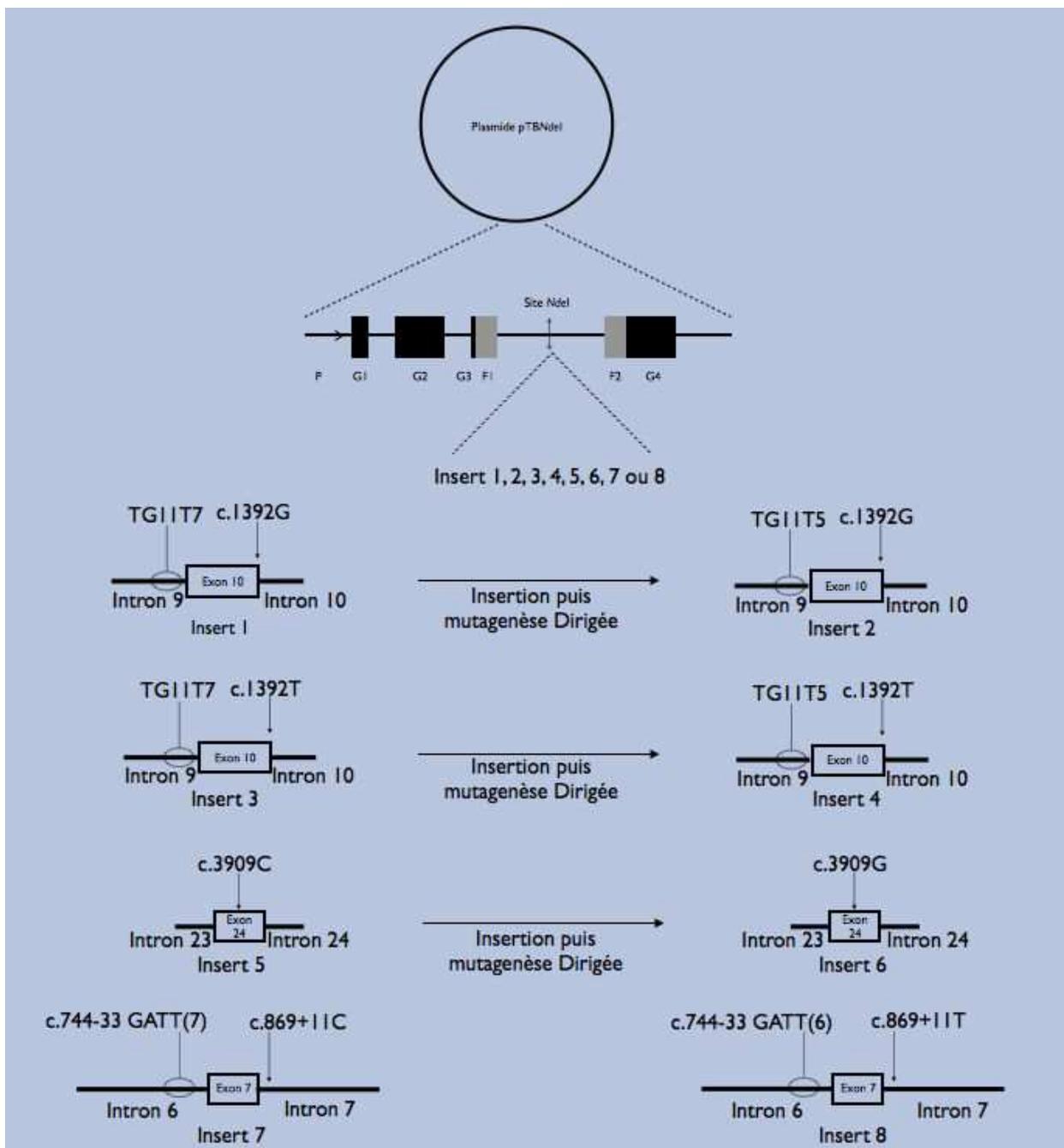
Pour une meilleure séparation de fragment d'ADN, les échantillons peuvent être déposés dans un gel d'acrylamide non dénaturant de 10%. Le gel est composé de 22,8mL d'eau, de 3,5mL du tampon Tris-Borate-EDTA 10X (TBE 10X), 8,7mL d'acrylamide 40%, 180µL d'Ammonium Persulfate (APS) (Sigma). La migration est reliée en plaçant le gel dans un champ électrique de 160 volts et 140mA pendant 24h. L'ADN est visualisé suite à l'incubation du gel dans une solution de BET.

### 1.2.6. Séquençage

Le séquençage est utilisé pour déterminer l'enchaînement des acides nucléiques d'un fragment d'ADN préalablement amplifié par PCR classique. Le produit de la PCR est soumis à l'action du réactif ExoSAP-IT (Affymetrix) contenant l'exonucléase I et la *Shrimp Alkaline Phosphatase* dans un tampon adéquat. Ce réactif dégrade l'excès d'amorces et de dNTP non utilisés pouvant interagir avec l'étape du séquençage. 2µL d'ExoSAP sont ajoutés sur le produit PCR pendant 15min à 37°C puis l'enzyme est dégradée en augmentant la température à 80°C pendant 15min. Après cette étape de nettoyage enzymatique, une PCR spécifique au séquençage est réalisée en utilisant des nucléotides portant chacun un fluorochrome différent contenu dans le kit ABI PRISM BigDye Terminator™ cycle sequencing Reading Reaction (Applied Biosystem). Pour ce fait, 2µL de BigDye et 1µL de l'amorce sens sont ajoutés à 2µL du produit de l'ExoSAP. Le même mélange est préparé dans un autre tube mais avec 1µL d'amorce reverse. Les deux mélanges (sens et reverse) sont soumis chacun à 25 cycles de PCR. Chaque cycle est composé d'une étape de dénaturation de 10s à 96°C, d'une étape d'hybridation de 5s à 50°C et une étape d'extension de 4min à 60°C. Après cette PCR, une étape de nettoyage final du produit de PCR est nécessaire avant de pouvoir séquencer l'ADN. Cette étape est réalisée à l'aide du kit DyeEx (Quiagen). Pour cela, 15µL d'eau distillée sont ajoutés sur les 5µL du produit PCR. Les 20µL sont ensuite déposés sur la colonne du Kit munie d'un tube collecteur et centrifugés pendant 3min à 750g. Le produit récupéré dans le tube collecteur est prêt pour le séquençage. Il faut noter qu'avant l'utilisation de la colonne du kit, elle doit subir une première centrifugation pendant 3min à 750g.

### 1.3. La construction de minigène hybride

Pour la construction d'un minigène hybride, un fragment contenant des parties introniques et exoniques doit être inséré dans le plasmide pTB*Nde*I (**Figure 16**).



**Figure 16 :** Les différents inserts utilisés et leur introduction au niveau du plasmide *Nde*I. Les inserts 1, 3, 5, 7 et 8 sont obtenus par amplification de la région sur l'ADN génomique. Les inserts 2, 4 et 6 sont obtenus après la réalisation de la mutagenèse dirigée sur des plasmides pTB*Nde*I contenant les inserts 1, 3 et 5 respectivement.

L'introduction de l'insert a lieu au niveau de l'unique site de restriction *NdeI* du plasmide.

Pour réaliser cette construction, le plasmide doit être d'abord préparé, ensuite le fragment d'intérêt doit être amplifié et finalement une ligature doit être réalisée. Au cours de nos travaux, les études de l'effet de la mutation c.3909C>G de l'exon 24 et des deux allèles complexes c.[GATT(6-7) ; 869+11C>T] et c.[TG(11)T(5-7); 1392G>T] sur un potentiel épissage aberrant ont été réalisées par plusieurs constructions plasmidiques.

### 1.3.1. Préparation du plasmide pTB*NdeI*

La préparation du plasmide pTB*NdeI* doit subir d'abord une digestion enzymatique suivie de la création de bouts francs aux extrémités du plasmide clivé.

Pour assurer le clivage, l'enzyme de restriction *NdeI* (Promega) est utilisée. Elle reconnaît la séquence 5'*CATATG*3' unique dans le plasmide. L'enzyme clive après le 5'*CA*3' créant ainsi des bouts cohésifs. Cette étape est réalisée en ajoutant 20µL du plasmide non clivé, 1,6µL de l'enzyme *NdeI* et 2,4µL du tampon de l'enzyme 10X « Buffer 4 ». Le mélange est incubé à 37°C pendant 1h.

Les bouts cohésifs doivent être transformés en bouts francs pour éviter la fermeture du plasmide et pour permettre l'insertion du fragment d'intérêt qui a aussi des bouts francs.

Cette étape nécessite l'ajout d'un mélange de dATP et de dTTP avec l'enzyme *DNA Polymerase I, Klenow Fragment from Escherichia coli* (Sigma) qui a pour effet de combler les bouts cohésifs. La préparation de la solution de d(AT)TP est obtenue en diluant 10µL de chaque nucléotide de concentration initiale de 100mM chacun avec 20µL d'eau distillée. La concentration finale est de 25mM pour chaque nucléotide.

Le comblement des bouts cohésifs est obtenu en incubant à 37°C pendant 1h une solution contenant 1µL de d(AT)TP, 0,5µL d'enzyme de Klenow, 2µL de tampon 10X et 16,5µL de plasmide pTB clivé.

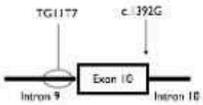
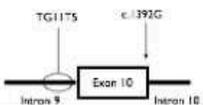
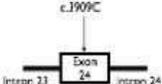
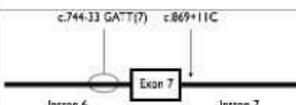
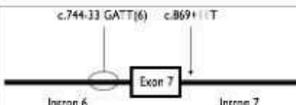
1.3.2. Préparation de l'insert

La préparation de l'insert se fait par PCR. Le choix des amorces (**Tableau 2**) permet de déterminer la taille du fragment à insérer.

Les trois inserts utilisés sont formés :

- Pour l'étude de l'allèle complexe c.[TG(11)T(5-7); 1392G>T], l'insert contient 186pdb de l'extrémité 3' de l'intron 9, les 183pdb de l'exon 10 et 114pdb de l'extrémité 5' de l'intron 10.
- Pour l'étude de la mutation c.3909C>G de l'exon 24, l'insert contient 100pdb de l'extrémité 3' de l'intron 23, les 90pdb de l'exon 24 et 100pdb de l'extrémité 5' de l'intron 24.
- Pour l'étude de l'allèle complexe c.[GATT(6-7) ; 869+11C>T], l'insert contient 335pdb de l'extrémité 3' de l'intron 6, les 126pdb de l'exon 7 et 326pdb de l'extrémité 5' de l'intron 7.

**Tableau 2 :** Les différents inserts avec les amorces utilisées pour leur préparation et la vérification de leur insertion correcte dans le plasmide pTBNdel

	Préparation de l'insert		Ligature	
Mutations et allèles complexes	L'insert	Amorces utilisées pour la préparation de l'insert	Amorces utilisées pour vérifier l'introduction de l'insert dans le bon sens suite à la ligature	
TG(11)T(7); c.1392G (TG(11)T(7); WT)		<b>Sens sur intron 9 de CFTR</b> 5'TGTATACATGTATGTATTGAG3'	<b>Sens sur intron F1 du plasmide pTBNdel</b> 5'ACTTCAGATATTATGTCTAGG3'	
TG(11)T(5); c.1392G (TG(11)T(5); WT)		<b>Reverse sur intron 10 de CFTR</b> 5'ACATTCTCCTAATGCTCATG3'		
c.3909C (WT)		<b>Sens sur intron 23 de CFTR</b> 5'ACTTGATGGTAAGTACATGG 3'		<b>Reverse sur intron F2 du plasmide pTBNdel</b> 5' CCCCATGTGAGATATCTAG 3'
c.[744-33GATT(7);869+11C] (GATT(7); 869+11C) (WT)		<b>Sens sur intron 6 de CFTR</b> 5'CCAGATTGCATGCTTACTA3'		
c.[744-33GATT(6);869+11T] (GATT(6); 869+11T) (muté)		<b>Reverse sur intron 7 de CFTR</b> 5'AGTTACCAATCAGCCTTCA3'		

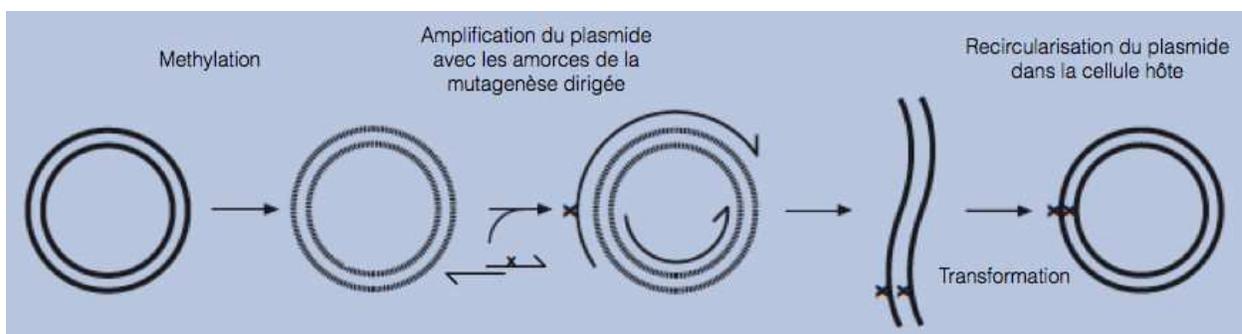
### 1.3.3. Ligature

La ligature consiste à insérer le fragment amplifié dans le plasmide. Théoriquement, dans les meilleures conditions de ligature, l'insert et le plasmide doivent être présents avec un rapport moléculaire de 1 pour 3 à 5. Souvent plusieurs rapports sont testés pour avoir une ligature correcte. Les réactions de ligature sont effectuées en ajoutant 3 $\mu$ L du plasmide clivé ayant des bouts francs, 1 $\mu$ L de T4 DNA ligase (BioLabs), 1 $\mu$ L du tampon de la T4 DNA ligase 10X, 4 $\mu$ L du fragment PCR digéré et 4 $\mu$ L d'eau stérile. Le mélange réactionnel est incubé pendant 2h à 20°C puis à 4°C toute la nuit.

## 1.4. La mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée est une technique qui permet de générer une variation au niveau d'une séquence nucléotidique connue d'un ADN circulaire (**Figure 17**). La technique est basée sur la réalisation d'une PCR ayant des caractéristiques spécifiques qui varient en fonction du kit utilisé.

Selon le kit *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen), les amorces sens et reverse utilisées doivent avoir une partie, de 20 à 30pb, qui s'hybrident sur une région commune du plasmide. Ce type d'hybridation assure la fermeture des plasmides générés lors des cycles PCR. Ensuite, l'une des amorces doit contenir une variation qui correspond à la mutation à insérer. Cette variation se trouve généralement sur le premier nucléotide qui suit la région commune. De plus, l'ADN polymérase est spécifique, elle doit être d'une grande fidélité de réplication. Finalement, la PCR se fait sur un plasmide méthylé. Cette méthylation permet la dégradation des plasmides parentaux par la digestion avec l'enzyme *DpnI*, lors d'une étape qui suit la PCR.



**Figure 17 :** Les étapes de la mutagenèse dirigée, selon le Kit *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen)

1.4.1. Méthylation

La méthylation est réalisée dans un mélange réactionnel contenant 100ng d'ADN plasmidique, 1,6µL de tampon de méthylation, 1,6µL du S-adénosylméthionine 10X (SAM 10X) (Invitrogen), 1µL d'ADN méthylase (4U/µL) (Invitrogen) et de l'eau distillée stérile qsp 16µL. Le mélange est incubé 1h à 37°C.

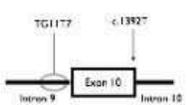
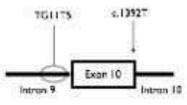
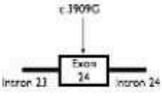
1.4.2. Insertion de la mutation

L'insertion de la mutation se fait lors d'une PCR de 20 cycles, le mélange réactionnel contient les produits fournis par le Kit *GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen). Le mélange est composé de 5µL du tampon High Fidelity 10X, 0,3mM de dNTP, 1µM de MgSO4, 0,3µM de chaque amorce (**Tableau 3**), 2-5µL ADN méthylé (12,5-31,25ng), 0,2-0,5µL *Platinum® Taq High Fidelity* (5U/µL) et de l'eau distillée autoclavée qsp 50µL.

1.4.3. Dégradation des plasmides parentaux

La dégradation des plasmides parentaux méthylés se fait par l'enzyme *DpnI* 20U/µL (BioLabs). La digestion enzymatique est réalisée par l'ajout au mélange réactionnel de 0.25µL de l'enzyme *DpnI* et incubation à 37°C pendant 1h.

**Tableau 3 :** Les amorces utilisées pour la réalisation et la vérification de la mutagenèse dirigée effectuée sur des plasmides pTBNDel contenant les inserts 1, 3 et 5 de la figure 16.

Mutagenèse Dirigée sur des inserts introduits dans le plasmide pTBNDel			
Mutations et allèles complexes	Création des mutations sur l'insert déjà introduit dans le plasmide pTBNDel	Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée de l'insert présent dans le plasmide pTBNDel	Amorces utilisées pour la vérification de la réalisation de la mutagenèse dirigée
TG(11)T(7); c.1392T (TG(11)T(7); muté)		<b>Sens sur exon et intron 10 de CFTR</b> 5'GATCCACTGGAGCAGGCAA[T]T AGTTCCTTTTGT3'	Sens sur intron F1 du plasmide pTBNDel 5'ACTTCAGATATTATGTCTAGG3'
TG(11)T(5); c.1392T (TG(11)T(5); muté)		<b>Reverse sur exon 10 de CFTR</b> 5'TTGCCCTGCTCCAGTGGATCCA CAACCGCC3'	Reverse sur intron F2 du plasmide pTBNDel
c.3909G (muté)		<b>Sens sur exon 24 de CFTR</b> 5'TCTGGAACATTAGAAAAAGTT GGATCCCT 3'	5' CCCCATGTGAGATATCTAG 3'

### 1.5. Manipulation de l'ARN

La manipulation des ARN totaux extraits par la méthode d'extraction préalablement décrite doit être directement suivie par la préparation des ADNc. La préparation des ADNc doit être réalisée le plus tôt possible pour éviter la dégradation des ARN totaux par les ARNases. Les ADNc obtenus représentent les séquences complémentaires de la totalité des ARN produits dans les lignées cellulaires utilisées lors de l'extraction. La région spécifique d'un ARN est amplifiée par RT-PCR en utilisant des amorces adéquates.

#### 1.5.1. Préparation de l'ADN complémentaire (ADNc)

L'obtention des ADNc se base sur l'utilisation amorces hexanucléotidiques qui s'hybrident aléatoirement sur les ARN totaux. Cette synthèse dépend d'une enzyme spécifique : la transcriptase inverse. Cette dernière est produite par le virus de la leucémie murine de Moloney (M\_MLV), elle a une activité transcriptase inverse et aussi une activité polymérase.

Un pré-mélange contenant 5 $\mu$ L de tampon 5X, 2,5 $\mu$ L de dithiothréitol (DTT) (Sigma) 100mM, 1 $\mu$ L de dNTP 25mM, 1,5 $\mu$ L d'hexanucléotides 1600ng/ $\mu$ L (BioLabs) et 2 $\mu$ L H<sub>2</sub>O stérile est préparé. 10 $\mu$ L de des ARN totaux sont ajoutés à ce mélange. Le tout est incubé à 65°C dans un bain sec pendant 2min puis refroidi à 0°C pendant 1min. L'augmentation de la température à 65°C empêche la formation des dimères d'ARN ou d'hexanucléotides.

2 $\mu$ L de la transcriptase inverse M\_MLV 200U/ $\mu$ L (Gibco-BRL) et de 1 $\mu$ L de l'inhibiteur de ribonucléase RNAGuard 40U/ $\mu$ L (Pharmacia) sont ajoutés au mélange. Le tout est incubé à 37°C pendant 1h. Durant ce temps, le DTT permet d'assurer l'activité de la RNAGuard en maintenant sa structure. La *RNAGuard* inhibe les RNases et protège donc la dégradation des ARN. Les hexanucléotides s'hybrident de façon aléatoire sur les ARN totaux et servent d'amorces pour la reverse transcriptase, qui permet de synthétiser l'ADNc. Ainsi, une molécule bicaténaire, ayant un brin d'ADNc au brin d'ARN, est obtenue. L'ADNc de la molécule bicaténaire présente au niveau de son extrémité 3' une *Hairpin loop* (ou tige-boucle). Cette extension simple brin induite par la reverse transcriptase sert comme amorce pour cette enzyme, qui par

son activité polymérase produit un ADN complémentaire à l'ADNc. Suite à la dégradation de cette *loop*, un ADN double brin est obtenu. La réaction est arrêtée après 1 heure en mettant le mélange dans l'eau bouillante à 100°C pendant 2min et puis placé dans la glace durant au moins 5min.

### 1.5.2. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR)

La RT-PCR est une PCR classique réalisée sur de l'ADNc qui est une copie obtenue de l'ARN totaux par la réverse transcriptase. Le choix des amorces dépend d'abord de la source des ARN totaux. En effet, si les ARN proviennent des lignées cellulaires transfectées par le plasmide pTBNdel un couple d'amorces 2,3alpha/BRA2rev est utilisé (**Tableau 4**). 2,3alpha s'hybride sur la région d'intersection des exons 2 et 3 de la globine. BRA2rev s'hybride sur l'exon fibronectine. Si les ARN totaux sont extraits des cellules nasales, les amorces choisies dépendent de la région où un épissage alternatif aberrant est suspecté. Dans ces travaux, l'épissage alternatif de l'exon 10 a été étudié. De ce fait, des amorces de l'exon 9 et 11 ont été utilisées (**Tableau 4**).

**Tableau 4** : Les amorces utilisées pour l'obtention de l'ADNc à partir des extraits d'ARN totaux.

	Hybridation des amorces sur	Amorces
Amorces utilisées pour l'obtention de l'ADNc à partir des extrait d'ARN totaux de culture cellulaires transfectées par le plasmide pTBNdel	<b>Sens:</b> G3 du plasmide pTBNdel (2, 3 alpha)	5'CAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTGC3'
	<b>Reverse:</b> F2 du plasmide pTBNdel (BRA2rev)	5' AGGGTCACCAGGAAGTTGGTTAAATCA 3'
Amorces utilisées pour l'obtention de l'ADNc à partir des extrait d'ARN totaux de cellules épithéliales pour l'étude de l'épissage de l'exon 10	<b>Sens:</b> Exon 9	5'GATGACGCTTCTGTATCTATAT3'
	<b>Reverse:</b> Exon 11	5'CTAATGGTGATGACAGCCTC3'

## 2. TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE

### 2.1. Type, maintien et conservation du matériel biologique

#### 2.1.1. Type de bactéries utilisées

DH5alpha est une souche d'*Escherichia Coli* largement utilisée dans les techniques de clonage. Sa culture aisée, avec une division cellulaire toutes les 20min à 37°C dans les conditions optimales, favorise son utilisation.

#### 2.1.2. Culture bactérienne

Les DH5alpha sont cultivées dans le milieu LB (Luria Bertani). Ce milieu de culture contient 10g Bacto-tryptone (Fluka), 5g Extrait de levure (Sigma), 10g NaCl, 400µL NaOH 10N mélangé dans un litre d'eau. Il peut être utilisé comme un milieu liquide ou solide. Pour la préparation du milieu solide, l'ajout de 15g d'agar (Merck) par litre est nécessaire. Le mélange est autoclavé pendant 20min à 120°C et 1 bar. L'ajout d'ampicilline (50µg/mL) permet la sélection des clones. En fonction de la quantité nécessaire de plasmides et en conséquence la technique d'extraction, différents volumes de milieu liquide sont utilisés. Pour une miniextraction, les bactéries sont cultivées dans 3mL de LB dans des tubes à clapet de 15ml. Pour une mégaextraction, le volume peut atteindre les 2L, répartis dans plusieurs erlens de 500ml. Les bactéries sont incubées à 37°C pendant une nuit sous agitation. Pour les cultures dans les erlens de 500ml, les bactéries sont d'abord cultivées dans des tubes à clapet pendant une première nuit. Puis 1mL de la pré-culture est transvasé dans chaque erlen et cultivé pendant une deuxième nuit.

#### 2.1.3. Stockage des bactéries

Avant d'extraire les plasmides, une partie des bactéries cultivées est stockée. En effet, 0,5mL de bactéries transformées est prélevé de la culture bactérienne auquel 300µL de glycérol 50% sont ajoutés. L'ensemble est stocké à -20°C ou à -80°C.

## 2.2. Transformation des bactéries

### 2.2.1. Préparation des cellules compétentes

Des DH5alpha sont rendues compétentes pour permettre l'introduction du plasmide dans l'étape suivante. Pour rendre les cellules compétentes, 500µL d'une culture de DH5alpha sont incubées pendant 2heures à 37°C. L'absorbance de la culture bactérienne est mesurée à 600nm. Une valeur d'absorption comprise entre 0,3 et 0,6 indique une concentration bactérienne adéquate. Cette culture est centrifugée 10min à 3000g et à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par 12,5mL de Trishydroxyméthylaminométhane (Tris) et du CaCl<sub>2</sub> (50mM filtrée à 0.22µ), puis incubé à 4°C durant 40min à 3heures. Pendant cette période d'incubation, les cellules deviennent compétentes. En effet, le Tris CaCl<sub>2</sub> agit sur la paroi bactérienne en formant des pores pour l'introduction du plasmide. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 2000g pendant 10min à 4°C. Le culot cellulaire est repris par 2,5mL de Tris CaCl<sub>2</sub> et les cellules sont conservées à 4°C pendant 24h maximum ou utilisées directement pour effectuer la transformation.

### 2.2.2. Technique de la transformation bactérienne

Le plasmide d'intérêt est ajouté à 100-150µL de cellules compétentes puis incubé durant 20 à 45min dans la glace. Le choc thermique est réalisé en plaçant le mélange à 42°C durant 2min puis remis aussitôt dans la glace pendant 2min au moins. Ce choc thermique permet la transformation des cellules. Ensuite du milieu LB est ajouté (volume final de 1 mL) suivie d'une incubation d'une heure à 37°C sous agitation, cela permet la régénération des membranes fragilisées par le Tris CaCl<sub>2</sub>. Une centrifugation courte dans le but d'obtenir un culot cellulaire est réalisée puis une partie du surnageant est éliminée. Le reste est resuspendu afin d'être étalé sur boîte de culture (LB+Amp) et incubé toute la nuit à 37°C. Après croissance, quelques clones sélectionnés aléatoirement sont mis en culture dans du milieu LB additionné d'antibiotique et incubé une nuit à 37°C.

### 3. TECHNIQUES DE CULTURE CELLULAIRE

La culture cellulaire est largement utilisée dans ces travaux pour l'expression des plasmides dans des cellules eucaryotes. Trois lignées cellulaires humaines sont maintenues, les cellules HeLa, HEK293 et HT29. Pour l'étude de l'effet des mutations sur la protéine CFTR, une seule lignée (HeLa ou HEK293) est transfectée par le plasmide pTCF alors que pour l'évaluation de l'effet d'une mutation sur l'épissage, les trois lignées sont transfectées par le plasmide pTB.

#### 3.1. Types de lignées cellulaires

Les cellules HeLa : Elles proviennent des prélèvements de métastases effectuées sur une patiente atteinte d'un cancer du col de l'utérus, Henrietta Lacks. Les cellules forment la première lignée cellulaire immortelle d'origine humaine et sont largement utilisées en biologies cellulaire et médicale.

Les cellules HEK293 : Les cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) sont dérivées d'une lignée cellulaire adhérente. Les cellules HEK293 ont été obtenues à partir d'une culture de cellules embryonnaires rénales modifiées avec de l'ADN de l'adénovirus.

Les cellules HT29 : Elles proviennent des adénocarcinomes du colon d'une femme caucasienne.

#### 3.2. Congélation des lignées cellulaires

Après lavage au PBS, les cellules sont décrochées par la trypsine à 0,05%. La suspension cellulaire est centrifugée 2min à 2000g à température ambiante. Le milieu est aspiré et le culot cellulaire est resuspendu dans un milieu de congélation composé de 10% de DMSO, 20% de SVF, et 70% de milieu DMEM. Les cellules sont par la suite placées pendant minimum 2h à -20°C, puis à -80°C pendant au moins 1 jour avant d'être finalement stockées dans de l'azote liquide (-180°C).

### 3.3. Décongélation des lignées cellulaires

Les cellules sont congelées dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma), pour son effet cryo-protecteur et sont conservées dans une cuve d'azote liquide. Le DMSO est toxique pour les cellules eucaryotes à 15°C, donc il est nécessaire que la décongélation soit effectuée avec rapidité. 10mL de milieu est ajouté sur les cellules encore sous forme de glaçons. Elles sont ensuite centrifugées pendant 5min à 350g. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par 10 mL de milieu de culture supplémenté. La suspension cellulaire peut être mise en culture.

### 3.4. Entretien des lignées cellulaires

Après la décongélation d'une lignée cellulaire, les cellules sont cultivées dans leurs milieux de cultures respectifs. Le milieu de culture est le *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco) complété en sérum de veau foetal (SVF, 10%) (Eurobio) et Antibiotiques (Pénicilline 100 U/mL, Streptomycine 0,1mg/mL). Le DMEM contient des vitamines, des minéraux, des acides aminés indispensables, un dipeptide, la L-Alanyl-L-Glutamine qui est la forme stabilisée de la L-Glutamine. Contrairement à la L-Glutamine, le dipeptide ne se dégrade pas en milieu aqueux. Pour la culture des cellules HeLa, le milieu contient aussi du pyruvate alors qu'avec les HEK293 et les HT29, le milieu en est dépourvu. Les boîtes de cultures cellulaires sont incubées à 37°C en atmosphère de 95% d'humidité et de 5% de CO<sub>2</sub>.

Les cellules en culture sont suivies régulièrement au microscope inversé pour estimer leur confluence. De plus, à l'œil nu, le milieu de culture, de couleur rouge, vire au jaune grâce au rouge de phénol, un indicateur coloré suite à l'acidification du milieu. Ainsi, le milieu de culture doit être changé pour le renouvellement des nutriments.

Les cellules, en confluence totale, arrêtent leur multiplication à cause de l'inhibition de contact. Pour cela, une partie des cellules doit être transféré<sup>2</sup> dans une nouvelle boîte de culture. A partir d'une culture cellulaire confluyente, une « trypsination » pour décoller les cellules est effectuée. Une fois le décollement complet, du milieu est ajouté pour arrêter l'action de la trypsine. Les cellules sont transvasées dans un tube de 15ml, puis centrifugées. Le milieu est aspiré et le culot est resuspendu

en ajoutant du milieu de culture. Un volume de la suspension cellulaire est transféré dans une nouvelle boîte de culture et du milieu est ajouté.

### 3.5. Transfection des lignées cellulaires

Avant la transfection par le plasmide d'intérêt, les cellules sont cultivées dans des supports en fonction de la manipulation (**Tableau 5**). Le comptage des cellules est réalisé à l'aide d'un hématimètre.

**Tableau 5 :** Les supports utilisés en fonction des techniques et le nombre des cellules à confluence dans chaque support.

Etudes	Techniques	Types de supports	Surfaces par puits en mm <sup>2</sup>	Nombres de cellules à confluence (Cas des cellules HeLa)
Epissage	Extraction d'ARN	Boîtes de 6 puits	1000	1,2X10 <sup>6</sup>
Localisation Protéique	Microscopie Confocale	Boîte de 6 puits (contenant des lamelles stériles)	1000	1,2X10 <sup>6</sup>
Maturation Protéique	Western Blot	Boîte de Petri de 150mm	17 671	20X10 <sup>6</sup>
Fonctionnalité	Mesure d'efflux d'iode	Boîte de 24 puits	200	0,05X10 <sup>6</sup>

Les cellules sont cultivées dans le support adéquat et la transfection est réalisée lorsque les cellules sont à 80% de confluence. L'introduction du plasmide dans les cellules se fait par l'intermédiaire de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). La Lipofectamine est un agent transfectant puissant composé de phospholipides formant des liposomes pouvant contenir le plasmide d'intérêt. Pour cela, dans un premier tube, la Lipofectamine est diluée avec de l'Opti-Mem (Gibco). L'ADN plasmidique est aussi dilué avec de l'Opti-Mem dans un second tube. Après 5min, les deux tubes sont rassemblés afin de former le complexe Lipofectamine-Plasmide. Après 20min, le complexe est ajouté sur les cellules. Les cellules sont incubées à 37°C pour 24, 48 et 72h. Les quantités d'ADN, de Lipofectamine et d'Opti-Mem varient en fonction du support utilisé (**Tableau 6**).

**Tableau 6 :** Les volumes de milieu et de lipofectamine et la quantité d'ADN nécessaires pour la transfection en fonction du support

Supports	Volume final/Puits	Préparation de l'ADN		Préparation du milieu	
		Volume de l'ADN plasmidique/Puits	Volume de d'opti-Mem/Puits	Volume de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen)/Puits	Volume de l'opti-Mem/Puits
Boite 24 puits	500µL	0,8µg	50µL	2µL	50µL
Boite 6 puits	2mL	4µg	250µL	10µL	250µL
Boite de Pétri 10cm	15mL	24µg	1,5ml	60µL	1,5ml

## 4. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

### 4.1. Détermination de la localisation protéique par microscopie confocale

Le marquage immunologique est utilisé pour visualiser la localisation cellulaire de la protéine CFTR par microscopie confocale. L'immunomarquage est effectué sur des cellules immobilisées après 24, 72 ou 48h de transfection par le plasmide pTCF. En effet, comme ce plasmide produit la protéine CFTR non couplée à la GFP, un marquage immunologique anti-CFTR s'impose. L'observation des cellules au microscope confocal permet de déterminer l'effet d'une mutation portée par le plasmide sur la localisation de CFTR. Une mutation qui induit un défaut de maturation empêche l'arrivée de la protéine au niveau de la membrane, ainsi un marquage péri-nucléaire est observé.

#### 4.1.1. Fixation et perméabilisation des cellules

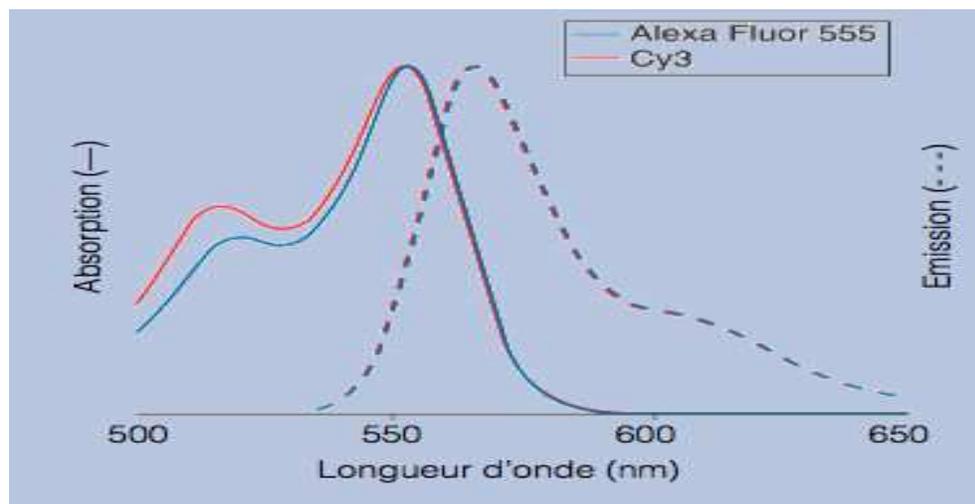
Les lamelles de verres stériles présentes dans les boîtes de 6 puits où les cellules ont été transfectées sont rincées 3 fois avec 2mL de PBS 1X par lamelle pendant 3min. Les cellules sont immobilisées et leurs structures biologiques sont fixées par l'ajout de 1mL par lamelle de paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) (Sigma) pendant 10min à température ambiante. La solution de PFA 4% est préparée en mélangeant 4g de PFA avec 100mL de PBS 1X suivi d'un ajustement au pH 7. Après 3 lavages au PBS 1X, les cellules sont perméabilisées suite à leur incubation durant 10min à température ambiante avec 1mL par lamelle de Triton X-100 0,2% (Sigma). Le Triton étant un détergent, il induit la perforation des cellules facilitant l'entrée des anticorps durant les étapes suivantes.

#### 4.1.2. Incubation avec les anticorps

Après 3 lavages au PBS 1X, les sites sont saturés pendant 1h avec 1mL de *Bovine Serum Albumin* (BSA) 3% dans du PBS. La saturation empêche la fixation non-spécifique des anticorps. Après 3 autres lavages, les lamelles sont incubées avec l'anticorps primaire *Monoclonal Anti-Human CFTR C-terminus* MAB25031 (R&D Systems) (1/400 dans 1X PBS) pendant 1h à 4°C. Après 3 lavages, les cellules sont incubées dans le noir pendant 40min avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) (1/800 dans 1X PBS). L'anticorps primaire reconnaît spécifiquement la protéine CFTR par son fragment Fab et son fragment Fc est reconnu par l'anticorps secondaire. Ce dernier, possède sur son fragment Fc un fluorochrome. Après 3 derniers lavages, les lamelles sont enlevées délicatement des puits et sont montées sur des lames de verre en ajoutant quelques gouttes de Mowiol (Sigma).

#### 4.1.3. Observation par microscopie confocale

L'observation des cellules transfectées et marquées se fait par le microscope confocal Olympus FV100 (Olympus) avec l'aide technique du Dr. Anne Cantreau (plateforme ImageUP de Poitiers). Il est équipé de plusieurs lasers. Le laser Argon (457nm, 488nm, 515nm) est utilisé pour la visualisation de la GFP et le laser vert HeNe (543nm) pour la visualisation de CFTR par l'intermédiaire du fluorochrome de l'anticorps secondaire. En effet, le spectre d'absorption d'Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) correspond au laser d'excitation HeNe du microscope (**Figure 18**).



**Figure18** : Spectre d'absorption (Ligne rouge continue) et d'émission (Ligne rouge pointillée) de l'anticorps AlexaFluor555.

## 4.2. Détermination de la maturation protéique par western blotting

Les techniques de biochimie sont utilisées pour l'évaluation de l'effet d'une mutation sur la maturation de la protéine CFTR. La technique de western blotting permet de séparer la forme mature 170KDa (bande C) de la protéine CFTR de sa forme non-mature 140KDa (bande B). Les mutations induisant un défaut de maturation une moindre expression de la bande C par rapport à la bande B. L'effet d'une mutation est toujours comparé avec ceux de la protéine WT et de la protéine p.Phe508del. Cette dernière ne présente pas de bande C. Les protéines CFTR étudiées par western blotting sont extraites des cellules transfectées par le plasmide pTCF. Les protéines totales sont dosées, séparées sur gel et révélées par immunomarquage.

### 4.2.1. Extraction des protéines

Les protéines sont extraites des cellules transfectées grâce au tampon de lyse. 100 à 400µL du tampon de lyse sont ajoutés par boîte de Pétri après 3 rinçages au PBS 1X. Le tampon est composé de Tris-HCl (pH 7,5) 50mM, EDTA 1mM, NaCl 100mM, Triton X-100 0,5% et le cocktail d'antiprotéases (Roche). Les cellules sont récupérées par grattage dans un tube. Le tout est incubé pendant 30min dans la glace puis centrifugé à 4°C pendant 1min à 16500g. Le surnageant contenant les protéines est récupéré et dosé.

### 4.2.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué par la méthode de l'acide bicinchonidique (BCA) (Sigma). Le réactif BCA est un mélange d'un volume de solution B (CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O 4%) et de 50 volumes de solution A (sel disodique d'acide bicinchoninique 1%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (1H<sub>2</sub>O) 2%, tartrate disodique 0,16%, NaOH 0,4%, NaHCO<sub>3</sub> 0,95% pH 11,25). 1 et 5µL de lysat sont prélevés et placés dans deux tubes, chaque tube est par la suite complété avec de l'eau (qsp 100µL), auxquels est ajouté 1mL de réactif. Les tubes sont incubés pendant 30min à 37°C avant d'effectuer la mesure de l'absorbance à 562nm. Une droite étalon est établie par dosage spectrophotométrique à 562nm de plusieurs solutions de *Bovine Serum Albumin* (BSA) de concentrations connues. Cette droite permet de déterminer la concentration du lysat protéique.

### 4.2.3. Dénaturation des protéines

La dénaturation des protéines est obtenue en ajoutant à un volume du lysat protéique un volume équivalent de réactif Laemmli 2X (Sigma). Ce mélange est incubé 30min à 37°C. Le réactif de Laemmli est composé de dodécylsulfate de sodium (SDS), de  $\beta$  mercaptoéthanol et du bleu de Bromophénol. Le  $\beta$  mercaptoéthanol est capable de rompre les ponts disulfures qui maintiennent la structure tertiaire des protéines. Le SDS est un détergeant ionique qui se lie aux peptides. Cela confère à la protéine une charge globale négative qui est proportionnelle à sa masse. Cette nouvelle charge négative est significativement plus grande que la charge initiale de la protéine. La répulsion électrostatique empêche son repliement et facilite sa migration dans un courant électrique. Le bleu de Bromophénol permet la visualisation du lysat lors de son dépôt dans le gel.

### 4.2.4. Western Blotting

#### 4.2.4.1. Préparation des gels d'acrylamide SDS-Page

Le gel est composé de deux gels de concentrations différentes. Le premier est un gel de « concentration » et le second est un gel de « séparation » de 3% et de 5% d'acrylamide respectivement. Le gel de « séparation » est préparé et coulé en premier et ce n'est qu'après sa polymérisation que le gel de « concentration » est coulé. Le gel de concentration permet de concentrer les bandes de protéines avant leur passage dans le gel de séparation. Cela a pour effet de donner lors de la révélation des bandes non diffuses. La polymérisation des gels se fait entre deux plaques, une plaque de verre et une plaque d'alumine, placées dans un moule. Un peigne est introduit dans le gel de concentration avant sa polymérisation pour la formation des puits. Les gels sont composés de Bis-Acrylamide 40% (Euromedex), de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (Temed) (Sigma), d'APS 10%, d'eau et de tampon selon les concentrations indiquées dans le **tableau 7**. Le Bis-Acrylamide est capable de former des polymères d'acrylamide formant les pores du gel de migration. L'augmentation de la quantité d'acrylamide permet la formation des pores de plus en plus étroits. Le Temed et l'APS provoquent la polymérisation de l'acrylamide.

**Tableau 7** : Composition des gels de séparation et de concentration

Composant	Gel de separation	Gel de concentration
Eau (mL)	2,5	1,25
Bis-Acrylamide 40% (mL)	0,5	0,15
Tampon de séparation 4X (mL)	1	-
Tampon de concentration 4X (mL)	-	0,5
Temed (µL)	4	2
APS 10% (µL)	40	20

#### 4.2.4.2. Dépôt et migration des protéines

Une fois les gels polymérisés, les échantillons de protéines sont déposés dans les puits. 50µg de protéines sont nécessaires par dépôt pour une détection, un excès peut aussi provoquer le colmatage au niveau des pores du gel. Un marqueur de taille coloré (*Protein Marker, Precision Plus Protein Standards, Kaléidoscope, Bio-Rad*) est déposé dans un ou plusieurs puits.

La migration est effectuée dans une cuve où le gel est placé dans une solution de SDS 1X. La cuve permet le passage d'un courant électrique. Le courant est de 300V et 15mA et permet la migration des protéines se fait de la cathode à l'anode selon leurs tailles.

#### 4.2.4.3. Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose

Suite à la migration, les protéines sont transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose. Le transfert est réalisé par l'utilisation du système iBlot (Invitrogen). Le système propose un transfert efficace et rapide 4 à 7min à 20V. Un Sandwich est placé dans la machine iBlot et comme indiqué dans la figure 19 il est composé de bas en haut de :



#### 4.2.4.4. Blocage et marquage immunologique

La membrane est incubée dans une solution de BSA 5% dans du TBST (*Tris-Buffered Saline* et 0.05% Tween 20). Après 2h d'incubation, la membrane est lavée trois fois. Chaque lavage est de 5min avec 10mL de TBST.

Le premier anticorps anti-CFTR (clone M3A7; Millipore), dilué au 1/2000 dans du TBST, est ajouté sur la membrane. Cet anticorps monoclonal reconnaît un epitope de 10 acides aminés de CFTR en C-ter (1370-1380). L'anticorps primaire Na/K ATPase (Clone 464.6 ; Millipore) dilué au 1/1000 dans TBST, est utilisé comme contrôle positif. Après une nuit d'incubation, trois nouveaux lavages sont effectués. La membrane est par la suite incubée avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) dilué au 1/100 dans du TBST pendant 6h. Cet anticorps reconnaît les deux anticorps primaires. Après l'incubation, trois derniers lavages sont réalisés et la membrane est alors prête pour la révélation.

#### 4.2.4.5. Révélation

La révélation se fait à l'aide du scanner Typhoon (GE Healthcare). Un laser d'excitation de 532nm est utilisé. Le laser choisi émet à une des longueurs d'onde pouvant provoquer l'excitation de l'Alexa Fluor® 555. Normalement, l'anticorps a le maximum d'excitation à 550nm, mais une telle longueur d'onde n'est pas présente dans les lasers du Typhoon. Un filtre passe-bande à 580nm (580 BP 30) filtre le spectre d'émission de l'anticorps secondaire. Ce filtre correspond à la longueur d'onde maximale d'émission de l'anticorps (**Figure 18**).

## 5. TECHNIQUES DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

Les expériences concernant la fonctionnalité des protéines CFTR WT et mutées sont réalisées par le Dr. Caroline Norez (laboratoire de Signalisation et Transports Ioniques Membranaires). La mesure de l'activité est effectuée, sur des cellules transfectées, avec le robot, *MultiPROBE® Ilex robotic liquid handling system* (Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France). Ces expériences reposent sur le principe des efflux d'iodure radioactif comme marqueur de l'activité des canaux chlorures.

Des cellules HeLa sont transfectées, en suivant le protocole de transfection, dans des boîtes de 24 puits. Pour des mesures précises, au moins 8 puits doivent être transfectés par le même plasmide. Ainsi, dans chaque boîte les deux premières colonnes de puits sont transfectées par le pTCF WT (contrôle positif), les deux suivantes par le pTCF c.1521\_1523delCTT (contrôle négatif) et les deux derniers par le pTCF contenant la mutation en question. Deux boîtes contenant les mêmes mutations sont préparées à chaque fois, la première pour la mesure de l'activité dans les conditions normales et la deuxième pour effectuer des mesures d'efflux suite à l'ajout d'un correcteur (VX-809, Vertex pharmaceuticals). L'étude de chaque mutation (p.Lys464Asn, p.Asn1303Lys et p.Val322Ala) est répétée en effectuant trois transfections indépendantes.

Après 48h de transfection, les cellules sont lavées avec 10ml de solution d'efflux (CaCl<sub>2</sub> 2mM, NaCl 135mM, KCl 5,36mM, MgCl<sub>2</sub> 0,8mM, Glucose 5,5mM et HEPES 10mM). Une solution de charge (composée d'une solution d'efflux et 1μCi/ml de Na<sup>125</sup>I) est ajoutée sur les cellules pendant 30min à 1h à 37°C. Suite à cette incubation, les cellules sont rapidement lavées par la solution d'efflux.

Pendant 10 min, un prélèvement de la solution d'efflux restante est effectué chaque minute. Les prélèvements sont placés dans des tubes à hémolyse (10 prélèvements par puits). Ces prélèvements permettent de suivre l'efflux d'iodure des cellules vers le milieu extracellulaire à travers le canal chlorure. Les cellules sont ensuite solubilisées avec 500μL de SDS 0,1% et NaOH 0,1M, sous agitation ménagée pendant 45min. Cela a pour effet de récupérer l'iodure résiduel contenu dans les cellules.

La radioactivité est mesurée, en cpm (Coups Par Minute), pour chaque prélèvement et pour la fraction solubilisée à l'aide d'un compteur gamma *Packard Cobra<sup>TM</sup>II gamma counter* (Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France). Le test de Student est ensuite utilisé afin de déterminer si les différences observées entre CFTR WT et mutées sont significatives ou non.

## 6. ETUDES *IN SILICO*

### 6.1. Programme informatique pour déterminer les effets des mutations sur l'épissage

Le site informatique *Human Splicing Finder* (HSF) (Desmet *et al.*, 2009 ;2012), version 2.4.1 disponible en ligne (<http://www.umd.be/HSF/>) depuis Octobre 2010, aide à prédire les effets des mutations introniques et exoniques sur l'épissage. Ce programme se base sur diverses algorithmes notamment celui dérivé de l'*Universal Mutation Database* (UMD) (Beroud *et al.*, 2000 ; 2005 ; Cartegni *et al.*, 2003 ; Fairbrother *et al.*, 2004). HSF utilise tous les gènes et les transcrits issus de l'épissage alternatif obtenus de l'*Ensembl human genome database* (Flicek *et al.*, 2008).

HSF présente une interface simple où l'utilisateur peut choisir dans une liste déroulante le type de l'analyse voulue. Dans nos travaux, *Analyse mutations* a été le type d'analyse utilisée.

Les résultats sont obtenus sous forme de plusieurs tableaux intitulés *Potential splice sites*, *Potential Branch Points*, *Enhancer motifs*, *Silencer motifs*, *Other splicing motifs*. Au cours de nos travaux, le premier tableau indique le pourcentage de variation entre les valeurs consensus données pour la séquence normale et la séquence mutée. De plus, d'autres informations essentielles sont présentes : 1) La disparition du site donneur ou accepteur (*Site Broken*) est indiquée pour un pourcentage négatif de variation entre les valeurs consensus 2) La création d'un nouveau site donneur ou accepteur *New Splice Site* est indiquée pour un pourcentage supérieur à 100% de variation entre les valeurs consensus 3) Un code couleur varie pour chaque quartile de pourcentage (**Figure 20**).



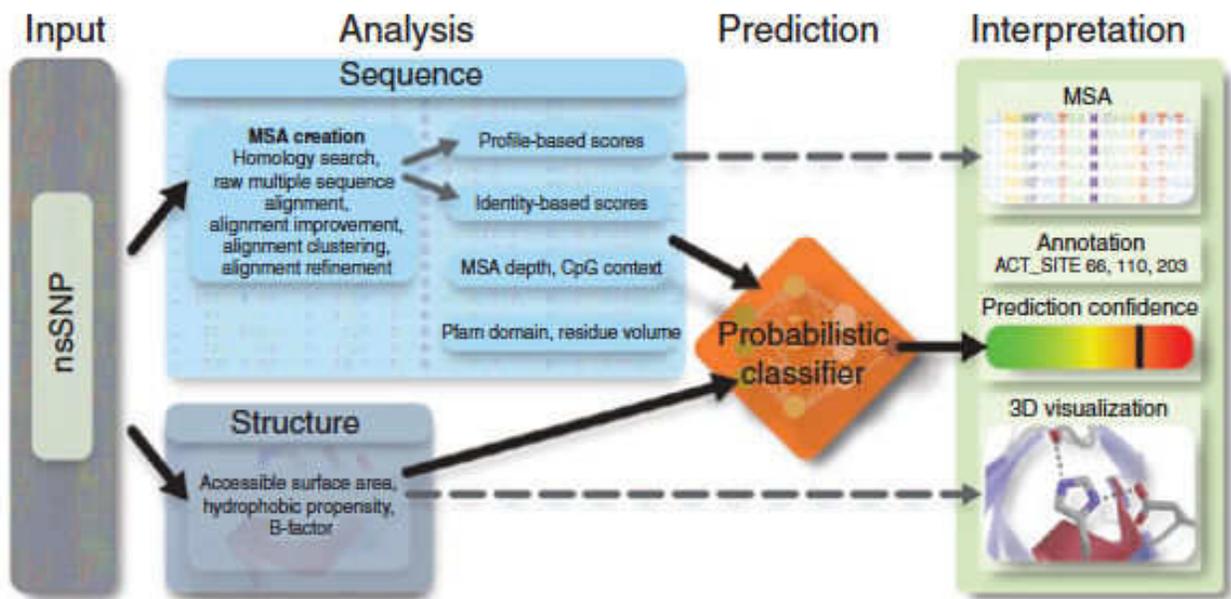
**Figure 20** : Code couleur du site indiquant l'effet potentiel d'une mutation en fonction du pourcentage de variation entre la séquence normale et la séquence mutée

## 6.2. Programme pour estimer la gravité d'une substitution d'un acide aminé dans CFTR

Le programme informatique PolyPhen-2, version 2.2.2. disponible en ligne (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), aide à prédire l'effet d'une mutation faux sens. Le programme utilise 8 bases de données de séquences protéiques et 3 bases de données de structure de la protéine. Des algorithmes spécifiques comparent les données des séquences WT et mutée et permettent ainsi de donner une interprétation (**Figure 21**).

L'interface du programme propose à l'utilisateur de mettre le nom de la protéine (exemple : CFTR) ou sa séquence FASTA, d'indiquer la position de l'acide aminé en question (exemple : 1303 pour la mutation p.Asn1303Lys) et de préciser l'acide aminé WT et celui qui le substitue.

Parmi les interprétations suggérées par le programme PolyPhen-2, figure une échelle qui prédit l'effet sévère de la substitution en lui attribuant un score qui varie de 0 à 1. Un score nul indique que la mutation n'est pas sévère alors que si le score est proche de 1 la possibilité d'un effet sur la protéine est de plus en plus probable.



**Figure 21 : Fonctionnement du programme PolyPhen-2**

(Source : A method and server for predicting damaging missense mutations)

### 6.3. Programme pour déterminer la conservation d'un acide aminé dans une protéine au cours de l'évolution

Le site UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) est utilisé pour déterminer le degré de conservation d'un acide aminé. La recherche d'une protéine dans un moteur de recherche donne une liste de protéines orthologues. Pour avoir un alignement de protéines, il suffit de sélectionner les espèces désirées et cliquer sur *Align*.

### 6.4. Programme pour modéliser la structure tridimensionnelle de CFTR

Pour la modélisation des protéines CFTR WT et porteuses des mutations étudiées, plusieurs programmes sont à utiliser consécutivement :

**1) Obtention de la séquence FASTA de la protéine :** pour trouver la séquence FASTA de la protéine il s'agit d'utiliser le moteur de recherche sur le site *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>).

**2) Trouver les *Template de base de la protéine* :** à l'aide de la séquence FASTA il s'agit de trouver le *Template* en utilisant le site de *Swiss-Model* (<http://swissmodel.expasy.org/>). Cette recherche se fait en copiant la séquence FASTA dans *Tools* → *Template Identification*. Le site recherche alors les *Templates* qui ont des séquences similaires à la séquence FASTA donnée. Trois *Templates* ont servi dans ces travaux. Le premier *Template* est nommé 1XMI.1 (*Crystal structure of human p.Phe508Ala NBD1 domain with ATP*) et représente le NBD1 avec la mutation p.Phe508Ala. Le deuxième *Template* est nommé 3GD7.1 (*Crystal structure of human NBD2 complexed with N6-Phenylethyl-ATP (P-ATP)*) et correspond au NBD2 complexé au P-ATP. Le troisième *Template* est nommé 2yl4.1.A (*ATP-binding cassette sub-family b member 10, mitochondrial*), et est utilisé pour la structure similaire de ses domaines transmembranaires par rapport à ceux de la protéine CFTR.

**3) Modéliser la protéine en introduisant la mutation étudiée :** Sur le site de *Swiss-Model* il s'agit de rentrer dans *Modeling* → *My Workspace* et de choisir le mode *Upload Template*. Introduire la séquence FASTA du *Template* utilisé dans *Target Sequence* après avoir substitué l'acide aminé muté. Dans *Add Template File* ajouter le *Template* en question et cliquer sur *Build Model*. Un nouveau modèle est alors créé avec la nouvelle structure de la protéine porteuse de la mutation.

**4) Visualisation tridimensionnelle des modèles WT et muté :** Le *Template* initial et le modèle obtenu peuvent être visualisés séparément ou simultanément sur le programme *Swiss-PdbViewer*. Ce programme offre une panoplie d'outils pour observer et éditer la représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine.

## CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans le contexte où la classification des mutations *CFTR* prend une importance fondamentale, nous avons étudié *in silico* et *in cellulo* les effets de trois mutations c.1392G>T (p.Lys464Asn), c.3909C>G (p.Asn1303Lys), c.965T>C (p.Val322Ala) des exons 10, 24 et 8 respectivement. De plus, différents allèles complexes ont été mis en évidence soulignant l'importance de séquencer l'ensemble du gène.

### 7. ETUDES DE LA MUTATION c.1392G>T ET DE SES ALLELES COMPLEXES

#### 7.1. Contexte des études de la mutation c.1392G>T

La mutation c.1392G>T a été identifiée la première fois chez un patient français au Centre Hospitalier de Toulouse en 2003. Le patient, ayant en trans une délétion, présentait une hypertrypsinogénomie néonatale avec un test de la sueur positif. A l'âge de 6 mois, le patient montre un phénotype sévère avec une infection pulmonaire, une toux chronique et une insuffisance pancréatique.

La mutation c.1392G>T affecte le dernier nucléotide de l'exon 10 composé de 183 nucléotides. L'exon 10 code pour une partie du domaine NBD1. Au niveau de la protéine, la mutation induit une substitution d'une Lysine en une Asparagine en position 464 (p.Lys464Asn). Cette substitution est localisée dans le Walker A du NBD1 (<sup>458</sup>GSTGAGKT<sup>465</sup>) (cf. **Figure 5**).

Après son identification, cette mutation n'a pas été étudiée. Du fait de la substitution du dernier nucléotide de l'exon 10, un impact sur l'épissage alternatif aberrant de cet exon peut être envisagé. Toutefois, comme l'épissage de l'exon 10 est influencé par le site polymorphe TG(m)T(n) de l'intron 9, l'étude *in cellulo* de la mutation a été effectuée en prenant en considération les allèles complexes contenant les différentes variations. Comme les études parentales ont montré la présence d'un

allèle complexe associant la mutation au polymorphisme TG(11)T(5) chez le patient, l'impact de la mutation a été déterminé dans le contexte des polymorphismes TG(11)T(7) et TG(11)T(5). Le polymorphisme TG(11)T(7) est considéré comme WT car c'est l'allèle le plus fréquent. Pour la réalisation de l'étude *in cellulo*, quatre constructions plasmidiques avec le plasmide pTBNdel ont été réalisées : c.[TG(11)T(7); 1392G], c.[TG(11)T(5); 1392G], c.[TG(11)T(7); 1392G>T], c.[TG(11)T(5); 1392G>T]. L'étude de l'effet de l'allèle complexe a été aussi réalisée *in vivo* sur l'ARN des parents.

Comme la mutation affecte un domaine important de la protéine, l'effet de la mutation p.Lys464Asn a été aussi déterminé. En effet, d'autres mutations localisées dans les NBD1 et NBD2 ont été décrites comme des mutations altérant la maturation de CFTR (Gregory *et al.*, 1991). Les études *in cellulo* pour déterminer l'effet de la mutation sur la localisation, la maturation et la fonctionnalité ont été réalisées. De plus, une étude *in vivo* a été aussi effectuée pour déterminer la fonctionnalité du canal en mesurant la différence de potentiel nasal chez le patient (collaboration avec le Pr. Isabelle Sermet-Gaudelus, Inserm U806, Université René Descartes, CRCM, service de Pneumo-Pédiatrie, Hôpital Necker-Enfants malades, Paris).

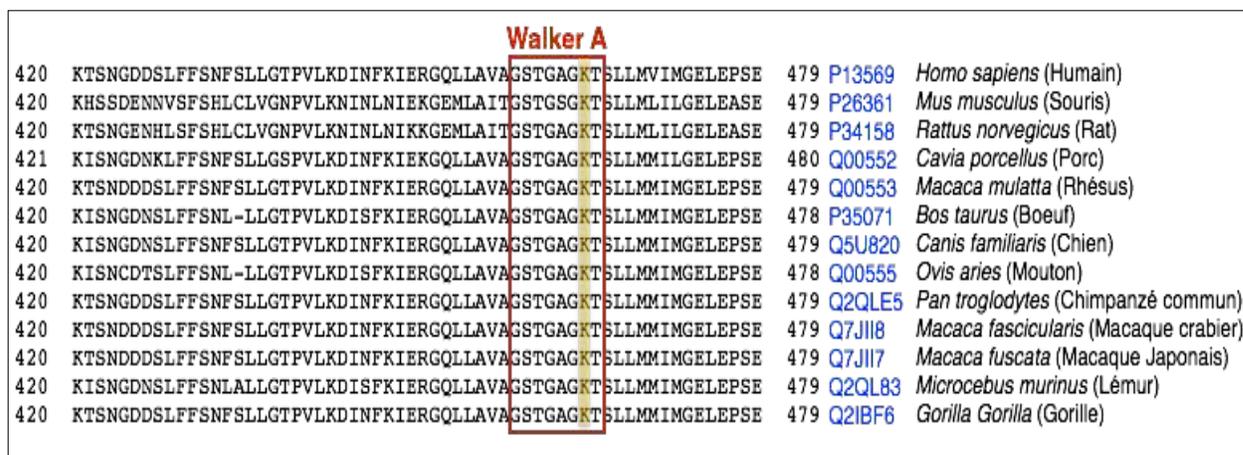
## 7.2. Etude *in silico* de la mutation c.1392G>T

L'impact potentiel de la mutation c.1392G>T est conforté par les résultats obtenus à l'aide du site de HSF qui indique la rupture du site d'épissage (**Tableau 8**). Le tableau montre que le site donneur est altéré induisant l'utilisation d'un site cryptique. La conséquence de cet épissage aberrant est que la taille de l'exon 10 inclus dans l'ARNm est diminuée de 5pb.

**Tableau 8 :** Tableau obtenu par le site HSF pour l'étude de la mutation c.1392G>T. Il indique la rupture du site dans plusieurs situations. Ainsi, il propose une variation de -5pdb si le nouveau site cryptique donneur est utilisé.

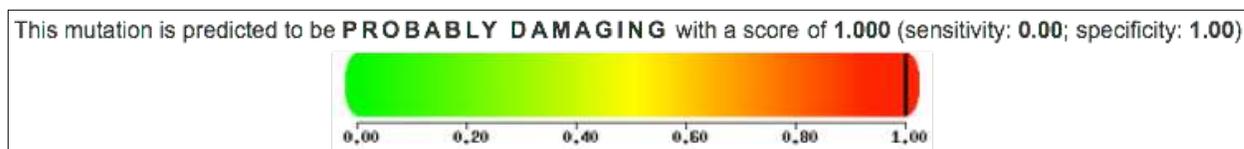
Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
472	c.1381	Acceptor	GGAGCAGGCAAGgt	ggagcaggcaatGT	67.81	38.87	NA	Site broken -42.69
476	c.1385	Acceptor	CAGGCAAGgtagtt	caggcaatgtagTT	66.43	70.06	NA	+5.46
476	c.1385	Donor	CAGGCAAGg	CAGgcaatg	71.23	58.91	-5	Site broken -17.29
481	c.1390	Donor	AAGgtagtt	AATgtagtt	78.39	67.52	0	WT site broken -13.86

Au niveau de la protéine, la Lysine en position 464 est un acide aminé largement conservé au cours de l'évolution (**Figure 22**) ce qui peut indiquer son rôle important dans le domaine Walker A du NBD1.



**Figure 22 :** Alignement de séquences d'une partie de la protéine CFTR de plusieurs espèces montrant la conservation de l'acide aminé Lys464 au cours de l'évolution.

De plus, selon le programme PolyPhen-2, la mutation p.Lys464Asn est *possibly Damaging* avec un score de 1 sur une échelle de 0 à 1 (**Figure 23**).

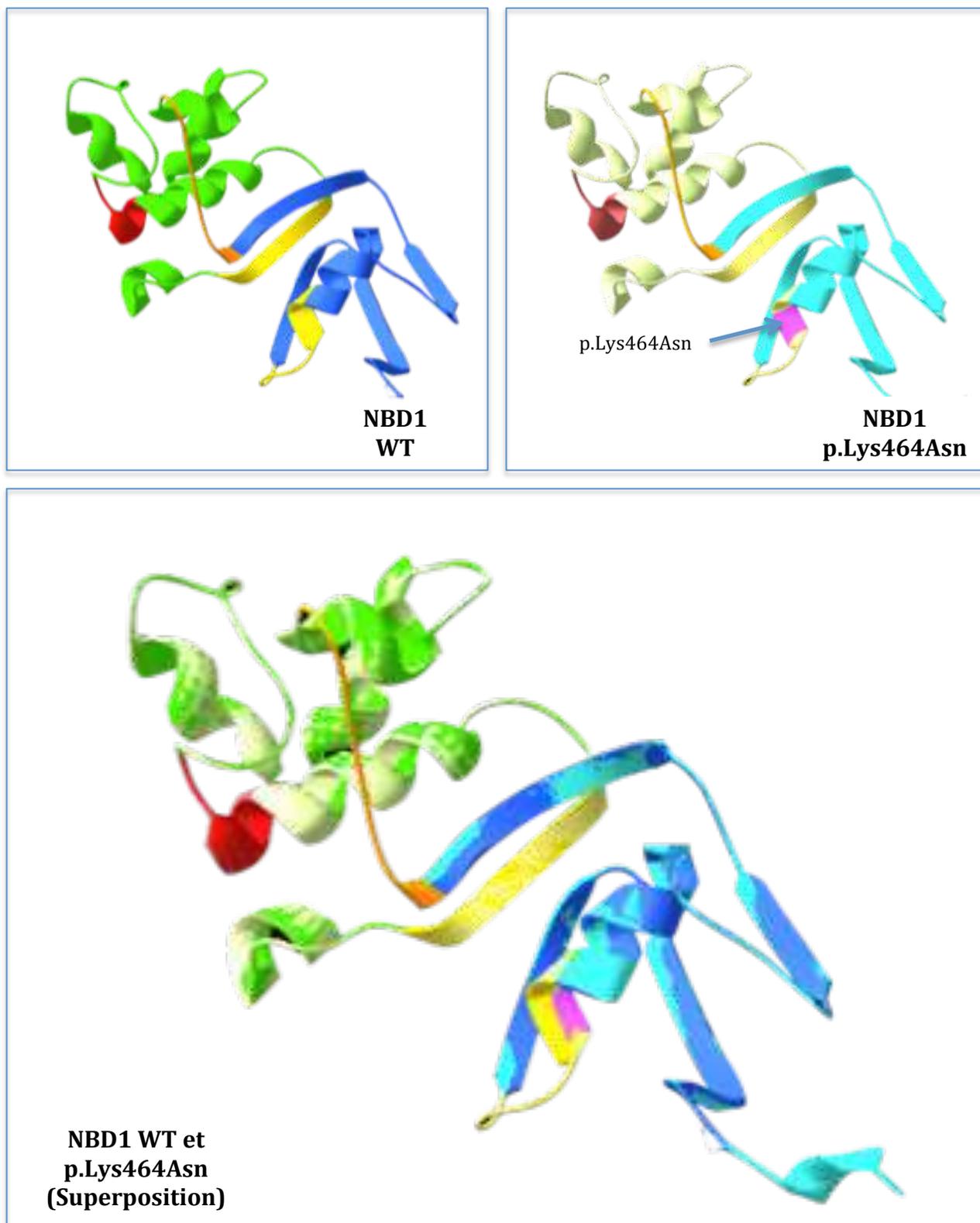


**Figure 23** : Prédiction du programme PolyPhen-2 concernant l'effet sévère de la mutation p.Lys464Asn sur la protéine CFTR.

Le programme informatique *Swiss-Model* ne montre pas de changement de la structure tridimensionnelle de la protéine mutée en utilisant le *Template* 1XMI.1 (**Figure 24**).

### 7.3. Article concernant les études de la mutation c.1392G>T

Cet article (page 81-105) est soumis (Farhat *et al.*, soumis).



**Figure 24 :** Modélisation avec le programme Swiss-Model du du NBD1. La mutation p.Lys464Asn est en Mauve. Le Sous domaine alpha est représenté en vert foncé (WT) claire (muté), le sous domaine bêta est en bleu foncé (WT) claire (muté). Wlaker A et B sont représentés en jaune et le *tail* en rouge. La *Loop Q* est en orange.

Multi-physiopathological consequences of the c.1392G>T CFTR mutation revealed  
by clinical and cellular investigations

Raed Farhat<sup>a</sup>, Ayman El-Seedy<sup>a1</sup>, Kamal El-Moussaoui<sup>a</sup>, Marie-Claude Pasquet<sup>a,b</sup>, Catherine Adolphe<sup>c</sup>, Eric Bieth<sup>d</sup>, Jeanne Languépin<sup>e</sup>, Isabelle Sermet-Gaudelus<sup>f</sup>, Alain Kitzis<sup>a,b</sup> and Véronique Ladevèze<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Génétique Moléculaire de Maladies Rares, Université de Poitiers, Poitiers, France

<sup>b</sup> Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Poitiers, France

<sup>c</sup> Université de Poitiers, Poitiers, France

<sup>d</sup> Service de génétique médicale, Hopital Purpan, Toulouse, France

<sup>e</sup> CHU de Limoges, Limoges, France

<sup>f</sup> Inserm U806, Université René Descartes, CRCM, service de Pneumo-Pédiatrie, Hopital Necker-Enfants malades, Paris, France

<sup>1</sup> Present address: Department of Genetics, University of Alexandria, Alexandria, Egypt

Corresponding and reprint request author: Véronique Ladevèze

Génétique Moléculaire de Maladies Rares

Pôle Biologie Santé

Université de Poitiers, 86000 Poitiers cedex, France

TEL: + (33) 5 49 45 49 77

FAX: + (33) 5 49 45 49 72

E-mail: [veronique.ladeveze@univ-poitiers.fr](mailto:veronique.ladeveze@univ-poitiers.fr)

**ABSTRACT**

**Objectives:** This study performs clinical approach and multiple level cellular analyses to determine the physiopathological consequences of the c.1392G>T (p.Lys464Asn) *CFTR* exon 10 mutation, detected in a CF patient with a deletion in trans. Therefore, mRNA splicing, with different TG(m)T(n) alleles, and protein processing studied were realized.

**Design and Methods:** Minigene experiments and nasal cell mRNA extracts were used to study the impact of c.1392G>T on splicing by *in cellulo* and *in vivo* studies. The processing and localization of p.Lys464Asn protein were evaluated by western blotting analyses and confocal microscopy. Clinical and channel exploration tests were performed on the patient to determine the exact CF phenotype profile and the *CFTR* chloride transport activity.

**Results:** c.1392G>T affects exon 10 splicing by inducing its complete deletion and encoding a frameshift transcript. The polymorphism TG(11)T(5) aggravates the effects of the mutation on aberrant splicing. Analysis of mRNA obtained from parental airway epithelial cells confirmed these *in cellulo* results. At the protein level, p.Lys464Asn, *in cellulo* studies, showed neither matured form nor membrane localisation. The *in vivo* channel tests confirmed the absence of *CFTR* activity.

**Conclusion:** The c.[1210–12T[5];1392G>T] complex allele contributes to the CF phenotype by affecting splicing and inducing a severe misprocessing defect. These results demonstrate that the classical *CFTR* mutations classification is not sufficient: *in vivo* and *in cellulo* studies of a possible complex allele in a patient are required to provide correct *CFTR* mutation's classification, adequate medical counseling and adapted therapeutic strategies.

**Key Words:** *CFTR*, complex alleles, clinical genetics, cystic fibrosis, molecular genetics, splicing, protein processing, genotype-phenotype correlation, genetic counseling

## INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a frequent recessive autosomal genetic disease characterized by wide variability of clinical outcomes with regard to disease severity and rate of progression [1]. A variety of sequence alterations in the *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator* (*CFTR*) gene [2, 3] and a large number of combinations of these alterations can modify the normal *CFTR* biosynthesis. The resulting amount of functional *CFTR* determines the occurrence of a normal phenotype, a *CFTR*-related disorder (*CFTR*-RD) or a CF disease.

Since the initial characterisation of the *CFTR* gene in 1989, more than 1900 mutations have been reported to the Cystic Fibrosis Consortium (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). These mutations can alter *CFTR* function by mechanisms that range from the simple loss of chloride conductance to complete absence of protein synthesis. Understanding how each mutation affects *CFTR* function is crucial in informing the clinical approach and therapeutic strategies. Therefore, mutations are classified into one, or more, of the six established classes, according to their characteristics.

The c.1392G>T mutation (p.Lys464Asn) was first identified in a CF child carrying a frameshift mutation in trans (c.3959delC) and manifesting severe CF clinical symptoms. The c.1392G>T mutation affects the last nucleotide of exon 10 and p.Lys464Asn is included in the Nucleotide Binding Domain 1 (NBD1) of *CFTR*. While exon 10 is present in pseudogenes, c.1392G>T is only present in *CFTR* [4, 5]. Splicing defect and/or protein misprocessing are two mechanisms that can explain the CF phenotype. After exhaustive medical and channel activity investigations conducted on the patient, fundamental studies were performed at the mRNA and protein levels to determine the proper genetic processes engendering this CF phenotype.

However, mutation effects can vary in function of association in cis with other mutations, modifying phenotype severity and thus complicating diagnosis and genetic counselling. For example, a complex allele containing two mild mutations can dramatically alter *CFTR* function [6, 7]. In the studied patient, the sequencing of exon 10 and its flanking regions revealed that the c.1392G>T mutation and the TG(11)T(5) polymorphism are associated in cis. The c.[1210-35TG[m];-12T[n]] polymorphism (or TG(m)T(n)) is at 3'-end of intron 9 and induces variable levels of exon 10 skipping depending on the number of TG and T. Therefore, the impact of the mutation was assessed, alone and in the context of the complex allele, on exon 10 splicing and protein synthesis and function.

Here we show that the severe phenotype of the CF child is due to both Aberrant Splicing (AS), involving the c.1392G>T mutation associated with the TG(11)T(5) polymorphism, and the severe misprocessing of the CFTR protein, due the p.Lys464Asn mutation. Thus, this study proves the importance to have multiple level analyses, when a *CFTR* mutation is classified, and to take into consideration its detected complex allele. This methodology is necessary to provide an individual medical counseling for disease management, prenatal diagnosis or therapeutic strategies.

## MATERIALS AND METHODS

### Case History and Family

A c.1392G>T mutation was identified in a CF patient carrying c.3659delC mutation in trans. The patient, at the intron 9 polymorphic site, was homozygous TG(11) and heterozygous T(5)/T(7). Parental studies revealed that the TG(11)T(5) allele was associated with the c.1392G>T mutation in cis: c.[1210-35TG[11];-12T[5]; 1392G>T] or c.[TG(11)T(5); c.1392G>T]. The patient (French origin) was a newborn child referred for elevated immunoreactive trypsinogen (newborn screening) (Table 1) followed by a positive sweat test (Cl<sup>-</sup> > 100 mEq/L). At the age of 6 months, he exhibited a severe phenotype with pancreatic insufficiency, chronic cough, and bronchial infection (*H. influenzae* and *S. aureus*).

### Bioinformatics analysis

*In silico* analysis was conducted to predict the effect of the c.1392G>T mutation on RNA splicing using the Human Splicing Finder program (<http://www.umd.be/HSF/>). The c.1392+1G>T mutation, affecting the first nucleotide of intron 10, was used as a positive control for this analysis.

### Generation of minigene constructs

The pTBNdeI plasmid (generously provided by F. Pagani) is a vector designed to analyse mutations suspected of being involved in AS in transfected mammalian cells. The genomic DNA region of interest is introduced into the minigene via a unique restriction site (*NdeI*) located in a fibronectin intron. The construction and validation of the hybrid minigene used in this study has been described elsewhere [8]. Briefly, a PCR fragment encompassing exon 10 and its flanking

regions was amplified from human genomic DNA (Figure 1a 1b) of both normal and mutated exon 10 with specific primers (Table 2a). Plasmids were digested with the *NdeI* restriction enzyme and PCR products were inserted into the digested plasmids. Directed mutagenesis using specific primers was performed to obtain the different minigenes (Table 2b). All hybrid minigene constructs were sequenced to verify the correct insertion of wild-type (WT) and mutated DNA fragments (Table 2c). As a control, a hybrid minigene containing the complex allele c.[TG(11)T(7); 1392+1G>T] was constructed.

### Construction of *CFTR*-mutated cDNA

The pTCF plasmid (generously provided by P. Fanen) is a vector designed to produce CFTR and to visualise the transfected cells by the expression of Green Fluorescent Protein (GFP). In this study WT, c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del), and c.1392G>T pTCF plasmids were used. The c.1392G>T plasmid was obtained by directed mutagenesis of the WT using the Gene tailor site-directed mutagenesis kit (Invitrogen) and specific primers (Table 2d). The presence of the desired mutation was verified by sequencing (Table 2e).

### Cell culture and transient transfections

HeLa, HT29, and HEK293 cells were grown in DMEM medium with Glutamax-I (Life Technologies) supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco), 100units/mL penicillin and 100µg/mL of streptomycin in a humidified incubator at 37°C in the presence of 5%CO<sub>2</sub>. Cells were transiently transfected by WT and mutant *CFTR* plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. At least three independent transfections were performed for immunolocalisation, Western blotting (WB), and RNA extraction experiments. All three cell lines were used in the mRNA studies; for immunolocalisation and WB analyses, only HeLa and HEK293 cells, were respectively used.

### Native epithelial cell brushing

Native airway epithelial cells were obtained from the parents by nasal brushing (kit generously given by Dr E. Girodon). Cell samples were conserved in RNeasy® preservation solution (Qiagen, Germany).

### RT-PCR analyses

Total RNA was extracted from cell lysates using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) and dissolved in 30  $\mu$ L of sterile water. cDNA synthesis was carried out at 37°C for 1 h after adjustment of the mixture to contain 5  $\mu$ L of 5X buffer (Gibco-BRL, France; 250mmol/L of Tris-HCl pH 8.3, 375mmol/L of KCl, 15mmol/L of MgCl<sub>2</sub>), 10mmol/L of DTT (Gibco-BRL, France), 1mmol/L of dNTPs (Roche Diagnostics, France), 2.4  $\mu$ g of random hexamer primers, 10  $\mu$ L of RNA, 40U RNAGuard (Amersham Biosciences, Orsay, France), and 400U Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase. The reaction medium was made up to 25  $\mu$ L with sterile water and the reaction was stopped by incubation at 100°C for 2 min. The PCR reaction (25  $\mu$ L) consisted of 5  $\mu$ L of cDNA, 2.5  $\mu$ L of 10X buffer, 2mmol/L of MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ mol/L of each dNTP, 10pM of specific primers for the cDNA (obtained from cultured cells or nasal epithelial cells) (Table 2e and 2f), and 3U Taq polymerase. PCRs were performed using a 9700 GeneAmp Thermo Cycler (Perkin Elmer) with the following cycling conditions: initial denaturation (94°C, 2 min), followed by 30 cycles (94°C, 30 sec; 58°C, 30 sec; 72°C, 30 sec), and a final extension step (72°C, 5 min). Amplification products were analysed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

For cDNA obtained from cultured cells, each fragment was purified from a non-denaturing 10% polyacrylamide gel and sequenced. Fragments were sequenced using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer using the ABI PRISM Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) with specific primers (Table 2e). Direct sequencing of the cDNA obtained from nasal epithelial cells was performed using specific primers (Table 2f).

### **Immunolocalisation and confocal microscopy**

Forty-eight hours after transfection, HeLa cells were washed with 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) and fixed with paraformaldehyde 4% in Tris-Buffered Saline (TBS) for 10 min at 4°C. Cell permeabilisation was obtained by a Triton X-100 (0.1% in PBS) incubation for 10 min at 4°C. Non-specific sites were saturated by incubation (15 min) in Bovine Serum Albumin (BSA) (3% in PBS). Coverslips were incubated with human anti-CFTR MAB25031 (Invitrogen) (1/400 in 1X PBS) for 1 h at 4°C. After washing with 1X PBS, cells were incubated in the dark with the secondary antibody, conjugated to Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) (1/800 in 1X PBS) for 40 min. Cells were washed three times with 1X PBS, and coverslips were mounted with Mowiol (Sigma). Images were obtained using a confocal microscope (Olympus FV100) equipped with a multi-line Argon laser (457nm, 488nm, 515nm; total 30mW) to visualise GFP, and with a HeNe-

Green laser (543nm; total 1.5mW) to visualise CFTR.

### Western Blotting Analysis

Twenty-four hours after transfection, HEK293 cells were harvested and resuspended in lysis solution (50mmol/L Tris-HCl [pH 7.5], 1mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 1% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors (Roche Diagnostics). Cell lysates were clarified by centrifugation at 15,000 *g* for 10 min at 4°C. Proteins were quantified using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent (Sigma). A volume corresponding to 50µg of proteins was mixed with an equal volume of 2X Laemmli sample buffer (Sigma) and incubated for 20 min at 37°C. Proteins were analysed on a 5% SDS-PAGE (BioRad Laboratories Inc.) and transferred onto nitrocellulose membranes using an iBlot system (Invitrogen) (20V, 7 min). Membranes were first incubated with 5% BSA in TBST (TBS; 0.05% Tween 20) for 2 h at 4°C. The membranes were then washed three times for 5 min in TBST, followed by incubation with primary antibody against CFTR (clone M3A7; Chemicon) (1/2000 in 1X PBS) overnight. Membranes were then washed three times with TBST and incubated with secondary antibody conjugated to Alexa Fluor® 555 (1:100 in PBS; Invitrogen) for 6 h. After further washing in TBST, the blots were scanned with a Typhoon imager (GE Healthcare) using an excitation laser (532nm) and a 580nm band-pass filter (580 BP 30).

### Evaluation of CFTR function

The primary outcome measure was CFTR chloride transport as assessed by nasal transepithelial potential difference (Nasal TEPD). Nasal potential difference (NPD) was measured by a single operator according to the protocol established by Alton and collaborators, with minor modifications [9-11].

## RESULTS

### *In silico* comparative analysis of splicing in wild-type and mutated *CFTR*

The effect of the potential splicing mutation (c.1392G>T) was first analysed by bioinformatics splice-site prediction using the “Human Splicing Finder” program (HSFv2.4.1), which recognises (WT) and mutant splice sites. The analysis predicted a cryptic site in this sequence, which could result in a five nucleotides deletion in the exon.

The positive control mutation (c.1392+1G>T) indicated AS resulting in deleterious

changes in comparison to the physiological consensus splice site by production of mRNA molecules with five or one base pair deletions.

### **Implication of mutations in both 5' and 3' regions of *CFTR* exon 10 in AS using *in cellulo* methods**

Following transient transfections of WT and mutant minigenes into HeLa, HT29, and HEK293 cells, mRNA was analysed by RT-PCR and directly sequenced using  $\beta$ -globin-specific primers (Table 2e). Results were identical in the three tested cell lines. A polyacrylamide gel was used for more precise separation of the resulting fragments (Figure 2a). Each fragment was isolated and sequenced with specific primers (Table 2e) to determine the different mRNA products.

Four plasmids were constructed as described in Figure 1. All plasmids were constructed with TG(11) as it is the most frequent allele in the general population and it is the genotype of the CF patient. First, a 432 bp fragment, corresponding to the expected normal full-length mRNA, was obtained (Fragments 1, 2, 5, and 7 of Figure 2a) in the four tested haplotypes. The c.[T(7); c.1392G] genotype (considered WT) induced few AS. The c.[T(5); c.1392G] genotype induced more AS: exon 10 skipping (fragment 4 of Figure 2a) and production of a previously undescribed, mRNA lacking the first 118 bp of exon 10 (fragment 3 of Figure 2a). The c.[T(7); c.1392G>T] genotype induced both exon 10 skipping and a frame shift deletion of five nucleotides (detected in fragment 5 by sequencing). Finally, c.[T(5); c.1392G>T] genotype induced an abnormal pattern: the major product corresponds to the exon 10 skipping (fragment 9), and two abnormal mRNAs lacking the first 118 bp (fragment 8, due to T(5)) or the last 5 bp (due to c.1392G>T) of exon 10; these results are likely to contribute to the CF phenotype in our patient.

The TG(11)T(7) polymorphism in cis with the c.1392G>T mutation results in the production of only two transcripts in minor quantities (Table 3), while the majority of mRNA is of normal size (i.e., normal splicing).

All cell lines transfected with the minigene carrying the complex allele c.[1210–12T[7];1392+1G>T] (positive control) generated two transcripts: a deletion of five nucleotides at the 3' end and of one nucleotide at the 3' end of exon 10 (data not shown).

### RT-PCR validation of AS using *in vivo* methods

Fragments amplified from maternal cDNA were used to study the implication of carrying the c.1392G>T mutation in cis with T(5) polymorphism on splicing *in vivo*. Paternal amplicons served as controls.

Normal splicing (441bp) and AS (258bp) were observed in both parents (Figure 2b). While the 258bp amplicon is weak with father mRNA, it is almost equal to the 441bp amplicon with mother mRNA. This result also confirms that exon 10 skipping is present, but rare, with normal DNA sequence.

Sequencing of paternal cDNA shows that most mRNAs include exon 10 and 11. Sequencing of maternal cDNA shows almost no T at the 1392 position, confirming the high rate of exon 10 skipping (Figure 2c). The sequencing of maternal cDNA does not reveal the presence of mRNA minus 5bp or 118bp as identified in the *in cellulo* experiments. It is certainly due to nonsense-mediated mRNA decay (NMD) as these RNAs are not in frame with normal *CFTR* mRNA.

### Severe misprocessing of p.Lys464Asn CFTR

To evaluate the contribution of the c.1392G>T mutation (p.Lys464Asn) at the protein level, we studied the maturation of CFTR in HEK293 cells that had been transiently transfected with cDNA encoding the WT and mutated (p.Phe508del and p.Lys464Asn) CFTR.

We assessed the subcellular localisation of the mutant proteins using confocal microscopy. Neither p.Phe508del nor p.Lys464Asn CFTR mutants exhibited cell surface staining (Figure 3a). These experiments indicate that these mutated proteins were restricted to intracellular compartments, confirming the presence of a processing defect.

Under the experimental conditions, electrophoresis of WT-CFTR produced two bands (Figure 3b). The first was a narrow band of approximately 140 kDa (band B), which represented the core-glycosylated protein located in endoplasmic reticulum (ER); the second was diffuse, with an approximate molecular mass of 170 kDa (band C), and represented mature, fully glycosylated protein that had migrated through the Golgi complex to the cell membrane. For both mutated proteins (p.Lys464Asn and p.Phe508del), only band B was observed, confirming a retention of these mutated proteins in the ER compartment.

### Absence of CFTR channel activity in the CF patient

The studied CF patient had abnormal total chloride transport values and presented phenotypic features consistent with the diagnosis of CF, including increased Na<sup>+</sup> transport and absent Cl<sup>-</sup> secretion. A comprehensive summary is presented in Table 1.

### DISCUSSION

The medical analyses of the studied child, carrying the c.1392G>T mutation and a deletion in trans, revealed a severe CF phenotype. These observations were confirmed by the abnormal *in vivo* channel exploration tests and by the *in silico* analyses. Therefore, splicing defect and/or protein misprocess were suspected as genetic causes of the severe clinical outcomes. Increasing number of mutations resulting in truncated proteins and splicing defects are recently being reported such as p.Arg553X [12] or p.Glu831X [13].

Over 95% of Human genes undergo alternative splicing resulting in the diversification of mRNAs and proteins in the cell [14]. Single nucleotide polymorphisms may also strongly influence splicing [15] by directly disrupting splice sites or by creating new ones [16]. Nearly 50% of human genetic diseases are an outcome of splicing errors [17]. About 13% of *CFTR* mutations are classified as “splicing mutations”, but for almost 40% of them the role in affecting RNA splicing is not yet defined.

Several cis-acting elements and trans-acting factors have been identified and modulate exon 10 AS. One of cis-acting elements is the c.[1210-35TG[m];-12T[n]] polymorphism (TG(m)T(n)) located at the 3'-end of intron 9. Previous studies have shown that a high number of TG repeats and a low number of T tract can increase exon skipping. This reduction of the amount of complete *CFTR* exhibits incomplete penetrance, resulting in mild CF or *CFTR*-RD [18]. The amount of exon 10 skipping is not predictable and can only be determined by transcript analyses. The T(7) and T(9) alleles may induce a larger amount of normal splicing, whereas the T(5) variant induces the synthesis of two mRNAs, one with complete exon 10 and the other, in higher quantity, with a deleted exon 10 [18]. However, the effect of the T polymorphism is also influenced by the number of TG repeats [19]. In fact, in individuals presenting a heterozygous CF mutation in trans, the CBAVD (Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens) is observed in 94% of those carrying the T(5) polymorphism associated with 12 or 13 TG repeats. On the other

hand, only 32% of the same population carrying the T(5) allele associated with 11 repeats of TG exhibits CBAVD [19, 20]. Only the TG(10)T(9) allele may produce nearly 100% of intact transcripts. Even though the TG(11)T(7) is considered as the wild-type since it is the most frequent allele.

Our results showed that c.1392G>T was associated with the production of a proportion of mRNA exhibiting exon 10 skipping. Thus, c.1392G>T can be considered a splicing mutation. The presence of this mutation in the 5'ss (donor site) could affect the splicing by disturbing the binding of the U1 snRNA. Normally, to initiate splicing, this small nuclear RNA recognises the donor site by complementary binding between its 5' end and a conserved sequence of the donor site [21]. The localisation of c.1392G>T mutation could affect this essential interaction for a normal exon definition. Recently, it has been demonstrated that the U1 snRNA also provides the necessary signal from the splicing reaction back to the chromatin to induce its organisation [22]. Moreover, U1 snRNA with a modified 5' tail whose sequence complementary pair with the mutant donor site have been used to correct splicing [23, 24]. Minigene experiments showed that the transcripts with *CFTR* exon 12 presenting a mutation on its last nucleotide have all been rescued by the complementary mutated U1 snRNA [21]. Further minigene experiments should be realised to verify if the appropriate mutated U1 can rescue exon 10 in the presence of the c.1392G>T mutation.

In addition, the results showed that the complex allele c.[1210-12T[5];1392G>T] induces an intense increase of the rate of exon 10 skipping. The low number of T repeats could affect the splicing by reducing the distance separating the AG 3' intronic site from the UG repeats, where the TDP-43 protein binds [25]. In fact, this protein has been demonstrated to affect exon 10 splicing [26] and its affinity to mRNA is higher with a high number of UG [25]. Furthermore, the TDP-43 protein has the higher level of expression in a testicular cell line [25], which could explain the occurrence of CBAVD in TG(13)T(5) patients carrying in trans a CF mutation.

Moreover, these *in cellulo* results indicated that the c.1392G>T mutation also resulted in the production of an mRNA containing a five nucleotide deletion at the 3' end of exon 10, regardless of the associated polymorphism. This truncated mRNA was also predicted by bioinformatic analysis. Another truncated transcript, encoding a deletion of 118 nucleotides at the 5' end of exon 10, is due exclusively to the T(5) polymorphism that could mildly alter splice site usage, including activation of a cryptic site 118 bp upstream of the acceptor site. In the *in cellulo*

study, the use of the plasmid construct precludes NMD. However, in the *in vivo* study conducted using parental samples, these two aberrant transcripts were not detected. Their absence may be explained by NMD, which is caused by the frameshifts associated with these alleles and leads to premature termination codons in the open reading frame. In contrast, the transcript lacking the whole of exon 10 was identified in the *in vivo* study as it does not induce a frameshift.

These results obtained by *in silico*, *in cellulo* and *in vivo* studies demonstrate the implication of the c.[1210–12T[5];1392G>T] complex allele on exon 10 AS. Furthermore, we demonstrated the presence of a full-length mRNA containing the c.1392G>T mutation in all polymorphism/mutation combinations. However, the proportion of the mutated full-length mRNA was drastically reduced in the cells transfected by the complex allele c.[1210–12T[5];1392G>T]. Further experiments should be realized to quantify this rate in the nasal child cells when parental consent will be obtained.

Since we demonstrated the presence of a full-length mRNA containing the c.1392G>T mutation, translated to give a p.Lys464Asn protein, the study of the impact of this mutation at the protein level was performed. The WB results in transfected cells indicated a severe misprocess, confirmed by immunolocalisation, which demonstrated the retention of the mutated protein in the ER. As established for the p.Phe508del CFTR mutation, we suggest that conformational modifications caused by the p.Lys464Asn substitution may explain the observed ER retention, since export of a protein from the ER to the Golgi is tightly coupled to the acquisition of a native conformation [27]. Therefore, the Lys464 amino acid may play an important role in three dimensional folding. The presence of an asparagine in this position may alter the protein, specifically the NBD1 domain, preventing formation of the proper conformation and resulting in ER retention, retrotranslocation, and ultimately cytoplasmic degradation of the mutated protein [27]. These results confirm that, even if the mutated mRNA is present, the resulting altered protein is unable to form a functional CFTR protein. Therefore, it could be considered that the CF phenotype results mainly from the misprocessing since it has been demonstrated that only 4% of normally spliced non-mutated *CFTR* mRNA are sufficient to ensure an ordinary channel function [13].

The classification of this mutation, like for the c.1727G>C [28], according to the established system is not straightforward. From the mRNA results, c.1392G>T can be classified

as a class V mutation, as it dramatically reduces, in association with T(5), the abundance of normal size mRNA potentially bearing the mutated sequence. Furthermore, our results classify the c.1392G>T mutation as class II, as it prevents the maturation of the mutated protein and thus its translocation to the cell membrane.

In conclusion, the CF phenotype induced by 1392G>T is due to both abnormal CFTR processing and splicing defect. In the particular case of the patient described in this study, the TG(11)T(5) polymorphism emphasises the splicing defect, while in the case of a TG(11)T(7) polymorphism the protein defect would be the principal origin of the CF phenotype. Thus, this study demonstrates that data from multiple sources should be taken into consideration: *In silico*, *in cellulo* and *in vivo* studies, allowing examination of the effect(s) of the mutation along the protein synthesis pathway (transcription, splicing and protein maturation), should all be considered. In addition, the classification of a mutation is not sufficient to inform the clinical approach, as the presence of a complex allele may alter the specific effect of a single mutation. Therefore, in this monogenetic disease the complexity results of the combination of mutations and an individual approach should be provided when possible to perform appropriate diagnosis and treatment.

**FUNDING:** This work was supported by Poitiers Hospital and University of Poitiers, France and ABCF2 mucoviscidose, France

**ACKNOWLEDGMENTS:** We thank Dr. Anne Cantereau for her excellent assistance in the use of the confocal laser microscope, and James Habrioux for editing figures. This work was supported by “association mucoviscidose: ABCF2”. Raed Farhat received a fellowship from CNRS-Lebanon and Ayman El-Seedy received a fellowship from the Egyptian Government.

## REFERENCES

- [1] Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 2011;10 Suppl 2:S86-S102.
- [2] Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-1073.
- [3] Mickle JE, Cutting GR. Clinical implications of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutations. *Clin Chest Med* 1998;19:443-458.
- [4] El-Seedy A, Dudognon T, Bilan F, et al. Influence of the duplication of CFTR exon 9 and its flanking sequences on diagnosis of cystic fibrosis mutations. *J Mol Diagn* 2009;11:488-493.
- [5] El-Seedy A, Pasquet MC, Bienvenu T, et al. Consequence of partial duplications of the human gene on CF diagnosis: mutations or ectopic variations. *J Cyst Fibrosis* 2012;11:S16.
- [6] Clain J, Fritsch J, Lehmann-Che J, et al. Two mild cystic fibrosis-associated mutations result in severe cystic fibrosis when combined in cis and reveal a residue important for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing and function. *J Biol Chem* 2001;276:9045-9049.
- [7] Clain J, Lehmann-Che J, Girodon E, et al. A neutral variant involved in a complex allele contributes to a severe cystic fibrosis phenotype. *Hum Genet* 2005;116:454-460.
- [8] Pagani F, Buratti E, Stuani C, et al. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a non evolutionary conserved intronic element. *J Biol Chem* 2000;275:21041-21047.
- [9] Sermet-Gaudelus I, Dechaux M, Vallee B, et al. Chloride transport in nasal ciliated cells of cystic fibrosis heterozygotes. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1026–1031.

- [10] Sermet-Gaudelus I, Roussel D, Bui S, et al. The CF-CIRC Study: a French collaborative study to assess the accuracy of cystic fibrosis diagnosis in neonatal screening. *BMC Pediatr* 2006;6:25–30.
- [11] Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Huet F, et al. Nasal potential difference in cystic fibrosis diagnosis of very young children. *J Pediatr* 2007;150:e34–e35.
- [12] Hull J, Shackleton S, Harris A. The stop mutation R553X in the CFTR gene results in exon skipping. *Genomics* 1994;19:362-364.
- [13] Hinzpeter A, Aissat A, Sondo E. Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genet* 2010;6:e1001153.
- [14] Keren H, Lev-Maor G, Ast G. Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature reviews Genetics* 2010;11(5):345-355.
- [15] Nielsen KB, Sorensen S, Cartegni L, et al. Seemingly neutral polymorphic variants may confer immunity to splicing-inactivating mutations: a synonymous SNP in exon 5 of MCAD protects from deleterious mutations in a flanking exonic splicing enhancer. *Am J Hum Genet* 2007;80:416-432.
- [16] Faa V, Incani F, Meloni A et al. Characterization of a disease-associated mutation affecting a putative splicing regulatory element in intron 6b of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J. Biol. Chem* 2009;284:30024-30031.
- [17] Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* 2010;463(7280):457-463.
- [18] Chillon M, Casals T, Mercier B, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med* 1995;332:1475-1480.

[19] Cuppens H, Lin W, Jaspers M et al. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic TG(m) locus explains the partial penetrance of the T(5) polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest* 1998;101:487-496.

[20] Groman JD, Hefferon TW, Casals T et al. Variation in a repeat sequence determines whether a common variant of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is pathogenic or benign. *Am J Hum Genet* 2004;74:176-179.

[21] Fernandez Alanis E, Pinotti M, Dal Mas A, et al. An exon-specific U1 small nuclear RNA (snRNA) strategy to correct splicing defects. *Hum Mol Genet* 2012;21:2389-2398.

[22] Keren-Shaul H, Lev-Maor G, Ast G. Pre-mRNA splicing is a determinant of nucleosome organization. *PLoS One* 2013;8:e53506.

[23] Schmid F, Glaus E, Barthelmes D, et al. U1 snRNA-mediated gene therapeutic correction of splice defects caused by an exceptionally mild BBS mutation. *Hum Mutat* 2011;32(7):815-24.

[24] Tanner G, Glaus E, Barthelmes D, et al. Therapeutic strategy to rescue mutation-induced exon skipping in rhodopsin by adaptation of U1 snRNA. *Hum Mutat* 2009;30:255-263.

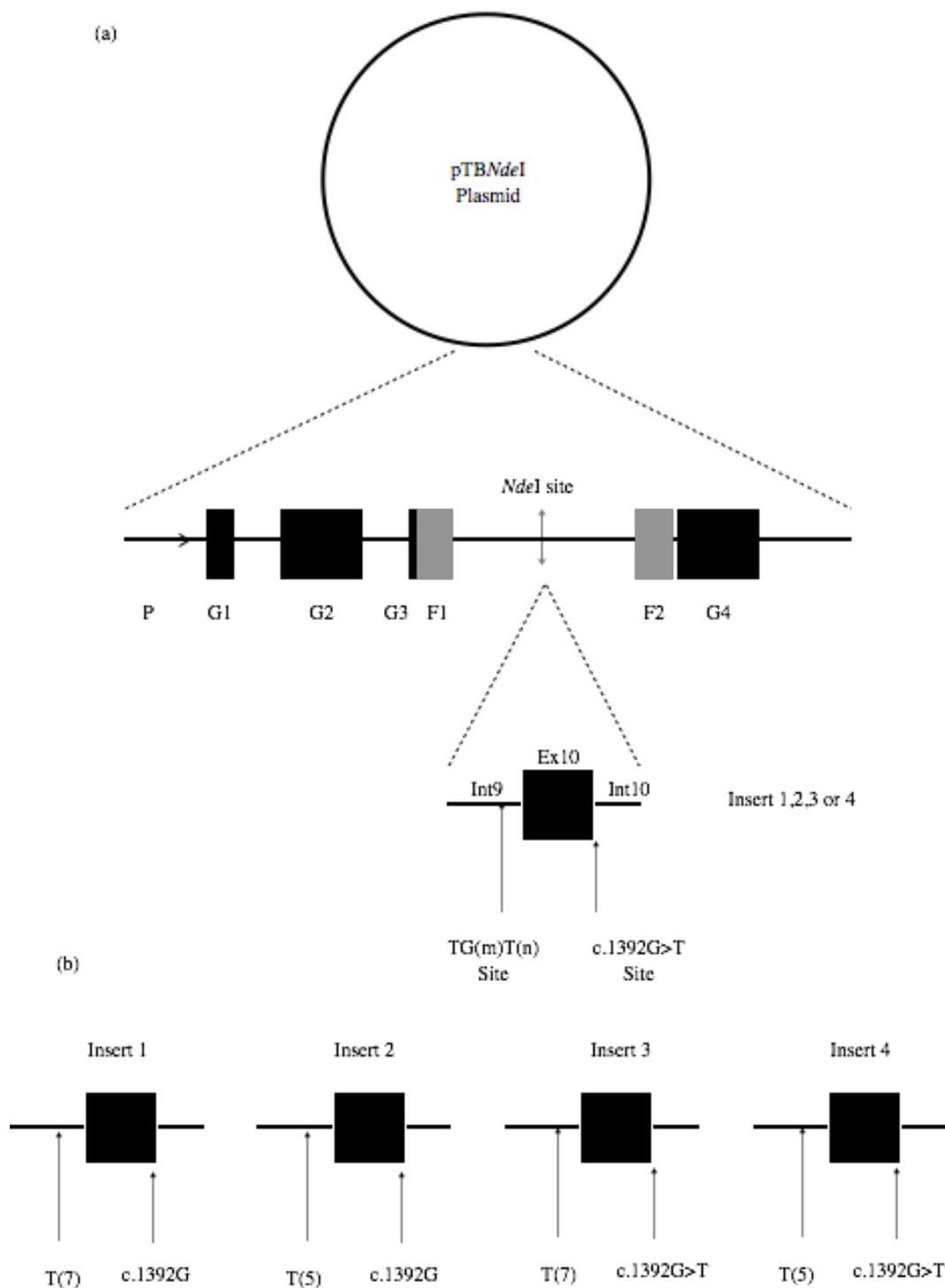
[25] Disset A, Michot C, Harris A, Buratti E, Claustres M, Tuffery-Giraud S. A T3 allele in the CFTR gene exacerbates exon 9 skipping in vas deferens and epididymal cell lines and is associated with Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (CBAVD). *Hum Mutat* 2005;25:72-81.

[26] Buratti E, Baralle FE. Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9. *J Biol Chem* 2001;276 :36337-36343.

[27] Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. Cystic fibrosis. In: The metabolic and molecular bases of inherited disease. Eighth ed. McGraw-Hill, Inc. New York 2001;p5121-5189.

[28] El-Seedy A, Girodon E, Norez C, et al. CFTR mutation combinations producing frequent complex alleles with different clinical and functional outcomes. Hum Mutat 2012;33: 1557-1565.

FIGURES



**Figure 1:** Constructions of four minigenes.

(a) The pTB*NdeI* plasmid used in the hybrid minigene technique. This plasmid contains a

reporter gene used to study the mRNA splicing. The reporter gene contains, at the 5' end, a promoter/enhancer sequence indicated by the arrow. This is followed by  $\alpha$ -globin (G1, G2, G3 and G4) and fibronectin (F1 and F2) exons separated by intronic sequences. The fibronectin intronic region, located between F1 and F2, contains a *NdeI* restriction site. Fragments of interest can be inserted in this site. The inserted fragment used in this study is composed of 186bp, 183bp and 114 bp of the intron 9, exon 10 and intron 10 respectively.

**(b)** The four inserts used in this study. Insert 1 (c.[TG(11)T(7); 1392G]) and 2 (c.[TG(11)T(5); 1392G]) are obtained from patients and were inserted in the pTBN*NdeI* plasmid. Plasmids containing inserts 3 (c.[TG(11)T(7); c.1392G>T]) and 4 (c.[TG(11)T(5); c.1392G>T]) were obtained by directed mutagenesis realized on the plasmids containing inserts 1 and 2 respectively.

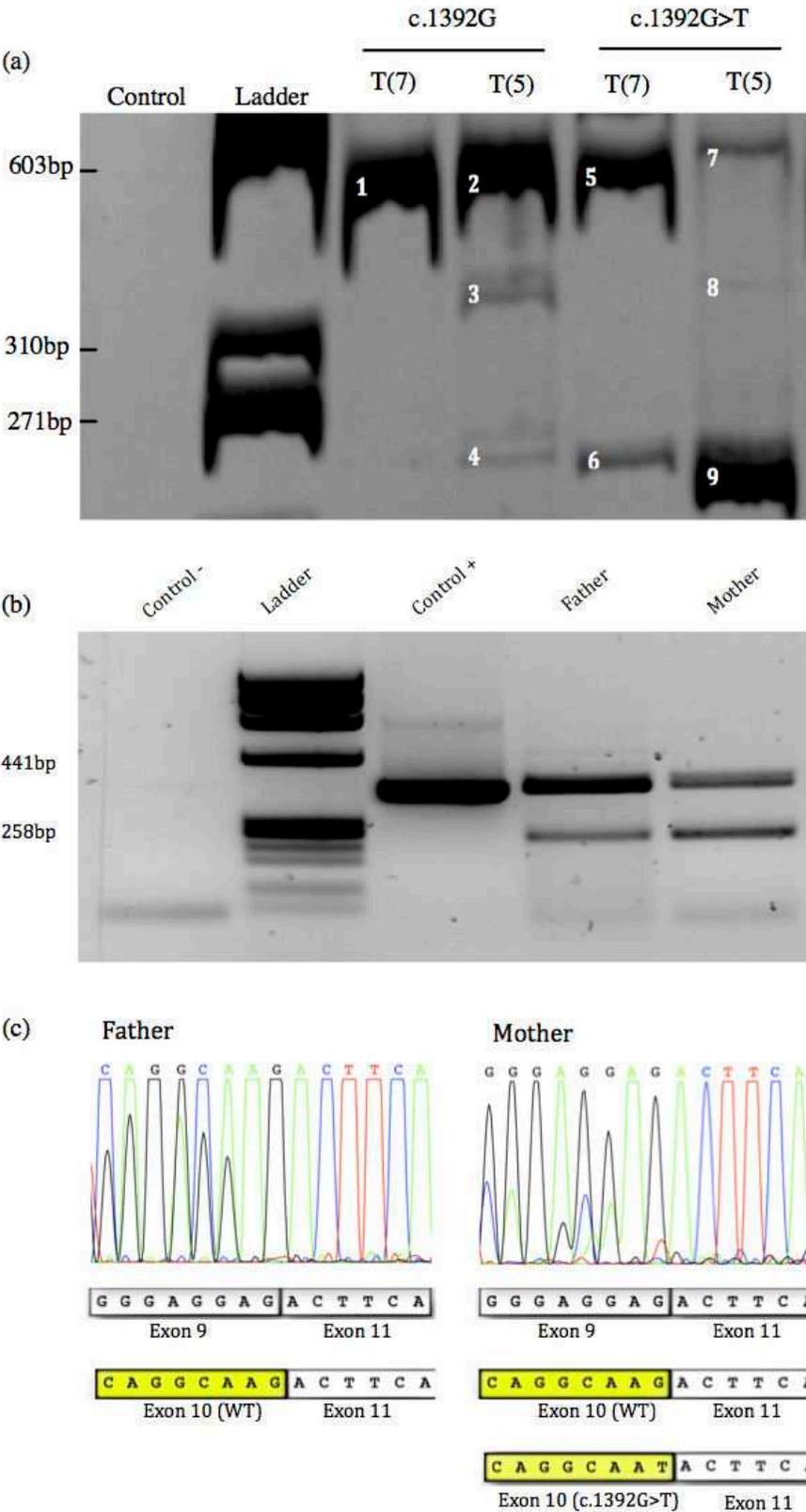
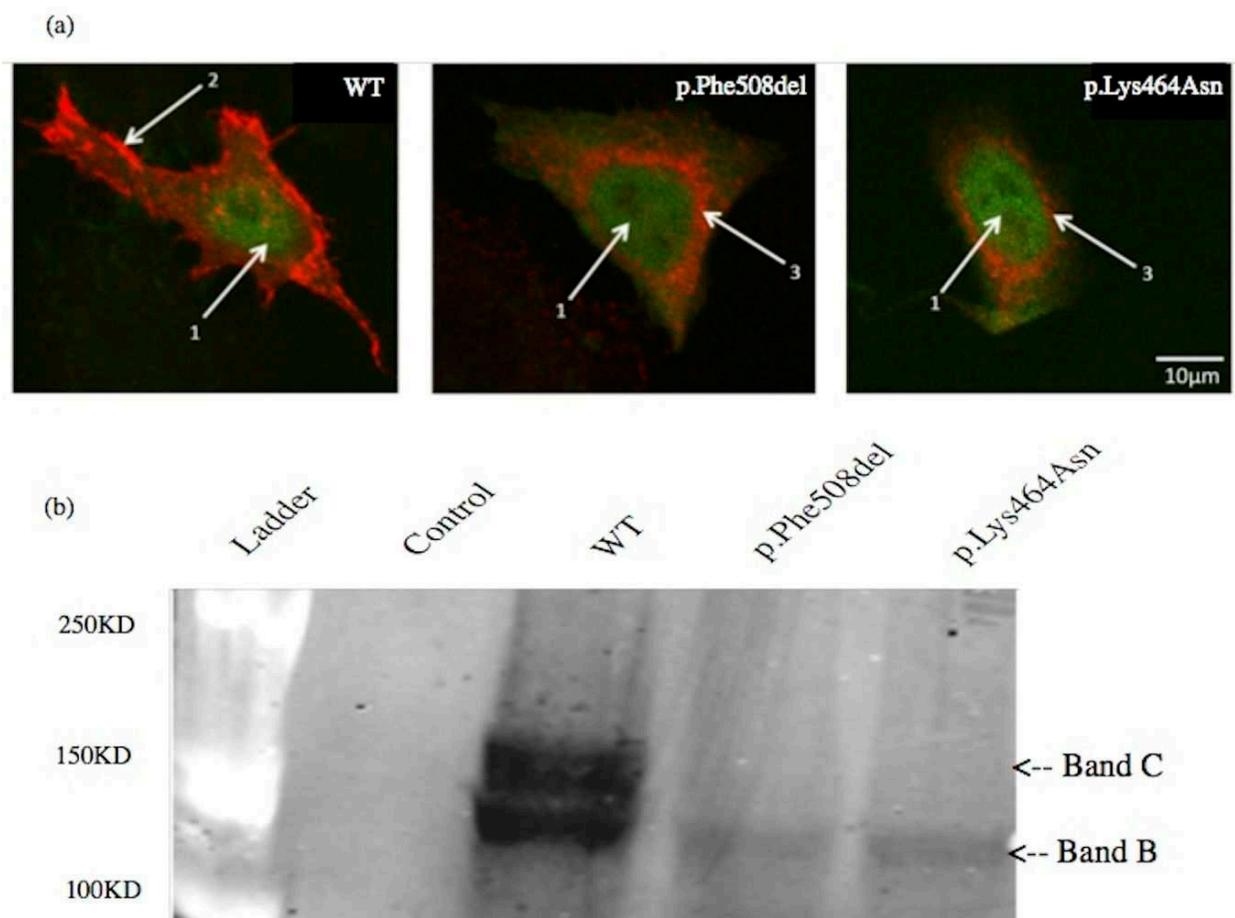


Figure 2: *In cellulo* and *in vivo* effects of complex alleles on splicing.

**(a)** Effect of complex alleles on splicing efficiency. Minigenes were transfected in HeLa, Hek293 and HT29 cells and analyzed for splicing efficiency. RT-PCR was realized and the different fragments of cDNA using G3/F2 primers (Table 2e) were separated by electrophoresis through 10% polyacrylamide gel. The used marker is  $\phi$ X174DNA/ *Bsu*RI (*Hae*III) (Fermentas) and RT-PCR of minigenes carrying the c.[TG(11)T(7); 1392G] or c.[TG(11)T(5); 1392G], c.[TG(11)T(7);c.1392G>T] and c.[TG(11)T(5);c.1392G>T] is analyzed. Fragments 1, 2, 5, 7 correspond to exon 10 inclusion. Fragments 5 and 7 also contain an exon 10 deleted of 5bp. Fragments 3 and 8 only have a part of exon 10 and fragments 4, 6 and 9 present an exclusion of exon 10.

**(b)** Effect of complex alleles on *in vivo* splicing efficiency. Electrophoresis through 1.5% agarose gel showing the different fragments obtained after amplification of the total cDNA of the CF child parents using Exon 9/Exon11 primers (Table 2f). Positive control: the pTCF plasmid amplified by the same primers. Ladder:  $\phi$ X174 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) Marker (Fermentas).

**(c)** Direct sequencing of the amplified cDNA of the father and the mother using Exon 9/Exon11 primers (Table 2f).



**Figure 3:** Processing of Wild-Type (WT) and mutant CFTR proteins studied by confocal microscopy (a) and Western blotting (b).

**(a)** Subcellular localization of WT and mutant CFTR proteins in expressing HeLa cells as assessed by Confocal laser scanning microscopy. To visualize CFTR, fixed cells were blocked by three washes in PBS/3% BSA and incubated with human anti- MAB25031 (Invitrogen) antibody during 1h at 4°C. After washing and incubation with the secondary antibody Alexa Fluor 555 (Invitrogen), CFTR was stained red. Subcellular localizations are shown for the WT-CFTR, p.Phe508del and p.Lys464Asn. Arrows indicate the nucleus (1), cell membrane (2) and endoplasmic reticulum (3). The p.Phe508del and p.Lys464Asn CFTR mutants mislocalized as compared with WT-CFTR. A mean number of 15 cells were examined in three independent experiments for each CFTR protein. Scale Bar, 10 μm.

**(b)** Processing of WT and mutant CFTR proteins as assessed by the glycosylation status of the CFTR protein at steady state on Western blotting. WT or mutated (p.Phe508del and p.Lys464Asn) CFTR were obtained from transiently transfected HEK293 cells. CFTR protein was detected

by M3A7 (Chemicon), a mouse monoclonal antibody that recognises a C-terminal epitope in the region of residues 1370-1380. Arrows on the right indicate the positions of core-glycosylated (band B) and fully glycosylated (band C) forms of CFTR. Control: cells without transfection. Ladder: Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Biorad).

**Table 1:** Nasal potential difference test conducted on the CF patient. The results are compared to those obtained from controls (n=30), CF patients (n=80) and heterozygotes (n=45). The child score is comparable to that of the CF patient population.

	Patient	Control (n=30)		CF Patient (n=80)		Heterozygote (n=45)	
		Average	sd	Average	sd	Average	sd
<b>Basic DP (mVolts)</b>	<b>-67</b>	-16	6	-56	14,0	-15,5	8,0
<b>Delta Amiloride (mVolts)</b>	<b>44</b>	7,2	5	32	15	6	5
<b>Delta O Chlore (mVolts)</b>	<b>3</b>	-11,4	8	2	5	-6	5
<b>Delta Isoproterenol (mVolts)</b>	<b>-6</b>	-6,9	6	-0,2	2	-2	2
<b>Delta O Chlore Iso (mVolts)</b>	<b>-3</b>	-18	11	1,5	6	-8	6
<b>Score</b>							
<b>(-0.11 ΔLowCle-Iso - 0.05ΔAmiloride)</b>	<b>-1,87</b>	<b>1,62</b>	<b>1,8</b>	<b>-1,74</b>	<b>0,9</b>	<b>0,602</b>	<b>0,7</b>

**Table 2:** Primers used in amplification and sequencing of studied regions.

	Name	Technique	Primers
a	Int9/Int10	Inserts Preparation	5'TGTATACATGTATGTATTCAG3' 5'ACATTCTCCTAATGCTCATG3'
b	Ex10/Int10	Directed Mutagenesis on pTB <i>Nde</i> I	5'GATCCACTGGAGCAGGCAA[T]GTAGTTCCTTTTGT3' 5'TTGCCTGCTCCAGTGGATCCAGCAACCGCC3'
c	IntF1/IntF2	Sequencing inserts in pTB <i>Nde</i> I	5'ACTTCAGATATTATGTCTAGG3' 5' CCCCATGTGAGATATCTAG 3'
d	Ex10/Ex11	Directed Mutagenesis on pTCF	5'-CCACTGGAGCAGGCAA[T]ACTTCACTTC-3' 5'-TTGCCTGCTCCAGTGGATCCAGCAAC-3'
e	G3/F2	Sequencing cDNA of cultured cells	5'CAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTGC3' 5' AGGGTCACCAGGAAGTTGGTTAAATCA 3'
f	Ex9/Ex11	Sequencing cDNA of epithelial cells	5'GATGACGCTTCTGTATCTATAT3' 5'CTAATGGTGATGACAGCCTC3'

**Table 3:** Genotype and phenotype correlations for the four tested haplotypes. The four plasmids are TG11 and were transiently transfected in HeLa, Hek293 and HT29 cells. RT-PCR and DNA analysis were performed with primers detailed in Table 2. Semi-quantitative results have been obtained by three independently transfections in the three different lines. The percentages are obtained after analysing the polyacrylamide gel electrophoresis using the ImageJ64 program. The same percentages have been obtained on agarose gel of cDNA obtained from three independent transfections of the three cell lines.

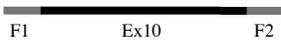
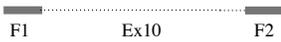
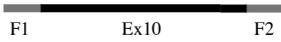
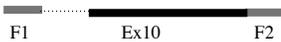
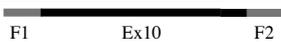
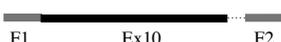
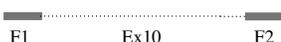
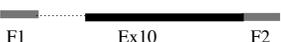
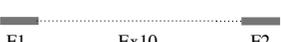
(\*): Expected phenotypes with the presented complex alleles and a CF mutation in trans

(\*\*): CFTR-RD is present in 32% of the population carrying 11 or 12 TG repeats and 5 T tract without a CF mutation in cis (see ref. 19 and 20).

(\*\*\*): Percentage of the fragments containing the complete exon 10 and the exon 10 minus 5 bp.

(\*\*\*\*) No patient to determine the phenotype, but our results show that the mutation c.1392G>T induces CF as p.Phe508del.

F1 and F2 represent fibronectin exons. Ex10 represents exon 10. The length of the dotted line determined the deletion. Exon 10 skipping, the minus 5bp and the minus 118bp were represented by a dotted line replacing the complete exon 10, a dotted line in the 3' of exon 10, and a dotted line in the 5' of exon 10, respectively.

Genotype	mRNAs	Percentage of mRNA forms	Phenotype*
c.1210-12T[7] WT		98%	Healthy
		2%	
c.1210-12T[5] WT		81%	Healthy**
		11%	
		8%	
c.[1210-12T[7];1392G>T]		79%***	CF****
			
		21%	
c.[1210-12T[5];1392G>T]		18%***	CF
			
			
			

7.4. Annexes

Communications affichée et orale au 7<sup>th</sup> European CF Young Investigator Meeting, Paris, France en mars 2013.

### Multi-physiopathology consequences of the c.1392G>T mutation

R. Farhat<sup>1</sup>, K. El Moussaoui<sup>1</sup>, A. El Seedy<sup>1</sup>, M.-C. Pasquet<sup>1,2</sup>, C. Adolphe<sup>3</sup>, E. Bieth<sup>4</sup>, J. Languépin<sup>5</sup>, I. Sermet-Gaudelus<sup>6</sup>, A. Kitzis<sup>1,2</sup>, V. Ladeveze<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université de Poitiers, Laboratoire de génétique, Poitiers, France, <sup>2</sup>CHU de Poitiers, Poitiers, France, <sup>3</sup>Université de Poitiers, Poitiers, France, <sup>4</sup>Hopital Purpan, Toulouse, France, <sup>5</sup>CHU de Limoges, Limoges, France, <sup>6</sup>CRCM, Hopital Necker-Enfants malades, Paris, France

---

#### Introduction

Many studies conducted on the Exon 10 of the *CFTR* gene have described the responsibility of several cis-acting and trans-acting factors in modulating the AS of this exon. The cis-acting element described so far is the c.1210-34T[GmTn] known also as (TG)m(T)n polymorphic region present at 3'-end of intron 9. Several *in vitro* and *in vivo* studies have shown that a high number of TG repeats and a low number of T tracts in the (TG)m(T)n induce the exon 10 skipping.

#### Family Case

The c.1392G>T mutation was identified in a CF patient carrying the c.3659delC mutation in trans and 5T in cis. The patient (French origin) was a newborn child referred for elevated immunoreactive trypsinogen (newborn screening) and positive sweat test (Cl<sup>-</sup> > 100 mEq/l). At the age of 6 months, he expressed a severe phenotype with pancreatic insufficiency, chronic cough, and bronchial infection (*H. influenzae* and *S. aureus*). As this mutation affects the last nucleotide of exon 10, splicing is the first mechanism studied to explain the cystic fibrosis phenotype of this patient.

#### Objective

In this work, we have studied a CF patient carrying on a same allele the 5T version of the (TG)m(T)n polymorphic region (3' end of intron 9) and the c.1392G>T mutation (3' end of exon 10). To demonstrate the co-implication these two regions on the alternative splicing, we examine *in vitro* and *in vivo* the effects on mRNA level.

**Figure 1:** The lower is the number of T tracts in the (TG)m(T)n the higher is the percentage of exon 10 skipping (Cullis et al. 1995, N Engl J Med. 332:1475-1480)

	Control (n=30)			CF Patient (n=80)			Heterozygote (n=45)		
	Average	Sd		Average	Sd		Average	Sd	
Basic DP (mVolts)	-67	-16	6	-56	14	-15.5	8		
Delta Amiloride (mVolts)	44	7.2	5	32	15	-6	5		
Delta O Chloride (mVolts)	3	-11.4	8	2	5	-6	5		
Delta Isoproterenol (mVolts)	-6	-6.9	6	-0.2	2	-2	2		
Delta O Chloride Iso (mVolts)	-3	-18	11	1.5	6	-8	6		
Score	-1.87	1.62	1.8	-1.74	0.9	0.602	0.7		

**Table 1:** Nasal difference potential test showing that the patient presents value similar to those obtained in 80 CF patients

**Figure 2:** Genological tree presenting the genotypes of the mother, the father and their CF child

---

#### Effect on Splicing

**Figure 3:** (a) Construction of a minigene by using the pTB plasmid (provided by F. Pagan) and inserting CFTR fragment containing exon 10 and some nucleotides of its adjacent introns. (b) Four variants of the minigene were obtained. Variants 1 and 2 were obtained by inserting, in the plasmid pTB, sequences obtained from a 7T or 5T individuals respectively. Variants 3 and 4 were obtained by directed mutagenesis conducted on variants 1 and 2 respectively.

#### In vitro study

**Figure 4:** (a) Polycrylamide gel showing, for each plasmid construction, the different fragments of cDNA using 2.3a and Bra2ex9 Primers on the total cDNA. (b) Comparison of the fragments intensity grouped by size. (c) Sequencing of the different fragments obtained after their purification from the gel.

#### In vivo study

**Figure 5:** (a) Agarose gel showing the different fragment of cDNA using exon 9 and 11 primers on the total cDNA of the mother and the father. (b) Sequence of the father's cDNA: Normal splicing (majority) and Exon 10 skipping (minority). (c) Sequence of the mother's cDNA: Exon 10 skipping (majority). Normal splicing with the c.1392G>T mutation (minority) and Normal splicing with WT exon 10

**5T polymorphism**  
+  
**c.1392G>T mutation**

1) Truncated mRNA (Exon 10 skipping) (Class V mutation)

2) Full-length mutated mRNA (Complete exon 10 with c.1392G>T)

3) Truncated mRNA (Exon 10 minus 118bp of its 5' end)

4) Truncated mRNA (Exon 10 minus 5bp of its 3' end)

**Absence of NMD**

**Presence of NMD**

---

#### Effect on Processing

**Figure 6:** The pTCF plasmid (generously provided by P. Fanen) is a vector designed to produce endogenous CFTR protein and to visualize transfected mammalian cells using Green Fluorescent Protein (GFP). This plasmid contains the CFTR complementary DNA (cDNA) under the control of the CMV promoter, while the SV40 promoter controls expression of GFP. In this study, WT, c.1521-1523delCTT (p.Phe508del), and c.1392G>T pTCF plasmids were used. The two mutated plasmids were obtained by directed mutagenesis of the WT.

#### Maturation Study

**Figure 7:** Processing of WT and mutant CFTR proteins as assessed by the glycosylation status of the CFTR protein at steady state on Western Blot. HeLa293 cells were transiently transfected with WT, or mutants (p.Phe508del and p.Lys464Asn). CFTR protein was detected by M3A7 (Chemicon), a mouse monoclonal antibody that recognizes an epitope at the C-terminal of CFTR in the region of residues 1370-1380. Arrows on the right indicate the positions of core-glycosylated (band B) and fully glycosylated (band C) forms of CFTR. Control: cells without transfection. Ladder: Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (BioRad).

#### Localization Study

**Figure 8:** Subcellular localization of WT and mutant CFTR proteins in expressing HeLa cells as assessed by Confocal laser scanning microscopy. CFTR was stained red with Alexa Fluor 555 (Invitrogen). Arrows indicate the nucleus (1), cell membrane (2) and endoplasmic reticulum (3). The mutant p.Phe508del (b) and p.Lys464Asn (c) mislocalized compared with the WT transfected cells. A mean number of 15 cells were examined in three independent experiments for each CFTR protein analyzed. Scale Bar, 10 µm.

**c.1392G>T mutation** → **Lys464Asn Protein** → **ER retention (Class II mutation)** → **No CFTR on membrane**

The Lys464 amino acid may play an important role in three dimensional folding, and the presence of an asparagine in this position may alter the protein, specifically the NBD1 domain, preventing formation of the proper conformation and resulting in ER retention.

#### 3D Structure

**Figure 9:** 3D modeling of the WT and mutant CFTR proteins using the SWISS-MODEL program. The WT protein is used as a control and shows the normal conformation of the NBD1, whereas the p.Phe508del (class II mutation) shows a modification in the NBD1 structure. The p.Lys464Asn protein shows a modification in the NBD1 if compared to the WT protein. This modification can be the cause of the protein retention in the endoplasmic reticulum and thus can explain its absence on the membrane.

---

#### Conclusion

	Alternative Splicing	Misprocessing
5T	+	None
c.1392G>T	+	No protein on membrane
5T+c.1392G>T	+++	No protein on membrane

➤ This study illustrates the need for data from multiple sources to be taken into consideration when CFTR mutations are classified.

➤ In addition, the classification of a mutation is not sufficient to inform the clinical approach, as the presence of a complex allele may alter the specific effect of a single mutation.

➤ Therefore, an individual approach to perform appropriate diagnosis and treatment should be provided where possible.

108

Communications affichée et orale au 35th European Cystic Fibrosis Society Conference, Dublin, Irlande en juin 2012. Résumé publié dans le Journal of Cystic Fibrosis, Vol.11 Suppl. 1, June 2012, ISSN 1569-1993, Abstracts of the 35th European Cystic Fibrosis Conference, Dublin, Ireland, 6-9 June 2012.

### Co-Implication of the 5' and 3' regions of CFTR Exon 10 in its Alternative Splicing: Prediction to Pathology

R. Farhat<sup>1</sup>, A. El Seedy<sup>1</sup>, K. El Moussaoui<sup>1</sup>, M.-C. Pasquet<sup>1,2</sup>, C. Adolphe<sup>3</sup>, E. Bieth<sup>4</sup>, I. Sermet-Gaudelus<sup>5</sup>, A. Kitzis<sup>1,2</sup>, V. Ladeveze<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Université de Poitiers, IPBC, Poitiers, France, <sup>2</sup>CHU de Poitiers, Poitiers, France, <sup>3</sup>Université de Poitiers, Poitiers, France, <sup>4</sup>Hopital Purpan, Toulouse, France, <sup>5</sup>GRCM, Hopital Necker-Enfants malades, Paris, France

#### Introduction

Many studies conducted on the Exon 10 of the CFTR gene have described the responsibility of several cis-acting and trans-acting factors in modulating the AS of this exon. The cis-acting element described so far is the c.1210-34TG[m]T[n] element also as (TG)m(T)n polymorphic region present at 3'-end of intron 9. Several *in vitro* and *in vivo* studies have shown that a high number of TG repeats and a low number of T tracts in the (TG)m(T)n induce the exon 10 skipping.

#### Objective

In this work, we have studied a CF patient carrying on the same allele the 5T version of the (TG)m(T)n polymorphic region (3' end of intron 9) and the c.1392G>T mutation (3' end of exon 10). To demonstrate the co-implication these two regions on the alternative splicing, we examine *in vitro* and *in vivo* the effects on mRNA level.

#### Family Case

The c.1392G>T mutation was identified in a CF patient carrying the c.3659delC mutation in trans and 5T in cis. The patient (French origin) was a newborn child referred for elevated immunoreactive trypsinogen (newborn screening) and positive sweat test (Cl<sup>-</sup> > 100 mEq/l). At the age of 6 months, he expressed a severe phenotype with pancreatic insufficiency, chronic cough, and bronchial infection (*H. influenzae* and *S. aureus*). As this mutation affects the last nucleotide of exon 10, splicing is the first mechanism studied to explain the cystic fibrosis phenotype of this patient.

	Control (n=30)		CF Patient (n=80)		Heterozygote (n=45)	
	Average	Sd	Average	Sd	Average	Sd
Basic DP (mVolts)	-67	-16	6	-56	14	-15.5
Delta Amiloride (mVolts)	44	7.2	5	32	15	-6
Delta O Chloro (mVolts)	3	-11.4	8	2	5	-6
Delta Isoproterenol (mVolts)	-6	-6.9	6	-0.2	2	-2
Delta O Chloro Iso (mVolts)	-3	-18	11	1.5	6	-8
Score	-1.87	1.62	1.8	-1.74	0.9	0.602

#### Figure 1

Lower is the number of T tracts in the (TG)m(T)n the higher is the percentage of exon 10 skipping (Chillon et al. 1995, N Engl J Med. 332,1475-1488)

#### Figure 2

Genealogical tree presenting the genotypes of the mother, the father and their CF child

#### Table 1

Nasal difference potential test showing that the patient presents value similar to those obtained in 80 CF patients

#### Methods

##### In Vitro Study

##### Results

#### Figure 3

(a) Construction of a minigene by using the pTB plasmid (provided by F. Pagan) and inserting CFTR fragment containing exon 10 and some nucleotides of its adjacent introns. (b) Four variants of the minigene were obtained. Variants 1 and 2 were obtained by inserting, in the plasmid pTB, sequences obtained from a 7T or 5T individuals respectively. Variants 3 and 4 were obtained by directed mutagenesis conducted on variants 1 and 2 respectively. (c) Techniques used to study the splicing.

#### Figure 4

(a) Polyacrylamide gel showing, for each plasmid construction, the different fragments of cDNA using 2.3a and Bra2rev Primers on the total cDNA. (b) Comparison of the fragments intensity grouped by size. (c) Sequencing of the different fragments obtained after their purification from the gel.

#### In Vivo Study

Total mRNA extracts of the nasal epithelial cells of the father and the mother of the CF child were obtained. mRNA of the mother were used to conduct the *in vivo* study and mRNA of the father were used as a control.

Total mRNA were transformed in cDNA by Reverse Transcriptase PCR. The amplification of the studied fragment was realized by the use of an exon 9 and exon 11 primers. The PCR products were migrated on an agarose gel and sequenced.

#### Figure 5

Representation of the exons 9, 10 and 11 with their respective 5' or 3' nucleotides. Two cDNA are represented, the first one is obtained after a normal splicing and the second one after a skipping of the exon 10.

#### Conclusion

**5T polymorphism** + **c.1392G>T mutation**

1) Truncated mRNA (Exon 10 skipping)  
 2) Full-length mutated mRNA (Complete exon 10 containing c.1392G>T)  
 3) Truncated mRNA (Exon 10 minus 118bp of its 5' end)  
 4) Truncated mRNA (Exon 10 minus 5bp of its 3' end)

Absence of NMD → Non-functional Protein  
 Presence of NMD → Protein Synthesis (Study in Progress)  
 No Protein

#### Figure 6

(a) Agarose gel showing the different fragment of cDNA using exon 9 and 11 primers on the total cDNA of the mother and the father. (b) Sequence of the father's cDNA. Normal splicing (majority) and Exon 10 skipping (minority). (c) Sequence of the mother's cDNA. Exon 10 skipping (majority). Normal splicing with the c.1392G>T mutation (minority) and Normal splicing with WT exon 10

The exon 10 skipping is present in higher quantity in the mRNA of the mother compared its presence. Moreover, in this fraction of the full-length mRNA with the c.1392G>T mutation could be produced, and so a mutated protein (p.Lys464Asn). In this case, we don't know yet if this mutation has an impact on the localization, process and function of CFTR. Further experiments will be necessary to conclude on the impact of this mutation on CFTR.

## 8. ETUDES DE LA MUTATION c.3909C>G ET DE SON ALLELE COMPLEXE DANS LA POPULATION LIBANAISE

### 8.1. Contexte des études de la mutation c.3909C>G

La mutation c.3909C>G a été identifiée, par Osborne *et al.* en 1991, pour la première fois, chez 4 patients caucasiens britanniques hétérozygotes. Cette mutation affecte le 45ème nucléotide de l'exon 24 composé de 90 nucléotides. L'exon 24 code pour une partie du NBD2. La mutation induit une substitution d'une Asparagine en une Lysine (p.Asn1303Lys). Au niveau protéique, cette Asparagine en position 1303 semble avoir un rôle important dans le fonctionnement de CFTR. En effet, elle stabilise la liaison établie entre l'alpha-phosphate de l'ATP et son site de liaison (Gln1291) par la formation de liaisons hydrogènes (Berger *et al.*, 2001). La liaison de l'ATP à la protéine est cruciale pour le bon fonctionnement de son activité.

Depuis l'identification de la mutation c.3909C>G, la corrélation génotype-phénotype n'est pas claire. L'étude d'Osborne *et al.* de 1991, menée sur 216 patients portant la mutation au moins sur un allèle, montre que la sévérité au niveau pancréatique et pulmonaire est très variable dans les génotypes homozygotes ou hétérozygotes. Ces résultats suggèrent que c.3909C>G est une mutation sévère en affectant essentiellement le pancréas (Osborne *et al.*, 1992).

La mutation a été classifiée suite aux études comme une mutation de classe II (Gregory *et al.*, 1991 ; Fanen *et al.*, 2014). Des analyses de maturation ont été uniquement réalisées mais la localisation ou la fonctionnalité n'ont pas été déterminées pour confirmer les études précédentes. De ce fait, ces travaux, l'évaluation ont permis l'évaluation complète de l'effet de la mutation au niveau protéique.

Au niveau de l'ARN, il est largement répandu que la mutation c.3909C>G peut induire un épissage alternatif aberrant. Cependant les recherches bibliographiques effectuées ne trouvent pas une référence pouvant soutenir cette hypothèse. Ainsi, dans ces travaux nous avons étudié l'effet de la mutation c.3909C>G sur l'épissage, pour la première fois, par la technique du minigène hybride.

Le laboratoire a effectué des analyses sur la recherche de possibles allèles complexes contenant la mutation c.3909C>G. Ces recherches ont été motivées par

l'éventuel effet de la mutation c.3909C>G sur l'épissage alternatif ainsi que la variabilité des conséquences cliniques chez les patients. Ainsi, tous les échantillons d'ADN des patients ayant au moins un allèle portant la mutation c.3909C>G au laboratoire de génétique de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth, Liban ont été récupérés. La recherche d'allèles complexes a été réalisée par séquençage et études parentales sur ces échantillons.

### 8.2. Mise en évidence d'un allèle complexe

Le séquençage complet du gène *CFTR* chez 7 patients libanais et leurs parents a révélé l'existence des polymorphismes c.744-33GATT(6) (intron 6) et c.869+11C>T (intron 7) toujours en association en cis avec la c.3909C>G. La forme WT correspondante à cet allèle est le c.[744-33GATT(7) ; 869+11C]. L'allèle complexe muté n'est pas associé à la mutation c.3909C>G uniquement chez la population libanaise mais figure dans l'haplotype sur lequel la mutation est présente chez toutes populations. De ce fait, nous avons étudié dans un premier temps l'impact de la mutation et dans un second temps celui de l'allèle complexe c.[744-33GATT(6); 869+11C>T] sur l'épissage. Deux constructions de minigènes avec le plasmide pTBNdel ont été réalisées pour l'étude de la c.3909C>G (pTBNdel-WT et pTBNdel-c.3909C>G). Deux autres minigènes contenant c.[744-33GATT(7); 869+11C] ou c.[744-33GATT(6); 869+11C>T] ont été construits pour l'étude de l'allèle complexe.

### 8.3. Contexte géographique et historique de la mutation c.3909C>G

La mutation c.3909C>G est la quatrième mutation la plus fréquente mondialement. Elle a une fréquence mondiale de 1.3% et est précédée par c.1521\_1523delCTT, c.1624G>T, c.1652G>A dont les fréquences respectives sont de 66%, 2,4% 1.6% respectivement (<http://www.genet.sickkids.on.ca/app>). La caractéristique principale de la mutation est sa fréquence élevée dans les pays du pourtour de la méditerranée. En effet, dans les pays européens de la méditerranée comme l'Espagne, la Grèce, le sud de l'Italie, le sud de la France et la Turquie les fréquences respectives sont de 2,5% ; 3,3% ; 6,8% ; 3% et 2.9% alors que celles des pays du nord de l'Europe varient entre 0 et 2%, avec quelques exceptions comme la Bulgarie où la fréquence est plus élevée (Bobadilla *et al.*, 2002). Dans les pays africains de la

méditerranée comme l'Algérie et la Tunisie, les fréquences respectives sont de 8,3% (Loumi *et al.*, 2008) et 6.4% (Bobadilla *et al.*, 2002). Aucune donnée n'est présentée sur les fréquences de la mutation c.3909C>G dans les autres pays de l'Afrique. Cependant, la fréquence la plus élevée de la mutation est observée au Liban. Deux études effectuées, en 1997 puis en 2010, sur 36 et 44 allèles dans la population libanaise, placent la mutation en troisième position avec une fréquence de 9.4% (Desgeorges *et al.*, 1997) et en deuxième position avec une fréquence de 27% (Farra *et al.*, 2010).

La fréquence élevée de cette mutation dans le pourtour de la méditerranée et surtout au Liban a été la première raison incitant le laboratoire à l'étudier davantage dans ce pays, d'où le recrutement de patients libanais porteurs de la mutation c.3909C>G. De plus, nous avons remarqué que les pays présentant des fréquences élevées pour c.3909C>G sont d'anciennes colonies ou des postes majeurs de commerces phéniciens. Il nous a semblé intéressant de chercher si l'histoire de cette population avait un rôle dans l'introduction de la mutation c.3909C>G dans les pays de la méditerranée et par la suite dans la population Européenne. Cela nous a permis de suggérer l'origine Phénicienne de cette mutation et nous proposons deux moyens d'étude génétique pour accepter ou refuser l'hypothèse.

En effet, les phéniciens ont fondé une civilisation indépendante ayant sillonné la méditerranée durant le premier millénaire av. J.-C. Leurs cités d'origine sont Tyr, Sidon et Byblos qui sont actuellement des villes du littoral libanais. A partir des côtes libanaises, les phéniciens ont utilisé leurs expertises dans la navigation et la construction des navires pour instaurer un empire de commerce dans la méditerranée et peut-être plus loin (Zalloua *et al.*, 2008a). Les colonies majeures et les centres de commerce étaient sur les côtes de la Tunisie (surtout Carthage), de l'Algérie, de la Lybie, du Maroc et du sud de l'Espagne et du Portugal. De plus, ils avaient le contrôle de plusieurs îles comme Ibiza, Corse, Malte, l'Ouest de la Sicile et l'est de Chypre. L'apogée était entre 1200 et 800 av. J.-C. Le déclin a commencé en 539 av. J.-C, avec les conquêtes Perses, puis celles d'Alexandre le Grand jusqu'à l'incorporation du territoire dans l'empire Romain en 65 av. J.-C. Durant cette période, et surtout pendant les conquêtes Perses, les phéniciens ont migré vers Carthage et d'autres colonies phéniciennes.

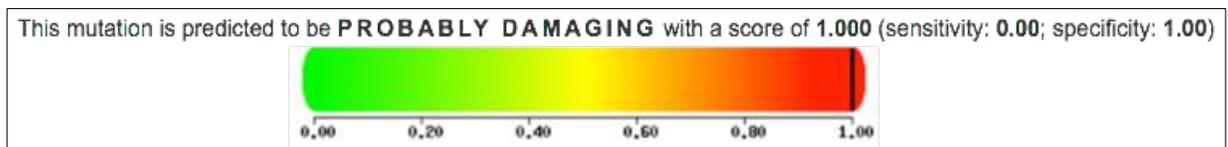
#### 8.4. Etude *in silico* de la mutation c.3909C>G

Les analyses *in silico*, effectuées à l'aide du site HSF, indiquent que la mutation peut induire la création d'un site accepteur (en position c.3898) ou d'un site donneur (en position c.3906) conduisant à un transcrit possédant -36pb ou -55pb de l'exon 24 respectivement (**Tableau 9**). Cependant, le séquençage des ARNm extraits de lignées cellulaires transfectées par les différents plasmides a montré l'absence d'un épissage aberrant, contrairement aux résultats obtenus *in silico*.

**Tableau 9 :** Tableau obtenu par le site HSF pour l'étude de la mutation c.3909C>G. Il indique la création de sites donneur et accepteur.

Sequence Position	cDNA Position	Splice site type	Motif	New splice site	Wild Type	Mutant	If cryptic site use, exon length variation	Variation (%)
325	c.3898	Acceptor	TTTAGAAAAA ACTT	ttagaaaaaagTT	41.51	70.45	-36	New site +69.74
333	c.3906	Donor	AAACTTGGA	AAAgttgga	45.93	72.77	-55	New site +58.42

Selon le programme PolyPhen-2, la mutation p.Asn1303Lys est Possibly Damaging avec un score de 1 sur une échelle de 0 à 1 (**Figure 25**).



**Figure 25 :** Prédiction du programme PolyPhen-2 concernant l'effet sévère de la mutation p.Asn1303Lys sur la protéine CFTR.

La localisation de l'Asn1303 au niveau du NBD2 et sa conservation au cours de l'évolution peuvent indiquer que la mutation pourrait induire des effets conséquents sur la protéine (**Figure 26**).

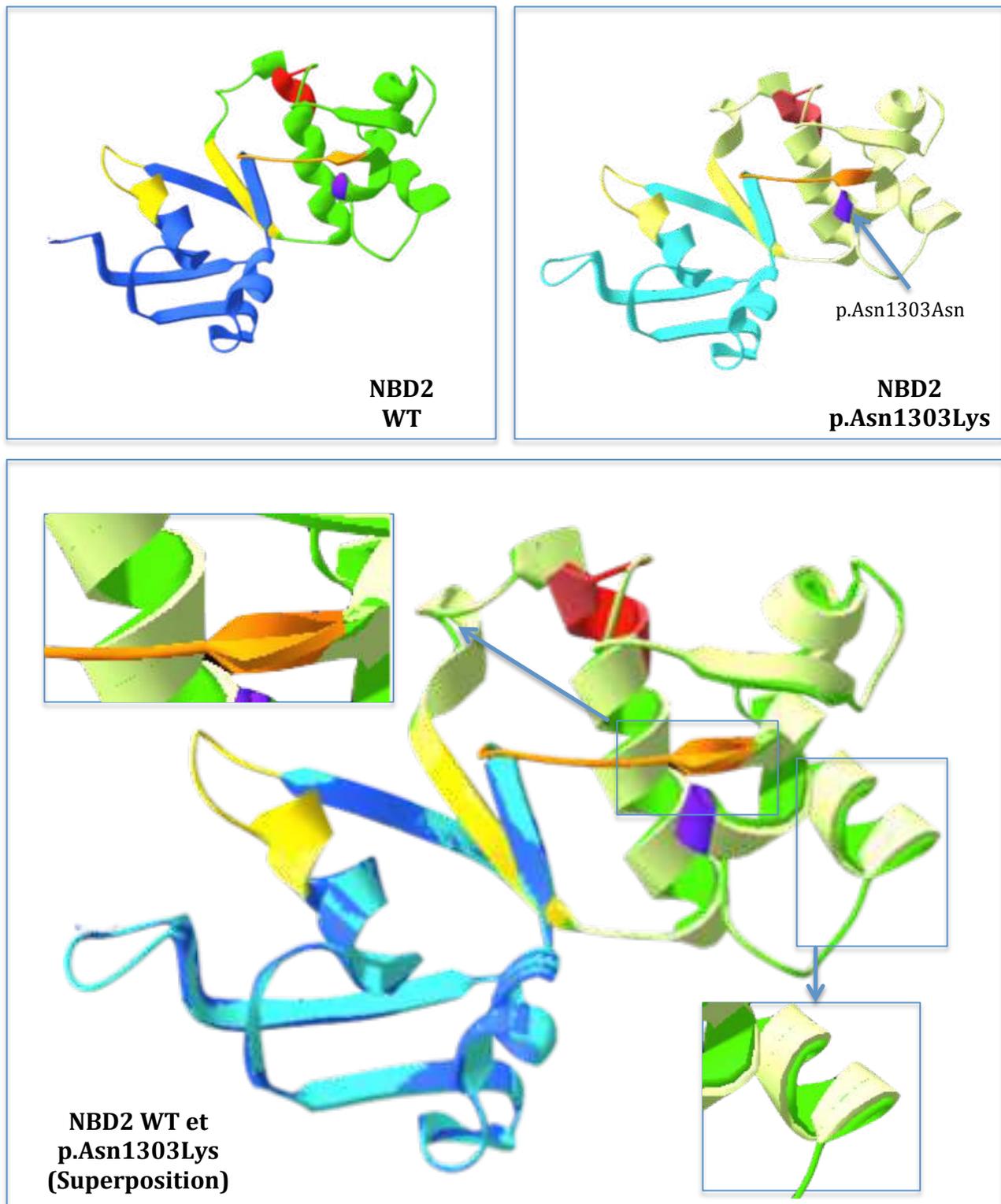
		Q Loop			
1257	FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPYEQWSDQEIW	1316	P13569		<i>Homo sapiens</i> (Humain)
1253	FLRMLNIKGDIEIDGVSWNSVTLQEWKAFGVITQKVFIFSGIFRQNLDPNGKWKDEEIW	1312	P26361		<i>Mus musculus</i> (Souris)
1253	FLRMLNIKGEIQIDGVSWNSMTLQEWKAFGVITQKVFIFSGIFRQNLDPNGKWRDEEIW	1312	P34158		<i>Rattus norvegicus</i> (Rat)
1258	FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPFGQWSDQEIW	1317	Q00552		<i>Cavia porcellus</i> (Porc)
1258	FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPYEQWSDQEIW	1317	Q00553		<i>Macaca mulatta</i> (Rhésus)
1258	FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPYEQWSDQEIW	1317	P35071		<i>Bos taurus</i> (Boeuf)
1260	LLRLVNTGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPYEQWSDQEIW	1319	Q5U820		<i>Canis familiaris</i> (Chien)
1258	FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPYEQWSDQEIW	1317	Q00555		<i>Ovis aries</i> (Mouton)
1257	FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPYEQWSDQEIW	1316	Q2QLE5		<i>Pan troglodytes</i> (Chimpanzé commun)
1258	FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPYEQWSDQEIW	1317	Q7JII8		<i>Macaca fascicularis</i> (Macaque crabier)
1258	FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPYEQWSDQEIW	1317	Q7JII7		<i>Macaca fuscata</i> (Macaque Japonais)
1258	FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPYEQWSDQEIW	1317	Q2QL83		<i>Microcebus murinus</i> (Lémur)
1257	FLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQRKAFGVIPQKVFIFSGIFRKNLDPYEQWSDQEIW	1316	Q2IBF6		<i>Gorilla Gorilla</i> (Gorille)

**Figure 26 :** Alignement de séquences d’une partie de la protéine CFTR de plusieurs espèces montrant la conservation de l’acide aminé Asn1303 au cours de l’évolution.

En plus, l’évaluation *in silico* de la mutation a montré un changement conformationnel de la structure tridimensionnelle (**Figure 27**).

### 8.5. Article concernant les études de la mutation c.3909C>G

Cet article (page 114-143) sera soumis lorsque les résultats des expériences de physiologies seront confirmés.



**Figure 27 :** Modélisation avec le programme Swiss-Model du changement conformationnel du NBD2 induit par la mutation p.Asn1303Lys (Mauve). Le Sous domaine alpha est représenté en vert foncé (WT) claire (muté), le sous domaine bêta est en bleu foncé (WT) claire (muté). Wlaker A et B sont représentés en jaune et le *tail* en rouge. La *Loop Q* est en orange.

Probable Phoenician origin of the c.3909C>G mutation and its impact on CFTR protein processing and of its complex allele on splicing

Raëd Farhat<sup>1</sup>, Ayman El-Seedy<sup>1</sup>, Geraldine Puissesseau<sup>1</sup>, Caroline Norez<sup>2</sup>, Marie-Claude Pasquet<sup>1,3</sup>, Catherine Adolphe<sup>4</sup>, Sandra Corbani<sup>5</sup>, André Megrbané<sup>5</sup>, Alain Kitzis<sup>1,3</sup>, Véronique Ladeveze<sup>1</sup>

Affiliation

<sup>1</sup> University of Poitiers, « Génétique Moléculaire de Maladies Rares », Poitiers, France,

<sup>2</sup> University of Poitiers, « Signalisation et Transport Ionique Membranaire », CNRS ERL 7368, Poitiers, France

<sup>3</sup> Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Poitiers, France

<sup>4</sup> University of Poitiers, Poitiers, France

<sup>5</sup> University Saint-Joseph, « Unité de génétique médicale », Faculty of medicine, Beirut, Lebanon

Corresponding and reprint request author: Véronique Ladevèze

Génétique Moléculaire de Maladies Rares

Pôle Biologie Santé - TSA51106

Université de Poitiers, 86073 Poitiers cedex 9, France

TEL: + (33) 5 49 45 49 77

FAX: + (33) 5 49 45 49 72

E-mail: [veronique.ladeveze@univ-poitiers.fr](mailto:veronique.ladeveze@univ-poitiers.fr)

## Abstract

Cystic Fibrosis is the most common recessive autosomal rare disease found in Caucasian. It is caused by mutations on the *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* gene (*CFTR*) that encodes for a protein located on the apical membrane of epithelial cells. c.3909C>G (p.Asn1303Lys) is one of the most common worldwide mutations located in the nucleotide binding domain 2. The c.3909C>G mutation has been found at high frequencies in the Mediterranean countries with the highest frequency in the Lebanese population. Therefore, on the genetic level, we conducted a complete *CFTR* gene screening on c.3909C>G Lebanese patients. The complex allele c.[744-33GATT(6); 869+11C>T] was always associated to the c.3909C>G mutation in cis in the Lebanese population. Splicing studies revealed no impact to the c.3909C>G mutation on splicing, whereas, the associated complex allele induces minor exon 7 skipping. On the protein level, the effect of the p.Asn1303Lys mutation on missprocessing was confirmed by confocal microscopy and western blotting analysis. Its impact on channel activity was assessed by radioactive iodide efflux. Moreover, by comparing the frequencies of the c.3909C>G mutation in the Mediterranean to the Phoenician migrations routes and colonies we hypothesize that the c.3909C>G mutation had arisen in Phoenician, the ancient population of recent Lebanon.

## Introduction

Cystic Fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive genetic disease in Caucasians caused by mutations in the *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (*CFTR*) gene. The prevalence of CF varies from 1/25000 to 1/900 depending on the geographical location (O'sullivan and freedman, 2009 ; Riordan, 2008). The disease is less frequent in the Middle East region than in Europe (Desgeorges *et al.*, 1997; Jonsdottir *et al.*, 2008).

In the Lebanese population, the incidence of both common and rare genetic diseases is relatively high compared to neighbor countries (Desgeorges *et al.*, 1997) due to the existence of several communities and consanguineous marriage. Around 17% of the patients admitted to the Pediatric Service of American University in Beirut during 1961, 1966 and 1971, were found to suffer from a genetically caused or predisposed disorder (Der Kaloustian *et al.*, 1986). Even though the first Arab CF child was detected in Lebanon in 1958 (Salam, 1958), few accurate data was presented during the following years to study this disease in the Lebanese population. However, the mutational *CFTR* spectrum of the Lebanese population was roughly elucidated in two previous studies (Desgeorges *et al.*, 1997; Farra *et al.*, 2010). The major characteristic of this spectrum concerns the c.3909C>G mutation. This widespread mutation appears to have the highest worldwide frequency in Lebanon.

Soon after its identification, the c.3909C>G mutation was characterized by its severity on the pancreas and the variability of the pulmonary status (Osborne *et al.*, 1992). Despite the low effective in the previous studies, almost all c.3909C>G Lebanese CF patients showed severe pancreatic and pulmonary phenotypes (Desgeorges *et al.*, 1997; Farra *et al.*, 2010). The presence of a complex allele may aggravate its clinical outcome (Clain *et al.*, 2001; 2005) and can explain the variability of the CF phenotype in CF c.3909C>G patients.

Furthermore, the c.3909C>G induces a substitution (p.Asn1303Lys) in the Nucleotide Binding Domain 2 (NBD2) that presented, unlike the four other *CFTR* domains, an unessential role in a proper folding and membrane trafficking (Cui *et al.*, 2007). However, mutating this amino acid remarkably disrupts the global *CFTR* conformation (Du and Lukacs, 2009) and the gating activity (Berger *et al.*, 2001; Szollosi *et al.*, 2010). Thus, further investigations may determine the precise impact of the p.Asn1303Lys NBD2 mutation on processing and on the final residual activity if present.

Therefore, to explore the presence of a complex allele, we sequenced *CFTR* genes existing in the geographic region where the c.3909C>G mutation may have first appeared, by recruiting Lebanese c.3909C>G heterozygous and homozygous families. We have detected two variations c.744-33GATT(6) in intron 6 and c.869+11C>T in intron 7 always associated in cis to the c.3909C>G mutation. Therefore, we performed *in cellulo* studies using minigene constructions to determine; firstly the impact of the c.3909C>G mutation on splicing, and secondly that of its associated complex allele c.[744-33GATT(6); 869+11C>T]. We have also studied p.Asn1303Lys-CFTR protein processing and membrane trafficking by comparing our results to previous available data. Finally, we conducted the functionality tests to acquire conclusive evidence considering the reported effects.

## MATERIAL AND METHODS

### DNA extraction from blood samples

The blood samples were collected in EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) from 7 Lebanese Families carrying at least on one allele the c.3909C>G mutation. Genomic DNA were extracted from peripheral blood cells using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) according the manufacturer protocol. The DNA samples were quantified using the Nanodrop 2000 (Thermo).

### DNA amplification

Each of the 27 exons of the *CFTR* gene and their flanking introns were amplified by specific primers. The Pre-PCR reaction (25  $\mu$ L) consisted of 5  $\mu$ L of DNA, 2.5  $\mu$ L of 10X buffer, 2 mmol/L of MgCl<sub>2</sub>, 250  $\mu$ mol/L of each dNTP, 10 pM of specific primers, and 3U Taq polymerase. Pre-PCR was performed using a 9700 GeneAmp Thermo Cycler (Perkin Elmer) with the following cycling conditions: initial denaturation (94°C, 2 min), followed by 30 cycles (94°C, 30 sec; 58°C, 30 sec; 72°C, 30 sec), and a final extension step (72°C, 5 min). To eliminate the excess of primers, a step with the ExoSAP (Affymetrix) was realized (15 min at 37°C). The enzyme was directly degraded at 80°C during 15 min.

### Direct sequencing of the *CFTR* gene

To perform the direct sequencing, PCR reactions were realized on the Pre-PCR product.

Sequencing is realized on the purified products using the ABI PRISM Big Dye Terminator™ cycle sequencing Reading Reaction Kit (Applied Biosystem). PCR was performed with the 25 cycles: initial denaturation (96°C, 10 sec), primers hybridization (44°C, 30 sec), and an extension step (60°C, 4 min). Then, purifications of the product were realized by filtration on DyeEx column (Qiagen) according the manufacturer protocol. Reactions were run on an ABI PRISM™ 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems). The obtained sequences are aligned and compared to the *CFTR* data base sequences (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>).

### Construction of minigene for splicing study

The pTBNdeI plasmid (generously provided by F. Pagani) is a strong support to examine the impact of intronic or/and exonic variations on aberrant splicing in transfected mammalian cells. The genomic DNA region of interest, containing a putative splicing mutation, is introduced into the minigene *via* a unique restriction site (*NdeI*) located in a fibronectin intron. The construction and validation of the hybrid minigene used in this study has been described elsewhere (Pagani *et al.*, 2000).

To evaluate the impact of the c.3909C>G mutation, a PCR fragment, encompassing the 90bp of exon 24 and 100pb of each surrounding introns, was amplified from human genomic DNA (Figure 1a). Another PCR fragment was amplified to study the impact of the c.[744-33GATT(6); 869+11C>T] complex allele. This fragment contains the 126pb of exon 7 and nearly 300pb of each flanking introns (Figure 1a). PCR amplifications of these fragments were realized by specific primers described in Table 1.

After plasmid digestion with the *NdeI* restriction enzyme, PCR products were inserted with the DNALigase (Figure 1b and 1c). Directed mutagenesis using specific primers was performed to obtain the different minigenes (Figure 1c) using the Gene tailor site-directed mutagenesis kit (Invitrogen) and specific primers (Table 1). All hybrid minigene constructs were sequenced to verify the correct insertion of WT and mutated DNA fragments (Table 1).

### Production of *CFTR*-mutated cDNA for protein studies

Wild-Type (WT) or mutated *CFTR* proteins were produced in transfected mammalian cells by the pTCF plasmid (generously provided by P. Fanen). This vector also produces Green Fluorescent Protein (GFP) to visualize the transfected cells. *CFTR* and GFP are produced under

the control of two distinct promoters, CMV and SV40 respectively.

The c.3909C>G plasmid was obtained by directed mutagenesis of the WT plasmid using the Gene tailor site-directed mutagenesis kit (Invitrogen) and specific primers (Table 1). In this study, WT, c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del), and c.3909C>G pTCF plasmids were used. Direct sequencing was realized to verify the correct insertion of the mutation (Table 1).

### Cell culture and transient transfections

HeLa, HT29, and HEK293 cells were grown in DMEM medium with Glutamax-I (Life Technologies) supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco), 100units/mL penicillin and 100µg/mL of streptomycin in a humidified incubator at 37°C in the presence of 5%CO<sub>2</sub>. Cells were transiently transfected by WT and mutant *CFTR* plasmids using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. At least three independent transfections for each cell line were performed for immunolocalisation, Western blotting (WB), and RNA extraction experiments. All three cell lines were used in the mRNA studies; for immunolocalisation and WB analyses, only HeLa and HEK293 cells, were respectively used.

### RT-PCR analyses

Total mRNA was extracted from cell lysates using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) and dissolved in 30µL of sterile water. cDNA synthesis was carried out at 37°C for 1h after adjustment of the mixture to contain 5µL of 5X buffer (Gibco-BRL, France; 250mmol/L of Tris-HCl pH 8.3, 375mmol/L of KCl, 15mmol/L of MgCl<sub>2</sub>), 10mmol/L of dithiothréitol (Gibco-BRL, France), 1mmol/L of dNTPs (Roche Diagnostics, France), 2.4µg of random hexamer primers, 10µL of RNA, 40U RNAGuard (Amersham Biosciences, Orsay, France), and 400U Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase. The reaction medium was made up to 25µL with sterile water and the reaction was stopped by incubation at 100°C for 2 min. The PCR reaction (25µL) consisted of 5µL of cDNA, 2.5µL of 10X buffer, 2mmol/L of MgCl<sub>2</sub>, 250µmol/L of each dNTP, 10pM of specific primers for the cDNA (Table 1), and 3U Taq polymerase. PCRs were performed using a 9700 GeneAmp Thermo Cycler (Perkin Elmer) with the following cycling conditions: initial denaturation (94°C, 2 min), followed by 30 cycles (94°C, 30 sec; 58°C, 30 sec; 72°C, 30 sec), and a final extension step (72°C, 5 min). Amplification products were analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis.

For cDNA obtained from cultured cells, each fragment was purified from a non-denaturing 10% polyacrylamide gel and sequenced with specific primers (Table 1). Using ImageJ program and Kruskal-Wallis test fragment intensity were statistically analysed.

### **Immunolocalisation and confocal microscopy**

Forty-eight hours after transfection, HeLa cells were washed with 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) and fixed with paraformaldehyde 4% in Tris-Buffered Saline (TBS) (20mmol/L Tris base, 50mmol/L NaCl and adjusted pH to 7.2 with HCl) for 10 min at 4°C. Cell permeabilisation was obtained by a Triton X-100 (0.1% in PBS) incubation for 10 min at 4°C. Non-specific sites were saturated by incubation (15 min) in Bovine Serum Albumin (BSA) (3% in PBS). Coverslips were incubated with human anti-CFTR MAB25031 (Invitrogen) (1/400 in 1X PBS) for 1 h at 4°C. After washing with 1X PBS, cells were incubated in the dark with the secondary antibody, conjugated to Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) (1/800 in 1X PBS) (40 min). Cells were washed three times with 1X PBS, and coverslips were mounted with Mowiol (Sigma). Images were obtained using a confocal microscope (Olympus FV100) equipped with a multi-line Argon laser (457nm, 488nm, 515nm; total 30mW) to visualize GFP, and with a HeNe-Green laser (543nm; total 1.5mW) to visualize CFTR.

### **Western Blotting Analysis**

Twenty-four hours after transfection, HEK293 cells were harvested and resuspended in lysis solution (50mmol/L Tris-HCl [pH 7.5], 1mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 1% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors (Roche Diagnostics). Cell lysates were clarified by centrifugation at 15000 g for 10 min at 4°C. Proteins were quantified using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent (Sigma). A volume corresponding to 50µg of proteins was mixed with an equal volume of 2X Laemmli sample buffer (Sigma) and incubated for 20 min at 37°C. Proteins were analysed on a 5% SDS-PAGE (BioRad Laboratories Inc.) and transferred onto nitrocellulose membranes using an iBlot system (Invitrogen) (20V, 7 min). Membranes were first incubated with 5% BSA in TBST (TBS; 0.05% Tween 20) for 2 h at 4°C. The membranes were then washed three times for 5 min in TBST, followed by incubation with primary antibody against CFTR (clone M3A7; Chemicon) (1/2000 in 1X PBS) overnight. After washing three times with TBST, cells were incubated with secondary antibody conjugated to Alexa Fluor® 555

(1:100 in PBS; Invitrogen) for 6 h. The blots were scanned with a Typhoon imager (GE Healthcare) using an excitation laser (532nm) and a 580nm band-pass filter (580 BP 30).

### Functionality tests by Iodide Efflux

CFTR chloride channel activity was evaluated on transfected HeLa cells treated with radioactive iodide ( $^{125}\text{I}$ ) as previously described (Dormer *et al.*, 2001; Norez *et al.*, 2004). The  $^{125}\text{I}$  efflux was realized by the MultiPROBE®IIex robotic liquid handling system (Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France) and measured by the Packard CobraTMII gamma counter (Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France). Statistical analyses and graphic presentations were obtained using the GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software). Sets of data were compared using analysis of variance (ANOVA) or the Student's t test. Values of  $p < 0.05$  were considered as statistically significant: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Non-significant difference was  $p > 0.05$ .

## RESULTS

### CFTR gene sequencing in c.3909C>G patients

The sequencing of *CFTR* 27 exons and their surrounding introns, in the 7 families, confirmed the presence of the c.3909C>G mutation and another mutation in trans, previously determined by the CF30 kit (Elucigene). Furthermore, the sequencing revealed the presence of different other polymorphisms and mutations presented in the table 2. The polymorphism GATT of intron 6 had 6 repeats and the polymorphism c.869+11C>T in intron 7 were present in at least one allele in all the studied patients. The sequencing of exon 7 and part of its surrounding introns of the parental DNA indicated that the GATT(6) and c.869+11C>T polymorphisms are always associated in cis with the c.3909C>G mutation in all the studied patients. Moreover, the allele that does not carry the c.3909C>G mutation has the GATT(7) and no c.869+11C>T polymorphism. Therefore, all the Lebanese patients of this study possess the c.[744-33GATT(6); 869+11C>T; 3903C>G] complex allele.

### No impact of the c.3909C>G mutation on CFTR mRNA normal splicing

The sequencing revealed no length difference between the WT and c.3909C>G cDNA, meaning that the c.3909C>G mutation has no effect on splicing regarding the *in cellulo* analyses

(Figure 2). Results were identical in all of the three independent transfections in the three tested cell lines.

### Splicing study of the associated polymorphisms

Following transient transfections of HeLa, HT29, and HEK293 cells, with the WT (c.[744-33GATT(7); 869+11C]) and mutated (c.[744-33GATT(6); 869+11C>T]) plasmids, mRNA was analysed by RT-PCR and directly sequenced using  $\beta$ -globin-specific primers (Table 1). A polyacrylamide gel was used for more precise separation of the resulting fragments (Figure 3a). Each fragment was isolated and sequenced with specific primers (Table 1) to determine the different mRNA products.

Polyacrylamide gel shows, for each plasmid construction, two fragments: normal splicing with exon 7 (375bp) and exon 7 skipping (249bp). The exon 7 skipping is both present in WT and mutated plasmids. However, in the mutated plasmid the level of exon 7 skipping is slightly higher. The comparison of the fragments intensity (Figure 3b) revealed a significant difference using Kruskal-Wallis test. The sequencing, of the different fragments obtained after their purification from the gel, confirmed that the first fragment represents the normal splicing with the complete exon 7 and the second fragment that of the exon 7 skipping (Figure 3c). This last mRNA is in frame and so induces a shorter fragment than WT-CFTR (-83bp). Surprisingly, in HEK293 cells, another detected transcript is deleted of one nucleotide (Data not shown).

### The p.Asn1303Lys-CFTR protein is miss-processed and retained in the endoplasmic reticulum

Under the experimental conditions, electrophoresis of WT-CFTR produced two bands (Figure 4b). The first was a narrow band of approximately 140 kDa (band B), which represented the core-glycosylated protein located in endoplasmic reticulum (ER); the second was diffuse, with an approximate molecular mass of 170 kDa (band C), and represented mature, fully glycosylated protein that had migrated through the Golgi complex to the cell membrane. For both mutated proteins (p.Asn1303Lys and p.Phe508del), only band B was observed, confirming a retention of these mutated proteins in the ER compartment.

Using confocal microscopy, neither p.Phe508del nor p.Asn1303Lys-CFTR mutants exhibited cell surface staining (Figure 4a) but these proteins were restricted to intracellular

compartments, indicating the presence of a processing defect, unlike WT-CFTR.

### **Depletion of CFTR channel activity of the p.Asn1303Lys protein**

We assessed the effect of Asn1303Lys substitution on the channel activity by iodide efflux. We observed no activity of the mutated protein stimulated by 10  $\mu$ M forskolin and 30  $\mu$ M genistein. The absence of activity was maintained, in these same conditions, even after the treatment of the transfected cells by 10  $\mu$ M VX-809 (Vertex pharmaceuticals) for 24h. This is unlike the p.Phe508del-CFTR that presented a significant activity after the folding correction with VX-809.

## DISCUSSION

### 1) Complex allele identified in the Lebanese population

Since its initial identification, the c.3909C>G mutation presented an unclear phenotype-genotype correlation. While, the first collaborative study has provided conclusive evidences of the c.3909C>G grave consequences on the pancreas, the severity on pulmonary level remained unpredictable in both homozygous and heterozygous states (Osborne *et al.*, 1992). In fact, 100% (61 patients) of c.3909C>G/c.1521\_1523delCTT and c.3909C>G/c.3909C>G have pancreatic insufficiency, while 72% (23/32 patients) of them present sputum colonization of *P. aeruginosa*. In the Lebanese population, also 100% (8/8) of the same category showed pancreatic insufficiency or growth retardation, and 88% (7/8 patients) revealed pulmonary manifestation (Desgeorges *et al.*, 1997; Farra *et al.*, 2010). The variable severity regarding the lung disease in c.3909C>G homozygous and heterozygous patients has been previously related to ethnic variation (Osborne *et al.*, 1992). Environmental factors and/or the presence of a complex allele could modulate the initial consequence of the c.3909C>G mutation. This has leaded us to recruit all the patients where the c.3909C>G mutation has been detected between 2005 and 2011 in the University of Saint-Joseph genetics laboratory. The complete sequencing of *CFTR* 27 exons and their flanking intronic parts, in all the studied patients, revealed the existence of both c.744-33GATT(6) and c.869+11C>T polymorphisms always associated with c.3903C>G mutation (Table 2). Thus, in this study, we have identified in the Lebanese population the c.[744-33GATT(6); 869+11C>T; 3903C>G] complex allele. This complex allele was already detected in different populations (Morral *et al.*, 1996 ; Cordovado *et al.*, 2012).

## 2) Impact of the c.3909C>G complex allele on aberrant splicing

The examined effect on the c.3909C>G mutation denied the predicted aberrant exon 24 splicing (Figure 2). Despite the early identifications of two associated intronic variations, their impacts on splicing have never been assessed yet nor independently neither in association. The GATT polymorphic region, described in 1990 by Horn *et al.*, is located in the 5' flanking region of exon 7 and presents 5 to 7 GATT repeats. The GATT(7) is considered WT since it is the most frequent allele (Gasparini *et al.*, 1991). The c.869+11C>T polymorphism, identified in 1991 by Cuppens *et al.*, occurs in the 3' flanking region of exon 7. In our study, the assessed influence on splicing, using the minigene technic, of the WT complex allele (c.[744-33GATT(7); 869+11C]) and the mutated one (c.[744-33GATT(6); 869+11C>T]) uncovered, a minor alternative exon 7 splicing in both genotype (Figure 3). Therefore, the c.[744-33GATT(6); 869+11C>T; 3903C>G] complex allele seems to have no notable influence on the CF phenotype and it is extremely low to explain the variable clinical outcomes in c.3909C>G patients. However, it is important to note that splicing results differ in function of the cells types. In order to detect the in impact of the complex allele on splicing *in vivo*, it is essential to have nasal epithelial cell of homozygote patients carrying this complex allele.

## 3) Impact of the p.Asn1303Lys mutation of the CFTR protein

The p.Asn1303Lys is the only NBD2 known mutation that disrupts CFTR processing (He *et al.*, 2010) despite the capacity of the cotranslationally (Kleizen *et al.*, 2005) folded protein, lacking of this domain, to escape the ER quality control system (Cui *et al.*, 2007). Indeed, as the protease resistance of the four other folded domains was preserved and the protein maturation is moderately affected after NBD2 truncation, this domain is considered nonessential for the processing but contributes to CFTR stabilization (Du and Lukacs, 2009). However, these facts were not observed in full-length protein baring the p.Asn1303Lys, as this NBD2 mutation has impaired the channel membrane trafficking and induced MSD1 and MSD2 conformational changes (Du and Lukacs, 2009). In this study, p.Asn1303Lys-CFTR processing analyses are consistent with these observations as no glycosylated form was detected (Figure 4). The absence of band C in cell extracts transiently transfected with c.3909C>G mutant was previously reported (Gregory *et al.*, 1991), but is in conflict with He *et al.*, 2010. The choice of cell types as support

of protein biosynthesis and that of antibodies for CFTR detection may have influence on CFTR studies notably in confocal microscopy analyses (van Meegen *et al.*, 2013). However, despite these divergences, our p.Asn1303Lys-CFTR channel activity tests have provided evidence regarding the absence of residual proper functionality (Figure 5). Our results are coherent considering the crucial position and role of the N1303 in the NBD2. This amino acid stabilizes the connection of the ATP to the alpha-phosphate linker by establishing hydrogen bonds (Berger *et al.*, 2001) and forms with two coevolving NBD2 amino acids (p.Phe1296 and p.Arg1358) a triad that undergoes a rearrangement upon ATP binding (Hung *et al.*, 1998; Procko *et al.*, 2006). An hydrogen bond is established between p.Asn1303 and p.Phe1296 when ATP is bound to the protein (Procko *et al.*, 2006), whereas, an hydrogen bond links p.Asn1303 to p.Arg1358 in the ADP-bound form (Szollosi *et al.*, 2010). This switching highlights the fundamental function of the p.Asn1303 amino acid in the NBD2 “induced-fit conformation”. Consequently, a decreased rate of channel opening and closing was detected when mutated p.Asn1303-CFTR are expressed and translocate in low temperature HeLa cells (Berger *et al.*, 2001) or *Xenopus laevis* oocytes membranes (Szollosi *et al.*, 2010). Similar kinetic perturbations emerged in other mutants as p.Asn1303His, p.Asn1303Ile, p.Asn1303Ala and p.Asn1303Lys-CFTR (Berger *et al.*, 2001).

#### 4) Probable Phoenician origin for the c.3909C>G mutation

Lebanon is a small country on the eastern shores of the Mediterranean, covering an area of 10.452km<sup>2</sup>. The history of Lebanon, characterized by flows of different ethnic groups, has enabled the introduction of new genes and a wide variety of genetic diseases. The early development of medical services in Lebanon has facilitated the detection of many inherent disorders. CF figures among the 184 reported genetic diseases of the Lebanese population.

Even though no epidemiological studies were performed to determine the CF incidence in Lebanon, multiple factors advocate that it could be relatively high. 1) The Lebanese *CFTR* mutational spectrum (Desgeorges *et al.*, 1997; Farra *et al.*, 2010) uncovered the major European and minor Arab influences on the Lebanese *CFTR* gene pool. 2) The lack of intra-communities mixing (Dawson and Frossard, 2000) and the consanguineous marriage that has a prevalence of 35.5% especially in the non-Christian communities and suburbs of Beirut (Barbour and Salameh, 2009) tend to extent the incidence of CF in Lebanon. Consanguinity that had historically a higher rate is an essential cause of new CF Lebanese patients. 50% of CF child in Lebanon were issued

from a consanguineous marriage (Desgeorges *et al.*, 1997; Farra *et al.*, 2010). 3) The enumerated CF cases in Arabs along the last two decades had revealed an increasing incidence while ascending from Arab Peninsula to the Mediterranean Sea. An extrapolation to these observations presumes a high incidence in Lebanon regarding to its geographical position.

The *CFTR* mutational spectrum of the Lebanese population was obtained by the studies conducted on 36 alleles in 1997 (Desgeorges *et al.*, 1997) then on 44 alleles in 2000 (Farra *et al.*, 2010). The c.1521\_1523delCTT, c.3909C>G and c.3846G>A (W1282X) account for almost two third of the alleles, in both studies. The c.3909C>G mutation is ranked in the second position (detected in 27% of the 44 alleles) or in the third position (detected in 9.4% of the 36 alleles). The c.3909C>G mutation that is very common in the Mediterranean countries (Figure 6) (Lucotte, 1995; Yilmaz *et al.*, 1995; Federici *et al.*, 2001; Bobadilla *et al.*, 2002; Loumi *et al.*, 2008; Fredj *et al.*, 2009) seems to have the highest frequency in the Lebanese population. Interestingly, the countries and geographic locations that have a high c.3909C>G frequency (Tunisia, Algeria, South Spain, South France, South Italy) were old Phoenician settled colonies or trading posts (Figure 6). Phoenician migration flows from current Lebanon, during the first millennium BCE, may have introduced new genes in these costal Mediterranean cities. Genetic Phoenician markers, described elsewhere (Zalloua *et al.*, 2008), could be typed in worldwide CF-alleles carrying the c.3909C>G mutation to support this hypothesis. Moreover, for tracing the origin of the most common *CFTR* mutations (c.1521\_1523delCTT, c.1624G>T (G542X) and c.3909C>G), several *CFTR* genetic markers have been used (Morral *et al.*, 1993; 1994; 1996; Mateu *et al.*, 2002). The haplotype at *CFTR* markers IVS1CA-J44-GATT-T854-TUB20 was always 21-1-6-1-2 when present with the c.3909C>G mutation as well for the c.1521\_1523delCTT and c.1624G>T mutations (Morral *et al.*, 1996; Mateu *et al.*, 2002). This associated haplotype, that has been also detected in our study, is only present in 1.4% of normal chromosome in actual European (Morral *et al.*, 1996). Thus, it has been postulated that these mutations arose from a none-European population (Morral *et al.*, 1994). Moreover, no population has presented this haplotype in a high enough frequency to be considered at the origin of the three most common mutations (Morral *et al.*, 1996). It is important to note here, that the highest frequency, even not sufficient, was detected in the Druze population of Palestine (Morral *et al.*, 1996). This small community is also settled in Lebanon. Thus, it could consider that a higher frequency might be

detected in the Lebanese population. Therefore, similar studies should be performed on the Lebanese none-CF chromosome.

In conclusion, in this paper many issues concerning the c.3909C>G mutation were highlighted on different levels. 1) On the gene level, we identified in the Lebanese population the complex allele associating the c.3909C>G mutation to the c.869+11C>T polymorphism. 2) On the mRNA level, no aberrant splicing was detected with the c.3909C>G. However, we reported minor exon 7 skipping in both WT (c.[744-33GATT(7); 869+11C]) and mutated complex allele (c.[744-33GATT(6); 869+11C>T]). This is unlikely to explain the observed variable phenotype in c.3909C>G patients despite the higher aberrant splicing in its complex allele. 3) On the protein level, we added new evidences to better assess the impact of c.3909C>G mutation on CFTR. Functionality tests are performed on p.Asn1303Lys mutant and confirmed the total absence of residual activity. 4) We hypothesize that the origin of the c.3909C>G mutation could be Phoenician but no previous studies have been done in Lebanon (recent Phoenicia) to determine the frequency of the associated haplotype in normal *CFTR* chromosomes. Therefore, DNA samples should be sequenced from none-CF Lebanese at the *CFTR*-genetic markers. This, added to sequencing of c.3909C>G alleles in different populations at the Phoenician markers can provide conclusive evidence on the origin or not of the c.3909C>G mutation.

**FUNDING:** This work was supported by Poitiers Hospital and University of Poitiers, France and ABCF2 mucoviscidose, France

**ACKNOWLEDGMENTS:** We thank Dr. Anne Cantereau for her excellent assistance in the use of the confocal laser microscope. This work was supported by “association mucoviscidose: ABCF2”. Raed Farhat received a fellowship from CNRS-Lebanon.

**REFERENCES:**

Al Sheyab F, Ballat SM, Rawashdeh M. Relative Frequencies of Three Cystic Fibrosis Mutations in North Jordan; F508, W1282X, and N1303K. *Int J Hum Genet.* 2007;7(2): 137-140.

Barbour B, Salameh P. Consanguinity in Lebanon: prevalence, distribution and determinants. *J Biosoc Sci.* 2009;41(4):505-17.

Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002;19(6):575-606.

Berger A, Ikuma M, Hunt J, Thomas P, Welsh M. Mutations That Change the Position of the Putative -Phosphate Linker in the Nucleotide Binding Domains of CFTR Alter Channel Gating. *J. Biol. Chem.* Published online November 5, 2001.

Casals T, Ramos MD, Giménez J, Larriba S, Nunes V, Estivill X. High heterogeneity for cystic fibrosis in Spanish families: 75 mutations account for 90% of chromosomes. *Hum Genet.* 1997;101(3):365-70.

Castaldo G, Fuccio A, Cazeneuve C, Picci L, Salvatore D, Raia V, et al. Detection of five rare cystic fibrosis mutations peculiar to Southern Italy: implications in screening for the disease and phenotype characterization for patients with homozygote mutations. *Clin Chem.* 1999;45(7):957-62.

Castaldo G, Rippa E, Sebastio G, Raia V, Ercolini P, de Ritis G, et al. Molecular epidemiology of cystic fibrosis mutations and haplotypes in southern Italy evaluated with an improved semiautomated robotic procedure. *J Med Genet.* 1996;33(6):475-9.

Chillón M, Casals T, Giménez J, Ramos MD, Palacio A, Morral N, et al. Analysis of the CFTR gene confirms the high genetic heterogeneity of the Spanish population: 43 mutations account for only 78% of CF chromosomes. *Hum Genet.* 1994;93(4):447-51.

Clain J, Fritsch J, Lehmann-Che J, Bali M, Arous N, Goossens M, et al. Two mild cystic fibrosis-associated mutations result in severe cystic fibrosis when combined in cis and reveal a residue important for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing and function. *J Biol Chem.* 2001;276(12):9045-9.

Clain J, Lehmann-Che J, Girodon E, Lipecka J, Edelman A, Goossens M, et al. A neutral variant involved in a complex CFTR allele contributes to a severe cystic fibrosis phenotype. *Hum Genet.* 2005;116(6):454-60.

Cordovado SK, Hendrix M, Greene CN, Mochal S, Earley MC, Farrell PM, et al. CFTR mutation analysis and haplotype associations in CF patients. *Mol Genet Metab.* 2012;105(2):249-54.

Cui L, Aleksandrov L, Chang XB, Hou YX, He L, Hegedus T, et al. Domain interdependence in the biosynthetic assembly of CFTR. *J Mol Biol.* 2007;365(4):981-94.

Dawson KP, Frossard PM. Cystic fibrosis in the Middle East: the historical perspective. *Ann Saudi Med.* 2000;20(1):20-3.

Der Kaloustian VM. Genetic diseases in Lebanon. *J Med Liban.* 1986;36(2):65-8.

des Georges M, Guittard C, Altiéri JP, Templin C, Sarles J, Sarda P, et al. High heterogeneity of CFTR mutations and unexpected low incidence of cystic fibrosis in the Mediterranean France. *J Cyst Fibros.* 2004;3(4):265-72.

Desgeorges M, Mégarbané A, Guittard C, Carles S, Loiselet J, Demaille J, et al. Cystic fibrosis in Lebanon: distribution of CFTR mutations among Arab communities. *Hum Genet.* 1997;100(2):279-83.

Dormer RL, Dèrand R, McNeilly CM, Mettey Y, Bulteau-Pignoux L, MÈtayÈ T, et al. Correction of delF508-CFTR activity with benzo(c)quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 22):4073-81.

Du K, Lukacs GL. Cooperative assembly and misfolding of CFTR domains in vivo. *Mol Biol Cell.* 2009;20(7):1903-15.

Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat.* 1997;10(2):135-54.

Farra C, Menassa R, Awwad J, Morel Y, Salameh P, Yazbeck N, et al. Mutational spectrum of cystic fibrosis in the Lebanese population. *J Cyst Fibros.* 2010;9(6):406-10.

Federici S, Iron A, Reboul MP, Desgeorges M, Claustres M, Bremont F, et al. [CFTR gene analysis in 207 patients with cystic fibrosis in southwest France: high frequency of N1303K and 1811+1.6bA>G mutations]. *Arch Pediatr.* 2001;8(2):150-7.

Fredj SH, Messaoud T, Templin C, des Georges M, Fattoum S, Claustres M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutation spectrum in patients with cystic fibrosis in Tunisia. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2009;13(5):577-81.

Gasparini P, Dognini M, Bonizzato A, Pignatti PF, Morral N, Estivill X. A tetranucleotide repeat polymorphism in the cystic fibrosis gene. *Hum Genet.* 1991;86(6):625.

Gregory RJ, Rich DP, Cheng SH, Souza DW, Paul S, Manavalan P, et al. Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide-binding domains 1 and 2. *Mol Cell Biol.* 1991;11(8):3886-93.

He L, Aleksandrov LA, Cui L, Jensen TJ, Nesbitt KL, Riordan JR. Restoration of domain folding and interdomain assembly by second-site suppressors of the DeltaF508 mutation in CFTR. *FASEB J.* 2010;24(8):3103-12.

Hung LW, Wang IX, Nikaido K, Liu PQ, Ames GF, Kim SH. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature.* 1998;396(6712):703-7.

Jonsdottir B, Bergsteinsson H, Baldursson O. [Cystic fibrosis--review]. *Laeknabladid.* 2008;94(12):831-7.

Kanavakis E, Tzetis M, Antoniadis T, Traeger-Synodinos J, Doudounakis S, Adam G, et al. Mutation analysis of ten exons of the CFTR gene in Greek cystic fibrosis patients: characterization of 74.5% of CF alleles including one novel mutation. *Hum Genet.* 1995;96(3):364-6.

Kleizen B, van Vlijmen T, de Jonge HR, Braakman I. Folding of CFTR is predominantly cotranslational. *Mol Cell.* 2005;20(2):277-87.

Loumi O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercot B, Denine R, et al. CFTR mutations in the Algerian population. *J Cyst Fibros.* 2008;7(1):54-9.

Lucotte G, Hazout S. Geographic and ethnic distributions of the more frequent cystic fibrosis mutations in Europe show that a founder effect is apparent for several mutant alleles. *Hum Biol.* 1995;67(4):562-76.

Mateu E, Calafell F, Ramos MD, Casals T, Bertranpetit J. Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified? *Am J Hum Genet.* 2002;70(1):257-64.

Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez J, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet.* 1994;7(2):169-75.

Morral N, Dörk T, Llevadot R, Dziadek V, Mercier B, Férec C, et al. Haplotype analysis of 94 cystic fibrosis mutations with seven polymorphic CFTR DNA markers. *Hum Mutat.* 1996;8(2):149-59.

Morral N, Nunes V, Casals T, Chillón M, Giménez J, Bertranpetit J, et al. Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet.* 1993;2(7):1015-22.

Norez C, Heda GD, Jensen T, Kogan I, Hughes LK, Auzanneau C, et al. Determination of CFTR chloride channel activity and pharmacology using radiotracer flux methods. *J Cyst Fibros.* 2004;3 Suppl 2:119-21.

O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2009;373(9678):1891-904.

Orgad S, Neumann S, Loewenthal R, Netanelov-Shapira I, Gazit E. Prevalence of cystic fibrosis mutations in Israeli Jews. *Genet Test.* 2001;5(1):47-52.

Osborne L, Santis G, Schwarz M, Klinger K, Dörk T, McIntosh I, et al. Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum Genet.* 1992;89(6):653-8.

Pagani F, Buratti E, Stuani C, Romano M, Zuccato E, Niksic M, et al. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. *J Biol Chem.* 2000;275(28):21041-7.

Procko E, Ferrin-O'Connell I, Ng SL, Gaudet R. Distinct structural and functional properties of the ATPase sites in an asymmetric ABC transporter. *Mol Cell*. 2006;24(1):51-62.

Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:701-26.

SALAM MZ. Cystic fibrosis of the pancreas in an oriental child. *Ann Paediatr*. 1958;190(4):252-5.

Szollosi A, Vergani P, Csanády L. Involvement of F1296 and N1303 of CFTR in induced-fit conformational change in response to ATP binding at NBD2. *J Gen Physiol*. 2010;136(4):407-23.

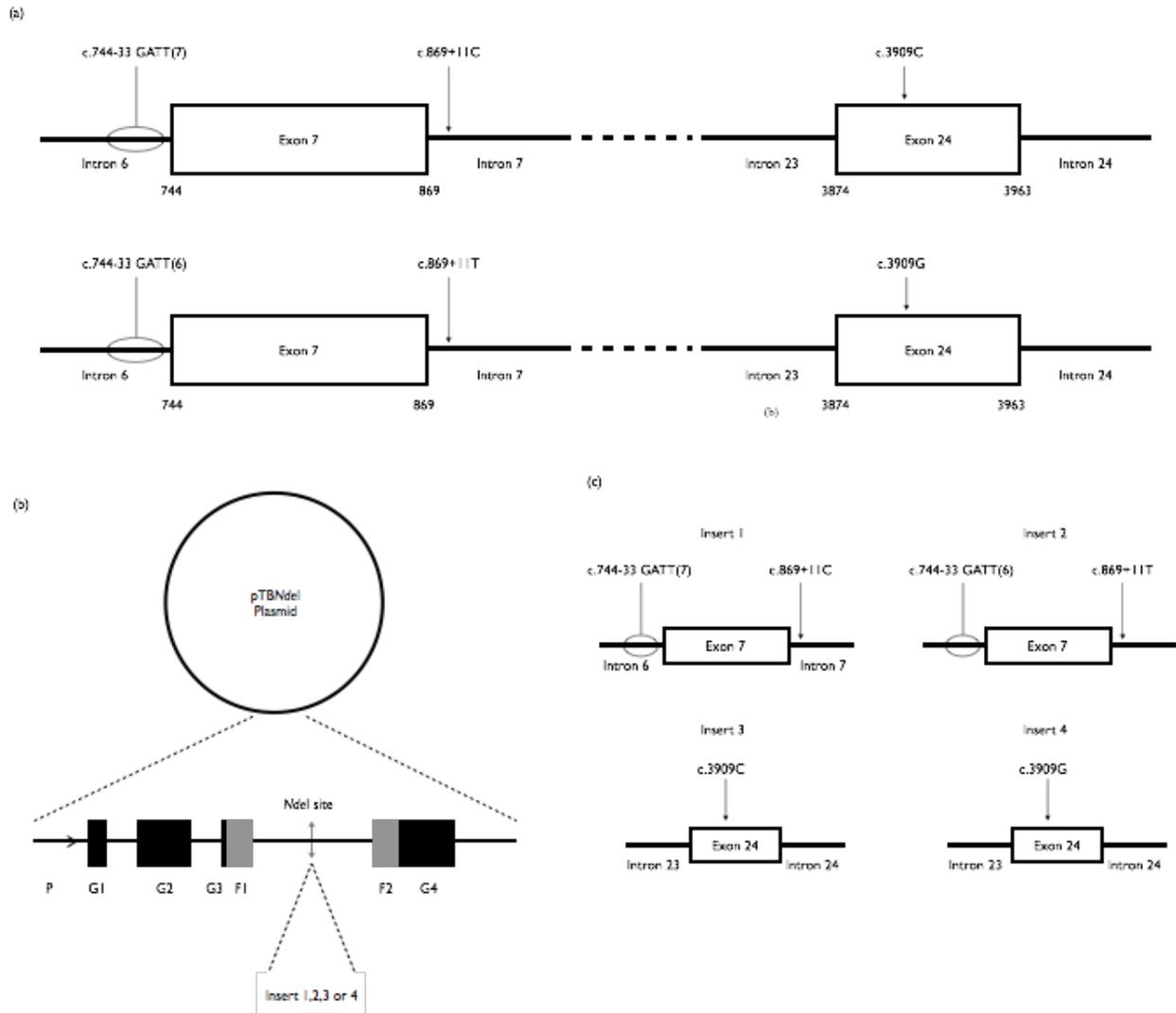
Tzetis M, Kanavakis E, Antoniadis T, Doudounakis S, Adam G, Kattamis C. Characterization of more than 85% of cystic fibrosis alleles in the Greek population, including five novel mutations. *Hum Genet*. 1997;99(1):121-5.

van Meegen MA, Terheggen SW, Koymans KJ, Vijftigschild LA, Dekkers JF, van der Ent CK, et al. CFTR-mutation specific applications of CFTR-directed monoclonal antibodies. *J Cyst Fibros*. 2013;12(5):487-96.

Yilmaz E, Erdem H, Ozgüç M, Coşkun T, Özçelik U, Göçmen A, et al. Study of 12 mutations in Turkish cystic fibrosis patients. *Hum Hered*. 1995;45(3):175-7.

Zalloua PA, Xue Y, Khalife J, Makhoul N, Debiane L, Platt DE, et al. Y-chromosomal diversity in Lebanon is structured by recent historical events. *Am J Hum Genet*. 2008;82(4):873-82.

FIGURES

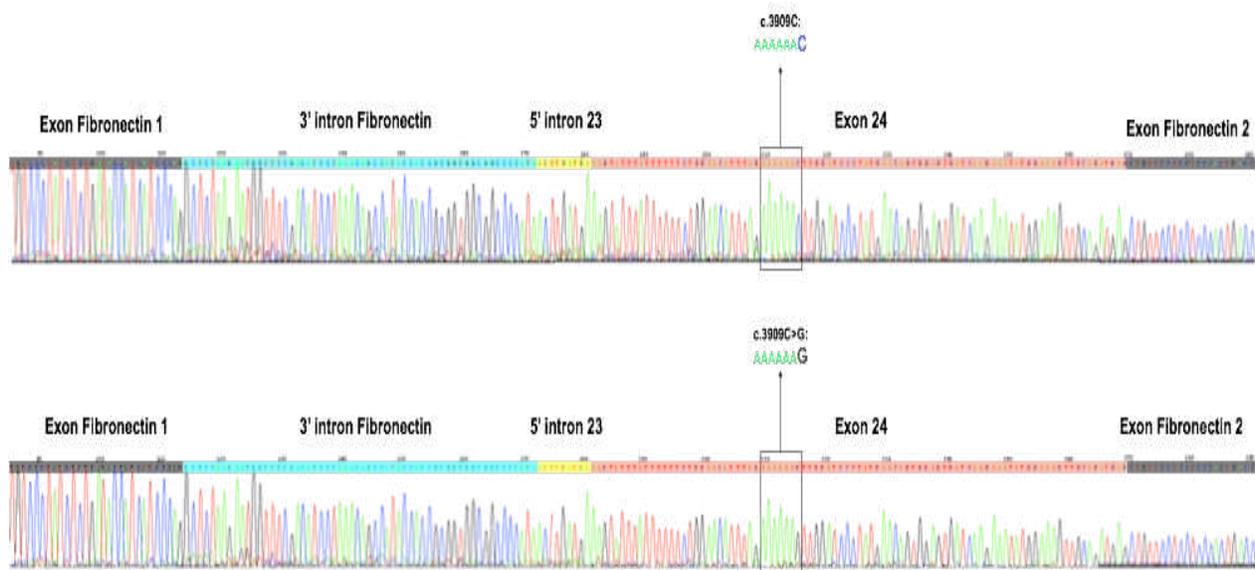


**Figure 1:** Identified complex allele in the Lebanese population and constructions of four minigenes.

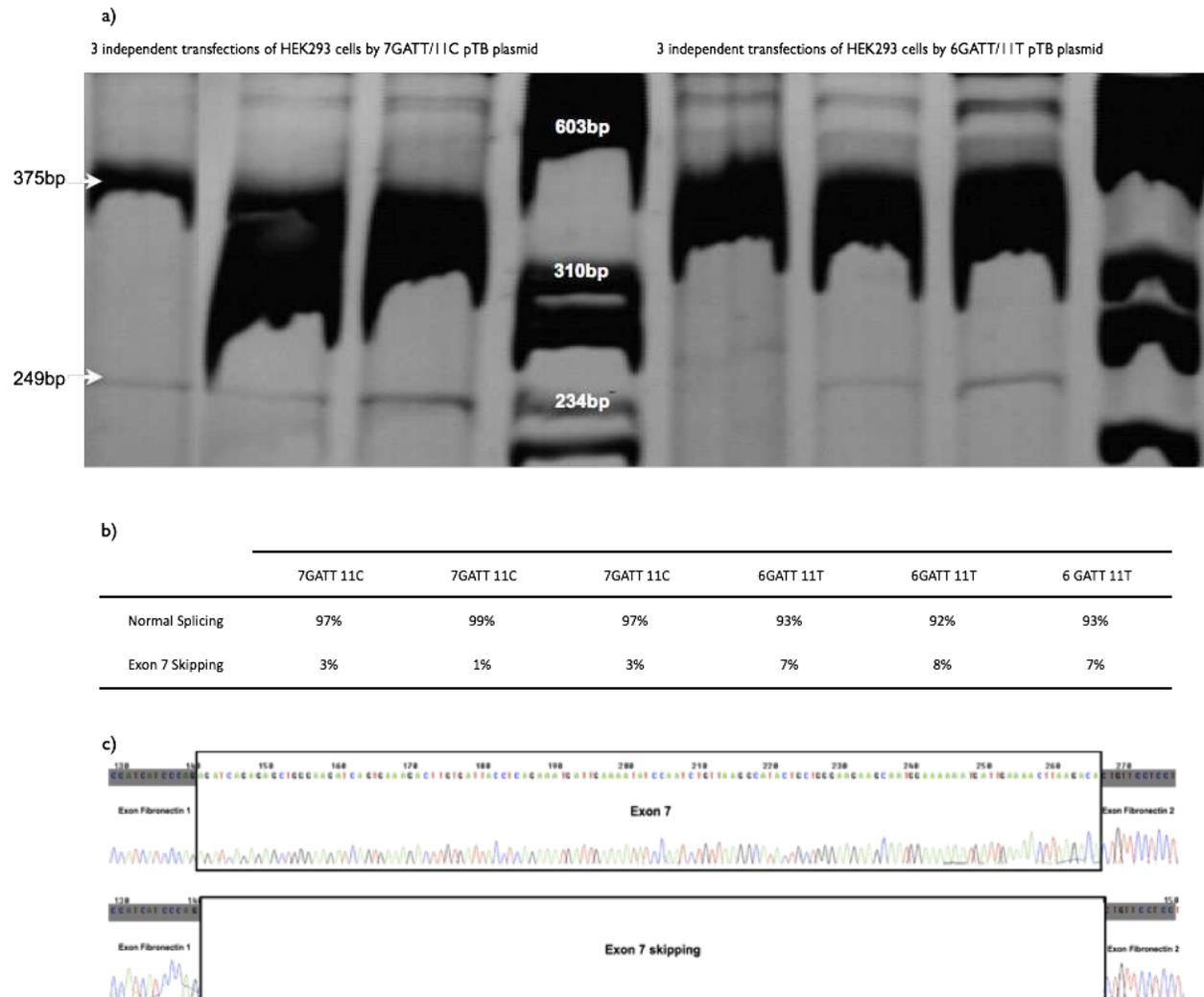
(a) The identified *CFTR* complex allele combining the 744-33GATT(6) polymorphism (intron 6), c.869+11C>T polymorphism (intron 7) and the c.3909C>G mutation (exon 24).

(b) The pTB*NdeI* plasmid used in the hybrid minigene technique. This plasmid contains a reporter gene used to study the mRNA splicing. The reporter gene contains, at the 5' end, a promoter/enhancer sequence indicated by the arrow. This is followed by  $\alpha$ -globin (G1, G2, G3 and G4) and fibronectin (F1 and F2) exons separated by intronic sequences. The fibronectin intronic region, located between F1 and F2, contains a unique *NdeI* restriction site. Fragments of interest can be inserted in this site.

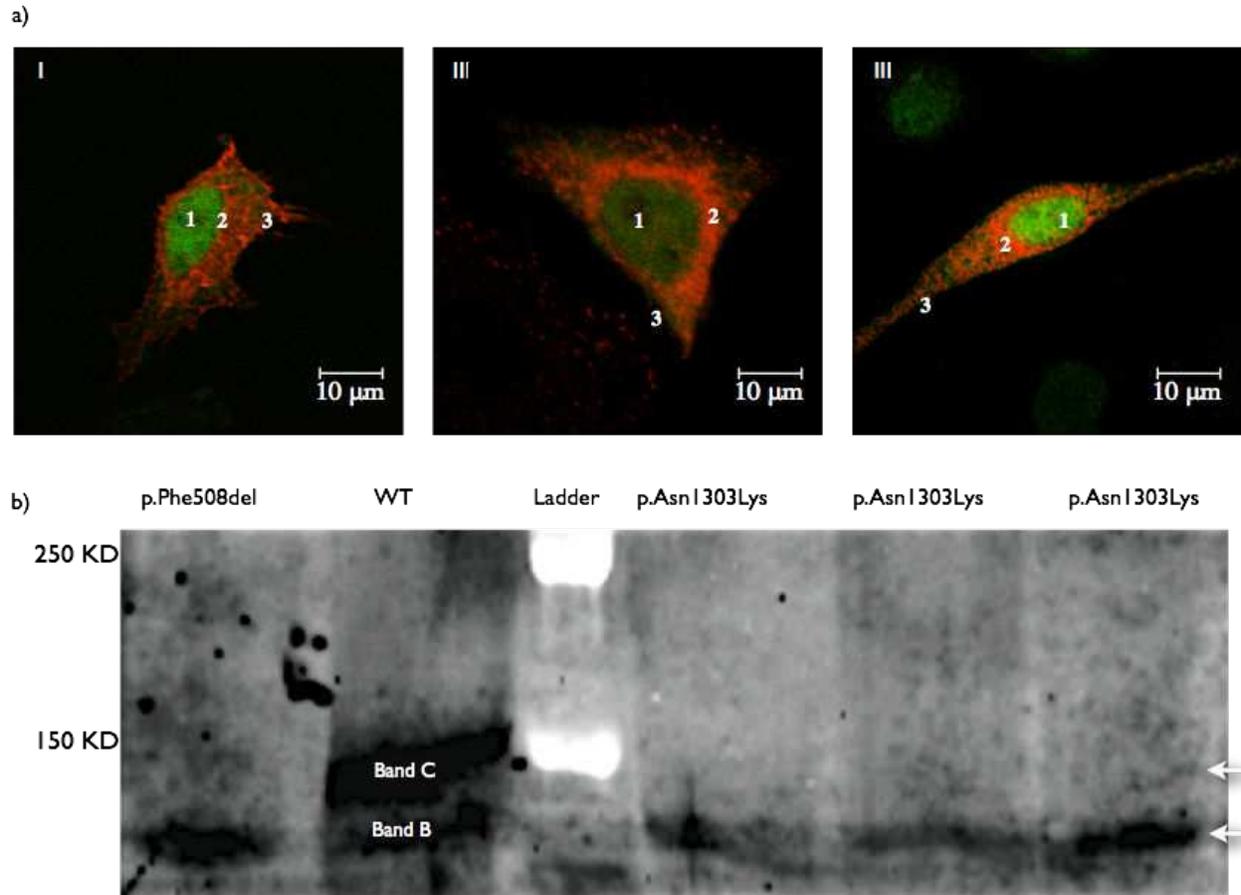
(c) The four inserts used in this study. The impact of the c.[744-33GATT(6); 869+11C>T] complex allele on splicing was evaluated by the use of insert 1 (c.[744-33GATT(7); 869+11C]) and insert 2 (c.[744-33GATT(6); 869+11C>T]). Inserts 1 and 2 contain intron 6 (335 bp), exon 7 (126 bp) and intron 7 (326 bp). The impact of the c.3909C>G mutation on splicing was assessed using inserts 3 (WT) and 4 (c.3909C>G). Inserts 3 and 4 contain intron 23 (100 bp), exon 24 (96 bp) and intron 24 (100 bp). Inserts 1 and 3 are obtained from patients and were inserted in the pTB*NdeI* plasmid. Plasmids containing inserts 2 and 4 were obtained by directed mutagenesis realized on the plasmids containing inserts 1 and 3 respectively.



**Figure 2:** Impact of the c.3909C>G mutation on exon 24 splicing. Sequences of the cDNA were obtained from HeLa cells transfected with the pTB*Nde*I plasmid carrying (a) WT or (b) c.3909C>G exon 24 *CFTR* minigenes. In both plasmids the sequencing reveals the same transcript, excluding an impact of the c.3909C>G mutation on splicing. (The presence of intronic parts in WT and mutated results from plasmid construction and has been detected in the three cell lines).



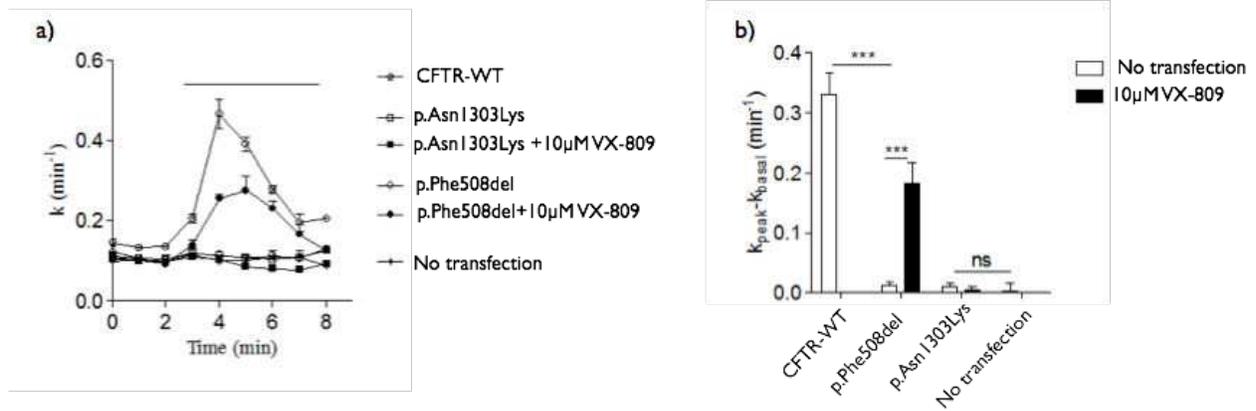
**Figure 3:** Impact of the c.[744-33GATT(6); 869+11C>T] complex allele on splicing (a) Polyacrylamide gel showing, for each plasmid construction, the different fragments of cDNA using 2,3 $\alpha$  and Bra2rev Primers on the total cDNA. This polyacrylamide gel shows three independent transfections of the c.[744-33GATT(7); 869+11C] and c.[744-33GATT(6); 869+11C>T] on HEK293 cells. The same results were obtained in HeLa and HT29 cells (data not shown). Two fragments are visible: normal splicing with exon 7 (375pb) and exon 7 skipping (249pb) (b) Comparison of the fragments intensity using ImageJ program. The differences were statistically significant using Kruskal-Wallis test. (c) Sequencing of the 375pb fragment revealing a normal splicing and that of the 240pb fragment revealing an exon 7 skipping.



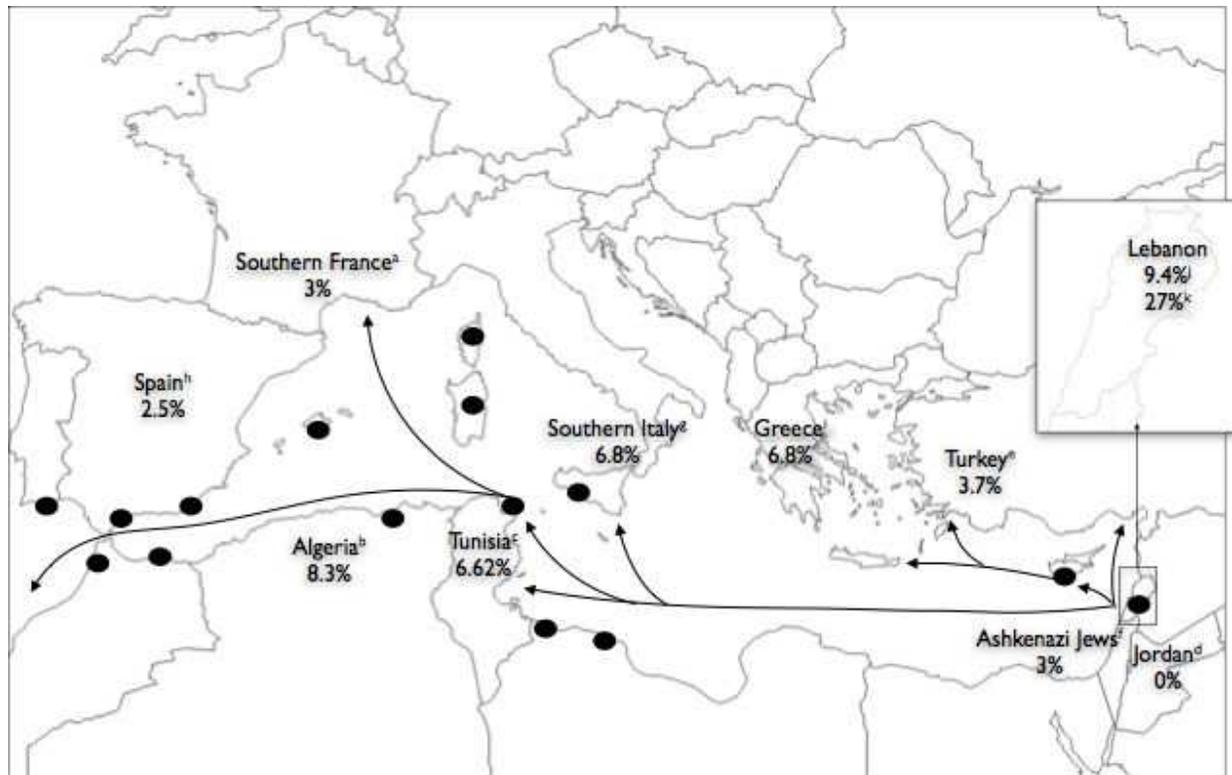
**Figure 4:** Impact of the p.Asnl303Lys mutation on protein processing, localisation and functionality (a) Subcellular localization of WT and mutant CFTR proteins in expressing HeLa cells as assessed by Confocal laser scanning microscopy. The green color results of the auto-fluorescence of the GFP and the red color results of CFTR protein recognized by the Alexa Fluor 555® (Invitrogen). Numbers indicate the nucleus (1), endoplasmic reticulum (2) and cell membrane (3). The mutants p.Phe508del (II) and p.Asnl303Lys (III) mislocalized compared with the WT transfected cells. A mean number of 15 cells were examined in three independent experiments for each CFTR protein analyzed. Scale Bar, 10  $\mu$ m.

(b) Processing of WT and mutant CFTR proteins as assessed by the glycosylation status of the CFTR protein at steady state on Western Blotting. Hek293 cells were transiently transfected with WT, or mutants (p.Phe508del and p.Asnl303Lys). The p.Asnl303Lys proteins were obtained from three independent transfections. CFTR protein was detected by M3A7 (Chemicon), a mouse monoclonal antibody that recognizes an epitope at the C-terminal of CFTR in the region of residues 1370-1380. White arrows on the right indicate the positions of core-glycosylated (band

B) and fully glycosylated (band C) forms of CFTR. Ladder: Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Biorad).



**Figure 5:** Impact of the p.Asn1303Lys CFTR mutation on protein activity. a) Time-dependent stimulation of iodide effluxes in cells transiently transfected by the WT (CFTR-WT), c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del), and c.3909C>G (p.Asn1303Lys) pTCF plasmids. Channel activity was measured in absence then in presence of 10 μM forskolin and 30 μM genistein. The horizontal bar indicates the application of these drugs. Channel activity was also measured in cells treated with 10 μM VX-809 (Vertex pharmaceuticals) for 24h in the same conditions. b) Histogram showing the correspondent activity of each transfection in presence and absence of 10 μM VX-809. \*\*\*p<0.001; ns: non significant.



**Figure 6:** Frequencies of the c.3909C>G mutation in Mediterranean countries and Phoenician migration. The black spots represent the most important Phoenician cities of the Mediterranean region. These cities were Phoenician colonies or trade centres. The arrows are major Phoenician migration and trade routes.

<sup>a</sup>Des Georges *et al.*, 2004 (Study on 215 families), <sup>b</sup>Loumi *et al.*, 2008 (Study on 36 patients), <sup>c</sup>Fredj *et al.*, 2009 (Study on 68 patients), <sup>d</sup>Al Sheyab *et al.*, 2007 (Study on 120 patients), <sup>e</sup>Yilmaz *et al.*, 1995 (Study on 67 patients), <sup>f</sup>Orgad *et al.*, 2001 (Study on 216 patients), <sup>g</sup>Castaldo *et al.*, 1996; 1999 (Studies on 660 chromosomes), <sup>h</sup>Chillón *et al.*, 1994; Casals *et al.*, 1997; Estivill *et al.*, 1997 (Studies on 3608 chromosomes), <sup>i</sup>Kanavakis *et al.*, 1995; Estivill *et al.*, 1997; Tzetis *et al.*, 1997 (Studies on 2097 chromosomes); <sup>j</sup>Desgeorges *et al.*, 1997 (Study on 36 alleles); <sup>k</sup>Farra *et al.*, 2010 (Study on 44 alleles)

**Table 1:** Primers used in amplification and sequencing of studied regions

	Use	Hybridation	Primers
a	Insert preparation containing the WT exon 24	Intron 23/Intron24	5'ACTTGATGGTAAGTACATGG 3'
			5'AGGTATGTTAGGGTACTCCA3'
b	Inserts preparation containing c.[744-33GATT(7);869+11C] or c.[744-33GATT(6);869+11C>T]	Intron 6/Intron 7	5'CCAGATTGCATGCTTACTA3'
			5'AGTTACCAATCAGCCTTCA3'
c	Directed Mutagenesis to introduce the c.3909C>G mutation on the pTB <i>Nde</i> I plasmid containing the WT exon 24 insert	Exon 24	5'TCTGGAACATTTAGAAAAAAGTTGGATCCCT 3'
			5'TTTTTTCTAAATGTTCCAGAAAAAATAAATACTTT 3'
d	Verifying the correct introduction of the inserts in pTB <i>Nde</i> I and the correct realization of the direct mutagenesis	Intron Fibronectin 1/Intron Fibronectin 2	5'ACTTCAGATATTATGTCTAGG3'
			5'CCCATGTGAGATATCTAG3'
e	Sequencing cDNA of cultured cells	Exon Globin 3/Fibronectin 2	5'CAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTGC3'
			5'AGGGTCACCAGGAAGTTGGTTAAATCA 3'
d	Directed Mutagenesis to introduce the c.3909C>G mutation on the pTCF	Exon 24	5'TCTGGAACATTTAGAAAAA[G]TTGGATCCCT3'
			5'TTTTTTCTAAATGTTCCAGAAAAAATAAATACTTT3'
e	Verifying the correct realization of the direct mutagenesis to introduce the c.3909C>G mutation in pTCF	Exon 23/Exon 24	5'CCTTTGGAGTGATACCACA3'
			5'ATCACAGATCTGAGCCCAA3'

**Table 2:** *CFTR* mutations and polymorphisms identified on each allele of c.3909C>G Lebanese patients. \*No DNA were obtained for the patient number 5 parents, thus the association in cis for the TG(m)T(n) was not determined. As the patient is CF the two detected mutations are in trans.

Individual	Allele	Intron 6	Intron 7	Intron 9		Exon 11	Exon 12	Exon 15	Exon 23	Exon 24	Exon 27
1	1	GATT(6)	c.869+11T	TG(10)	T(9)					<b>c.3909C&gt;G</b>	
	2	GATT(6)	c.869+11T	TG(10)	T(9)					<b>c.3909C&gt;G</b>	
2	1	GATT(6)	c.869+11T	TG(10)	T(9)					<b>c.3909C&gt;G</b>	
	2	GATT(7)	c.869+11C	TG(10)	T(7)			c.2562G	<b>c.3846G&gt;A</b>		c.4521A
3	1	GATT(6)	c.869+11T	TG(10)	T(9)					<b>c.3909C&gt;G</b>	
	2	GATT(6)	c.869+11T	TG(10)	T(9)	<b>c.1521 1523delCTT</b>					
4	1	GATT(6)	c.869+11T	TG(10)	T(9)					<b>c.3909C&gt;G</b>	
	2	GATT(6)	c.869+11T	TG(10)	T(9)	<b>c.1521 1523delCTT</b>					
5	1	GATT(6)	c.869+11T	10/11TG						<b>c.3909C&gt;G</b>	
	2	GATT(6)	c.869+11T	9/7T*			<b>c.1647G</b>				
6	1	GATT(6)	c.869+11T	TG(10)	T(9)					<b>c.3909C&gt;G</b>	
	2	GATT(6)	c.869+11T	TG(10)	T(9)	<b>c.1521 1523delCTT</b>					
7	1	GATT(6)	c.869+11T	TG(10)	T(9)					<b>c.3909C&gt;G</b>	
	2	GATT(7)	c.869+11C	TG(11)	T(7)	c.1408G					

8.6. Annexes

Communication affichée au 12<sup>ème</sup> colloque des jeunes chercheurs Français organisé par l'association Vaincre la Mucoviscidose, Paris, France, Avril 2012.

## Étude de la Mutation c.3909C>G du Gène CFTR : Ses Allèles Complexes dans la Population Libanaise et Son Impact sur l'Épissage et la Protéine.

Farhat R.<sup>1</sup>, El-Moussouki K.<sup>1</sup>, Pasquet M.C.<sup>1</sup>, Adolphe C.<sup>1</sup>, Kitzis A.<sup>1</sup>, Ladeveze V.<sup>1</sup> (Institut de Physiologie et de Biologie Cellulaire (IPBC) – Université de Poitiers.)

### Introduction

La mutation c.3909C>G de l'exon 24 du gène *CFTR* conduisant à la substitution d'une Asparagine (Asn) du NBD2 en une Lysine (Lys) est la troisième mutation la plus fréquente après la c.1521\_1523delCTT [CFMUTATION DataBase Statistics].

La fréquence de la mutation varie significativement entre les pays et les groupes ethniques; elle est plus fréquente au sud qu'au nord de l'Europe [Osborne 1992]. Sa fréquence est relativement élevée dans les pays du pourtour de la méditerranée alors qu'elle est presque nulle dans les autres populations [Osborne 1992].

Dans la population libanaise la fréquence décrite varie entre 9.4% [Desgeorges 1997] et 27% [Farras 2010]. Les symptômes liés à cette mutation chez les patients homozygotes c.3909C>G ne sont pas clairement décrits mais semblent être plus sévères au niveau pulmonaire qu'au niveau pulmonaire [Osborne 1992].

Figure 1: Fréquences chromosomiques de la mutation c.3909C>G chez différentes populations. (Osborne et al 1992)

### Objectifs de l'étude

Comme la mutation c.3909C>G est la plus fréquente après la mutation c.1521\_1523delCTT chez la population libanaise, nous avons mené une étude clinique et fondamentale pour décrire et classifier cette mutation.

Au niveau clinique, nous avons lancé une investigation génétique sur 10 patients libanais porteurs de la mutation pour déterminer les allèles complexes chez cette population et essayer de corrélater la mutation à des manifestations cliniques.

Au niveau fondamental, nous visons à comprendre l'impact de cette mutation sur l'épissage des ARNs porteurs de la mutation c.3909C>G et ses effets sur la localisation, la maturation et la fonctionnalité de la protéine CFTR.

### Méthodes

11 patients libanais possédant au moins un allèle portant la mutation c.3909C>G ont été recrutés. Les mutations des patients ont été déterminées dans le laboratoire de génétique de l'Université Saint-Joseph Liban (USJ) à l'aide du kit CF30.

Ces patients représentent la totalité des patients possédant la mutation c.3909C>G ayant été identifiés depuis que le laboratoire de l'USJ a débuté la recherche des mutations du gène *CFTR*.

24 exons sur les 27 du gène et leurs séquences adjacentes ont été séquencés entièrement dans notre laboratoire.

Lorsque des polymorphismes ou des mutations sont détectés en plus de la mutation c.3909C>G, l'étude des parents sera nécessaire afin de déterminer l'existence d'allèles complexes.

### Résultats et discussion

Le séquençage des 11 patients libanais ne révèle pas d'autres mutations sur les 24 exons du gène *CFTR* étudiés à l'heure actuelle. Toutefois, quelques polymorphismes sont présents.

Patients	Exon 8	Exon 11	Exon 12	Exon 15	Exon 23	Exon 24	Exon 27
1	10/10 TG	9/9 T				c.3909C>G	
2	c.742G>A>G	10/10 TG	7/8 T		c.2502T>G	c.3840A>G	c.3909C>G
3	10/10 TG	9/9 T					c.3909C>G
4	10/11 TG	9/7 T				c.1408A>G	c.3909C>G
5	10/11 TG	9/7 T				c.1408A>G	c.3909C>G
6	10/10 TG	9/9 T				c.1921_1523delCTT	c.3909C>G
7	10/11 TG	9/7 T					c.3909C>G
8	10/10 TG	9/9 T				c.1947T>G	c.3909C>G
9	10/11 TG	9/7 T				c.1408A>G	c.3909C>G
10	10/11 TG	9/7 T				c.1408A>G	c.3909C>G
11	10/10 TG	9/9 T				c.1921_1523delCTT	c.3909C>G

Tableau 1: Les mutations (rouge) et les polymorphismes (bleu) de 11 patients libanais. Les exons qui ne sont pas indiqués dans le tableau ne présentent ni de mutations ni de polymorphismes à l'exception des exons 1 et 13 qui ne sont pas encore séquencés. Note: Le patient 1 est homozygote à la mutation c.3909C>G

### L'impact sur l'épissage

L'évaluation de l'impact de la mutation c.3909C>G sur l'épissage alternatif est réalisée en utilisant la technique de Pagani et al (2003). Le plasmide pTB est clivé par l'enzyme de restriction *NdeI* afin d'insérer l'exon 24 et ses séquences adjacentes. Ainsi, deux minigènes ont été créés. Le premier minigène est Wild Type (WT) et le deuxième renferme la mutation c.3909C>G. Des cellules HeLa, HT29 et HEK293 sont transfectées par les plasmides créés. Les ARNs sont extraits après 24, 48 et 72h. Après RT-PCR, les ADNc, amplifiés à l'aide d'un couple d'amorces cernant un fragment de 339 paires de base (pnb) après un épissage normal, sont séquencés.

Figure 2: Plasmide pTB-WT (Dr. Pagani, Université de Trieste) et insert formé de l'exon 24 du gène *CFTR* et de 100 pnb de ses introns adjacents. L'insert est introduit dans le plasmide au niveau du site *NdeI*. Le plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline.

Figure 3: (a) Gel d'agarose montrant des bandes de même taille (339pnb= séquence éeissée normalement et 405pnb=399pnb+62pnb de séquences introniques restantes) suite à la migration des ADNc obtenus après extraction des ARNs des cellules de HeLa et HEK293 transfectées par les plasmides pTB WT et pTB c.3909C>G. (b) Séquences des ADNc montrant des séquences identiques des ARN provenant des cellules HeLa et HEK293 transfectées par les plasmides pTB WT et pTB c.3909C>G.

### L'impact sur la localisation

L'évaluation de l'effet de la mutation c.3909C>G sur la localisation de la protéine CFTR est réalisée par l'utilisation du plasmide pTCF-wt, contenant les 27 exons du gène *CFTR* et un gène codant pour la GFP (green fluorescent protein). La mutation c.3909C>G est insérée par mutagenèse dirigée au niveau de l'exon 24. Des plasmides WT et renfermant la mutation c.1521\_1523delCTT sont aussi utilisés comme témoins. Des cellules HeLa sont transfectées par ces plasmides. Après 24, 48 et 72h, ces cellules sont fixées sur des lamelles et un immunomarcage spécifique à la protéine CFTR est effectué. Les lames sont observées par microscopie confocale.

Figure 4: Plasmide pTCF-WT (Dr. Farnen, CHU Créteil). En rouge: Les 27 exons du gène *CFTR* codant pour une protéine CFTR normale. En Vert: gène de la GFP (Green Fluorescent Protein). Le plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline.

Dans l'étude de la localisation, la comparaison des images de la microscopie confocale des cellules transfectées par les plasmides WT et c.1521\_1523delCTT avec les images des cellules transfectées par le plasmide c.3909C>G montrent que la protéine CFTR mutée n'est pas au niveau membranaire. Ces images indiquent que la mutation c.3909C>G ne peut pas empêcher l'arrivée de la protéine CFTR au niveau membranaire où elle exerce ses fonctions. L'évaluation du degré de la maturation de la protéine CFTR mutée est nécessaire pour soutenir ces résultats.

Figure 5: Images de cellules HeLa obtenues par microscopie confocale. La couleur verte résulte de l'auto fluorescence de la protéine GFP et la couleur rouge résulte de la protéine CFTR marquée par l'anticorps secondaire Alexa Fluor 555. (1) Noyaux, (2) Reticulum Endoplasmique et (3) Membrane cellulaire. (a) Cellule HeLa transfectée par le plasmide pTCF-WT, (b) Cellule HeLa transfectée par le plasmide pTCF-c.1521\_1523delCTT, (c) Cellule HeLa transfectée par le plasmide pTCF-c.3909C>G.

### Conclusion et perspectives

Nos études ont montré que la mutation c.3909C>G n'est pas une mutation d'épissage (classe V) mais elle empêcherait la protéine CFTR d'être localisée au niveau membranaire (classe II). La quantité de protéine CFTR mutée mûre qui arrive au niveau membranaire reste à déterminer par la technique du western blot. Cependant, même si une protéine CFTR mutée atteint la membrane elle pourrait ne pas être fonctionnelle si la mutation c.3909C>G, présente dans le NBD2, touche un site fonctionnel de ce domaine de la protéine. L'évaluation de la fonctionnalité de la protéine est envisagée pour déterminer l'effet de la mutation c.3909C>G sur la fonctionnalité de la protéine CFTR.

### Remerciements:

Dr. Anne Cantereau (Université de Poitiers) et ABCF

### Références

Cystic Fibrosis Mutation DataBase Statistics (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cfr/StatisticsPage.html>) sur <http://www.genet.sickkids.on.ca/cfr/> Consulté le 12 Jun 2008

Desgeorges, M. et al. Cystic Fibrosis in Lebanon: distribution of CFTR mutations among Arab communities. *Hum Genet* 100, 279-283 (1997).

Farras, C. et al. Mutational spectrum of cystic fibrosis in the Lebanese population. *J Cyst Fibros* 9, 406-410, [10.1016/S1526-0900\(00\)00119-8](https://doi.org/10.1016/S1526-0900(00)00119-8)

Osborne, L. et al. Incidence and expression of the H1309K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum Genet* 89, 603-608 (1992).

Communication affichée 36<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Society Conference, Lisbon, Portugal en Juin 2013. Résumé publié dans *Journal of Cystic Fibrosis*, Vol.12 Suppl. 1, June 2013, ISSN 1569-1993, Abstracts of the 36<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Conference, Lisbon, Portugal, 12-15 June 2013.

### Detection Of A Novel Complex Allele c.[869+11C>T;3909C>G] In CFTR Gene

Raed Farhat<sup>1</sup>, Géraldine Puissessau<sup>1</sup>, Marie-Claude Pasquet<sup>1,2</sup>, Catherine Adolphe<sup>3</sup>, André Mégarbané<sup>1</sup>, Alain Kitzis<sup>1,2</sup>, Véronique Ladevèze<sup>1</sup>  
 Basiles Moléculaires de Maladies Rares, Université de Poitiers; <sup>2</sup>Laboratoire de Génétique, CHU de Poitiers; <sup>3</sup>Université de Poitiers, France ; <sup>4</sup>Laboratoire de Génétique, Université St Joseph, Liban

#### Introduction

The c.3909C>G (N1303K) mutation of *CFTR* exon 24 induces a substitution of an Asparagine (Asn) by a Lysine (Lys) in the NBD2 at the protein level. It is considered as the third most frequent mutation after the c.1521\_1523delCTT (F508del) [CFMutation DataBase Statistics].

The frequency of the c.3909C>G mutation varies significantly between countries and ethnic groups; it is more frequent in the south than in the north of Europe [Osborne 1992]. This mutation is relatively more frequent in the countries around the Mediterranean and almost null in other populations [Osborne 1992].

In the Lebanese population, the described frequency varies between 9.4% [Desgeorges 1997] and 27% [Farra 2010]. Symptoms related to this mutation in homozygote patients to c.3909C>G are not clearly described but seems to be more severe at the pancreatic level than the pulmonary level [Osborne 1992].

#### Objectives

We have conducted a clinical and fundamental studies in order to describe and classify this mutation.

**In the clinical study:**

- Genetical investigation on 11 Lebanese patients carrying at least one c.3909C>G mutation on one allele.
- Discovering new complex alleles in this population and to correlate the mutation to its phenotypes.

**In the fundamental study:**

- Determining the impact of the c.3909C>G mutation and its complex allele on splicing at RNA level.
- Studying the effects of this mutation on the localization and maturation on the protein level.

Figure 1: Chromosomal frequency of the c.3909C>G mutations in different populations (Osborne et al 1992)

#### Population Study

Patient	Exon 6	Intron 6	Intron 7	Exon 11	Exon 12	Exon 15	Exon 18	Exon 24	Exon 27
1	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	TGT	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.4202A>G
2	c.1436G>A	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	GGT	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.4202A>G
3	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	GGT	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.4202A>G
4	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	GGT	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.4202A>G
5	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	GGT	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.4202A>G
6	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	GGT	c.1521_1523delCTT	c.1647T>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G
7	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	GGT	c.1521_1523delCTT	c.1647T>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G
8	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	GGT	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G
9	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	GGT	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G
10	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	GGT	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G
11	GATTGG	c.869+11C>T	1010 TG	GGT	c.1521_1523delCTT	c.1647T>G	c.3909C>G	c.3909C>G	c.3909C>G

Table 1: Mutations (Red) and polymorphisms (Blue) of the 11 Lebanese patients. The exons that are not indicated in this table do not present any mutations or polymorphisms. The patient 1 is homozygote to the c.3909C>G mutation.

11 Lebanese patients carrying at least on one allele the c.3909C>G mutation were recruited from the laboratory of genetics in Saint-Joseph University of Beirut-Lebanon.

Direct sequencing was performed on the 27 exons and some parts of their surrounding introns. The results of the sequencing are represented in Table 1.

In all the patients, the 7GATT (intron 6) and c.869+11C>T (intron 7) polymorphisms were revealed. Parental studies associated these two polymorphisms to the c.3909C>G mutation.

**The complex allele c.[860+11T;3909G] is present in all studied Lebanese patients**

#### Effect of c.3909C>G on Splicing

Figure 2: Construction of a minigene by using the pTB plasmid (provided by F. Pagan) and inserting *CFTR* fragment containing Exon 24 and some nucleotides of its adjacent introns. Two variants of the minigene were obtained by inserting sequences obtained from a WT and c.3909C>G patients respectively.

Figure 3: (a) Agarose gels showing the different fragments of cDNA using 2.3a and Bra2rev Primers on the total cDNA obtained after transfection of three cell types (HeLa, HEK293 and HT29) by WT and c.3909C>G plasmid. Three independent transfections were realized in each cell type (data not shown). Two fragments (399bp and 405bp) are detected in all cell types and all plasmid transfection: the 399bp fragment represents the normal splicing (with Exon 24) and the 405bp contains also intronic parts in addition to Exon 24. (b) Sequencing of the WT and c.3909C>G fragments revealing the same splicing. This result indicates that the c.3909C>G mutation does not affect the splicing.

**The c.3909C>G mutation does not induce any Exon 24 Skipping and has no effect on alternative splicing**

#### Effect of c.869+11C>T on Splicing

Figure 4: Construction of a minigene by using the pTB plasmid (provided by F. Pagan) and inserting *CFTR* fragment containing Exon 7 and some nucleotides of its adjacent introns. Two variants of the minigene were obtained. The variants 1 and 2 were obtained by inserting, in the plasmid pTB, sequences obtained from a 7GATT/11C and 6GATT/11T patients respectively.

Figure 5: (a) Polyacrylamide gel showing, for each plasmid construction, the different fragments of cDNA using 2.3a and Bra2rev Primers on the total cDNA. This polyacrylamide gel shows three independent transfections of the 7GATT/11C and 6GATT/11T on HEK293 cells. The same results were obtained in HeLa and HT29 cells (data not shown). Two fragments are visible: normal splicing with exon 7 (373bp) and exon 7 skipping (249bp). (b) Comparison of the fragments intensity. (c) Sequencing of the different fragments obtained after their purification from the gel. The first fragment shows the normal splicing with the complete Exon 7 and the second fragment shows the Exon 7 skipping.

	7GATT/11C	6GATT/11T	7GATT/11C	6GATT/11T	6GATT/11T	6GATT/11T
Normal splicing	37%	33%	33%	33%	33%	33%
Exon 7 skipping	3%	3%	3%	3%	3%	3%

Values are statistically significant using the Kruskal-Wallis test

**The c.869+11C>T increases the Exon 7 Skipping, the GATT polymorphism may be responsible of this effect**

#### Effect of c.3909C>G on Processing

Figure 6: The pTCF plasmid (generously provided by F. Pagan) is a vector designed to produce endogenous CFTR protein and to visualize transfected mammalian cells using Green Fluorescent Protein (GFP). This plasmid contains the *CFTR* complementary DNA (cDNA) under the control of the CMV promoter, while the SV40 promoter controls expression of GFP. In this study WT, c.1521\_1523delCTT (p-Phe084del), and c.3909C>G (p-Asn1303Lys) pTCF plasmids were used. The two mutated plasmids were obtained by directed mutagenesis of the WT.

Figure 7: Processing of WT and mutant CFTR proteins as assessed by the glycosylation status of the CFTR protein at steady state on Western Blot. HEK293 cells were transiently transfected with WT or mutants (p-Phe084del and p-Asn1303Lys). The p-Asn1303Lys proteins were obtained from three independent transfection. CFTR protein was detected by MS27 (Chemicon), a mouse monoclonal antibody that recognizes an epitope at the C-terminus of CFTR in the region of residues 1370-1380. Arrows on the right indicate the positions of core-glycosylated (band B) and fully glycosylated (band C) forms of CFTR. Ladder: C-terminus Plus Protein Kaleidoscope Standards (BioRad).

**The c.3909C>G induces a miss-folding of the protein, its retention in the ER and its absence on the membrane**

#### Conclusions and Perspectives

**c.3909C>G is a class II mutation and c.869+11C>T is a class V mutation**

The Lebanese patients carry the complex allele c.[860+11T;3909G], the presence of this haplotype should be investigated in other populations.

The c.3909C>G mutation is not responsible for alternative splicing but affects the processing of the mutated protein Asn1303Lys and induces its absence on the membrane.

The c.869+11C>T polymorphism increases the Exon 7 skipping already present in WT. This exon 7 skipping could be also induced by the GATT polymorphism located in the intron 6.

Current studies realized in our laboratory investigate the impact of the GATT polymorphism on the exon 7 skipping and evaluate the functionality of the p-Asn1303Lys.

Figure 8: Subcellular localization of WT and mutant CFTR proteins in expressing HeLa cells as assessed by Confocal laser scanning microscopy. The green color results of the auto-fluorescence of the GFP and the red color results of CFTR protein recognized by the Alexa Fluor 555® (Invitrogen). Numbers indicate the nucleus (1), endoplasmic reticulum (2) and cell membrane (3). The mutant p-Phe084del (b) and p-Asn1303Lys (c) mislocalized compared with the WT transfected cells. A mean number of 15 cells were examined in three independent experiments for each CFTR protein analyzed. Scale Bar: 10 µm.

## 9. ETUDE DE LA MUTATION C.965T>C

### 9.1. Contexte des études de la mutation c.965T>C

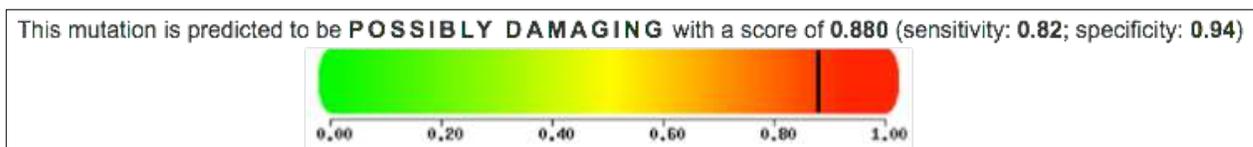
La mutation c.965T>C a été identifiée, pour la première fois, chez un individu issu d'une famille Bretonne présentant une hypertrypsinogénémie néonatale, par Férec *et al.* en 1995. Depuis son identification, aucune étude n'a été effectuée pour évaluer l'effet de cette mutation sur la protéine.

Récemment, une famille, suivie au Centre Hospitalier de Poitiers, ayant un risque sur quatre d'avoir un enfant F508del/c.965T>C a été étudiée. Afin de donner un conseil prénatal avisé, nous avons recherché l'impact possible de la mutation c.965T>C qui affecte le 96ème nucléotide de l'exon 8 composé de 247 nucléotides. Elle induit une substitution de la Valine 322 en une Alanine (p.Val322Ala) au niveau de la 5ème hélice du domaine transmembranaire 1. La substitution d'un acide aminé hydrophobe par un autre acide aminé hydrophobe au niveau du domaine transmembranaire plaide en faveur d'un effet réduit. Cependant, la mutation pourrait être conséquente au niveau protéique dans la mesure où le DTM1 joue un rôle important dans la conduction et la sélectivité des ions. De plus, les principaux éléments de ce domaine sont situés au niveau des hélices 5 et 6 (Devidas et Guggino, 1997 ; Sheppard et Welsh, 1999).

De ce fait, l'impact de la mutation p.Val322Ala a été déterminé au niveau de la localisation, maturation et fonctionnalité.

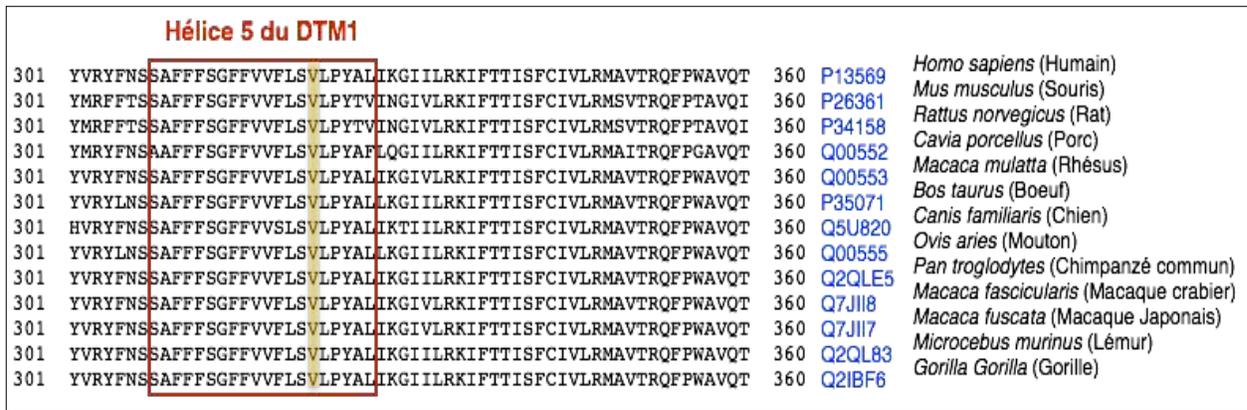
### 9.2. Etude *in silico* de la mutation p.Val322Ala

Le programme PolyPhen-2 indique que la mutation p.Val322Ala est *Possibly Damaging* avec un score de 0.880 sur une échelle de 0 à 1 (**Figure 28**).



**Figure 28** : Prédiction du programme PolyPhen-2 concernant le probable l'effet sévère de la mutation p.Val322Ala sur la protéine CFTR.

De plus, la valine en position 322 est largement conservée chez les espèces (Figure 29) ce qui suggère qu'elle joue un rôle important dans le DTM1.

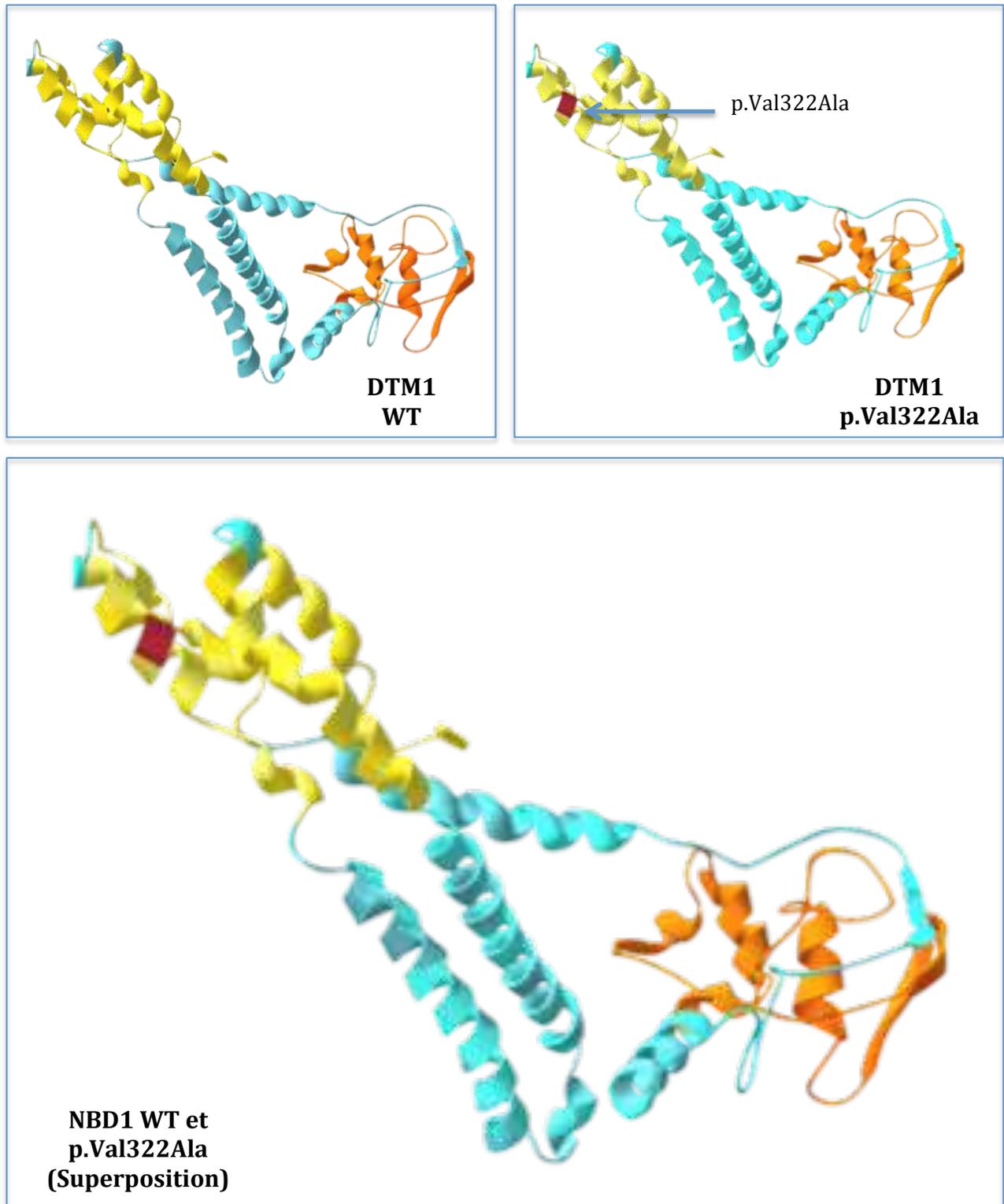


**Figure 29 :** Alignement de séquences d’une partie de la protéine CFTR de plusieurs espèces montrant la conservation évolutive de l’acide aminé Val322.

Cependant, selon le programme informatique Swiss-Model la structure tridimensionnelle de la protéine n’est pas modifiée en présence de la mutation (Figure 30). Devant ces analyses et observations contradictoires, les études biologiques sont nécessaires pour déterminer si la mutation p.Val322Ala conduit à un phénotype sévère ou non.

### 9.3. Article concernant les études de la mutation c.965T>C

Cet article (page 149-162) sera soumis lorsque les résultats des expériences de physiologies seront confirmés.



**Figure 30:** Modélisation avec le programme Swiss-Model du DTM1. La mutation p.Val322Ala est en rouge. Les hélices transmembranaires 3, 4, 5 et 6 sont présentées en jaune. Les Loop entre les hélices sont en bleu et le NBD1 est en orange.

*In cellulo* analyses of impact p.Val322Ala mutation on the CFTR protein in a Brittany family.  
Raëd Farhat<sup>1</sup>, Ayman El-Seedy<sup>1</sup>, Ariestya Indah Permata Sari<sup>1</sup>, Caroline Norez<sup>2</sup>, Marie-Claude Pasquet<sup>1,3</sup>, Catherine Adolphe<sup>4</sup>, Claude Ferec<sup>5</sup>, Alain Kitzis<sup>1,3</sup>, Véronique Ladeveze<sup>1</sup>

#### Affiliation

<sup>1</sup> « Génétique Moléculaire de Maladies Rares », University of Poitiers, Poitiers, France

<sup>2</sup> « Signalisation et Transport Ionique Membranaire », CNRS ERL 7368, University of Poitiers, Poitiers, France

<sup>3</sup> Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Poitiers, France

<sup>4</sup> University of Poitiers, Poitiers, France

<sup>5</sup> Inserm U1078 Génétique, Génomique et Biotechnologies de Brest, Université de Bretagne Occidentale

Corresponding and reprint request author: Véronique Ladevèze

Génétique Moléculaire de Maladies Rares

Pôle Biologie Santé - TSA51106

Université de Poitiers, 86073 Poitiers cedex 9, France

TEL: + (33) 5 49 45 49 77

FAX: + (33) 5 49 45 49 72

E-mail: [veronique.ladeveze@univ-poitiers.fr](mailto:veronique.ladeveze@univ-poitiers.fr)

## ABSTRACT

Cystic Fibrosis is caused by mutation on the *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* gene (*CFTR*). Exonic mutations may have variable effect on the CFTR protein and may alter the normal localization of CFTR on apical membrane of epithelial cells or/and its function as chloride channel. Identifying the proper effect of a missense mutation is essential to provide adequate medical counselling and adapted therapeutic strategies. In this study, the effect of the c.965T>C exon 8 mutation that induces a valine to alanine substitution (p.Val322Ala) into the fifth helix of the first transmembrane domain was determined by *in silico* and *in cellulo* analyses. The western blotting, the confocal microscopy analyses and functionality test showed no impact of this mutation on the proper function of the p.Val322Ala-CFTR protein.

## INTRODUCTION

Cystic Fibrosis (CF) is the most frequent autosomal recessive genetic rare disease in the western world (Farrell; 2000). Mutations of the *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)* gene are the cause of CF. After the discovery of the gene in 1989 (Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989), more than 1960 mutations have been identified. The c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del) represents two-third of the *CFTR* mutated alleles, whereas, the other mutations are private or limited to a small number of individual (Bobadilla *et al.*, 2002).

Six classes have been established (Welsh and Smith, 1993; Zielenski and Tsui, 1995) to categorize the *CFTR* mutations according to their impacts on mRNA synthesis (class I), splicing (class V), on protein processing (class II), stability (class VI) or functionality (class III and IV). Therefore, the classification of each newly identified mutation is from great importance to give proper genotype-phenotype correlation and genetic counselling and to tailor new drug strategies.

Among the *CFTR* identified mutations, 40% are missense and lead to amino acid substitutions in one of the five *CFTR* domains. The *CFTR* protein is a multi-domain chloride channel composed of a two Membrane Spanning Domains (MSD1 and MSD2), two Nucleotide Binding Domains (NBD1 and NBD2) and a regulatory domain (Riordan *et al.*, 1989). The acquisition of a functional channel requires the coordinated folding and assembly of the *CFTR* domains (Du *et al.*, 2005; Riordan, 2005; Cui *et al.*, 2007). Depending on the substitution localization in the *CFTR* domains, a missense mutation may dramatically alter the proper folding and/or functionality and induce a CF disease or CF-related disorder (*CFTR*-RD).

In this study, the c.965T>C (p.Val322Ala) *CFTR* rare missense mutation has been studied for the first time after its identification in 1995 in French family (Brittany) (Ferec *et al.*, 1995). This exon 8 mutation induces a substitution of the valine322 into alanine at the fifth helix of the first transmembrane domain (TMD1). Recently, the c.965T>C mutation has been detected in a Brittany family that has one risk over four to have a child carrying this mutation in trans with the c.1521\_1523delCTT mutation. Therefore, studying the impact(s) of the c.965T>C mutation is essential for a prenatal genetic counselling.

In this article, *in cellulo* studies showed that the c.965T>C mutation has no effect on the processing, localization and functionality of the p.Val322Ala *CFTR* protein.

## MATERIAL AND METHODS

### Construction of *CFTR*-mutated cDNA for protein studies

To produce Wild-Type (WT) or mutated CFTR proteins in mammalian cultured cells, the pTCF plasmid (generously provided by Dr. Pascale Fanen) was used. This vector is also designed to visualise transfected cells by the expression of Green Fluorescent Protein (GFP). The transcription and the processing of CFTR and GFP are independent since they are controlled by two distinct promoters; CMV and SV40 respectively.

In this study, WT, c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del), and c.965T>C (p.Val322Ala) pTCF plasmids were used. Mutated pTCF were obtained by direct mutagenesis realized on the WT plasmid, using the Gene tailer site-directed mutagenesis kit (Invitrogen) and specific primers (5'CTTTGTGGTGTGTTTTATCTG[C]GCTTCCCTAT3' and 5'CTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTGTTTTATCTG3'). The presence of the desired mutation was controlled through plasmid sequencing using the ABI PRISM Big Dye Terminator™ Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) and specific primers (5'GATTGAAAACCTTAAGACAAACAG3' and 5'CATGGCGGTCACCTCGGC3'). Reactions were run on an ABI PRISM™ 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems).

### Cell culture and transient transfections

None expressing endogenous CFTR cultured mammalian cells were used. HeLa and HEK293 were transiently transfected by WT and mutated pTCF using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Both cell lines were cultured in DMEM medium with Glutamax-I (Life Technologies) supplemented with 10% foetal bovine serum (Gibco), 100units/mL penicillin and 100µg/mL of streptomycin in a humidified incubator at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. Three independent transfections were performed for immunolocalisation, western blotting (WB) and functionality tests.

### Immunolocalisation and confocal microscopy

24 hours after transfection, HeLa cells were washed with 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) and fixed with paraformaldehyde 4% in Tris-Buffered Saline (TBS) (20mmol/L Tris base, 50mmol/L NaCl and adjusted pH to 7.2 with HCl) for 10 min at 4°C. Cell permeabilisation was obtained by a Triton X-100 (0.1% in PBS) incubation for 10 min at 4°C. Non-specific sites were saturated by incubation (15 min) in Bovine Serum Albumin (BSA) (3% in PBS). Coverslips were

incubated with human anti-CFTR MAB25031 (Invitrogen) (1/400 in 1X PBS) for 1 h at 4°C. After washing with 1X PBS, cells were incubated in the dark with the secondary antibody, conjugated to Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) (1/800 in 1X PBS) (40 min). Cells were washed three times with 1X PBS, and coverslips were mounted with Mowiol (Sigma). Images were obtained using a confocal microscope (Olympus FV100) equipped with a multi-line Argon laser (457nm, 488nm, 515nm; total 30mW) to visualize GFP, and with a HeNe-Green laser (543nm; total 1.5mW) to visualize CFTR.

### Western Blotting Analysis

48 hours after transfection, HEK293 cells were harvested and resuspended in lysis solution (50mmol/L Tris-HCl [pH 7.5], 1mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 1% Triton X-100) supplemented with protease inhibitors (Roche Diagnostics). Cell lysates were clarified by centrifugation at 15,000 g for 10 min at 4°C. Proteins were quantified using the bicinchoninic acid (BCA) protein assay reagent (Sigma). A volume corresponding to 50µg of proteins was mixed with an equal volume of 2X Laemmli sample buffer (Sigma) and incubated for 20 min at 37°C. Proteins were analysed on a 5% SDS-PAGE (BioRad Laboratories Inc.) and transferred onto nitrocellulose membranes using an iBlot system (Invitrogen) (20V, 7 min). Membranes were first incubated with 5% BSA in TBST (TBS; 0.05% Tween 20) for 2 h at 4°C. The membranes were then washed three times for 5 min in TBST, followed by incubation with primary antibody against CFTR (clone M3A7; Chemicon) (1/2000 in 1X PBS) overnight. Membranes were then washed three times with TBST and incubated with secondary antibody conjugated to Alexa Fluor® 555 (1:100 in PBS; Invitrogen) for 6 h. After further washing in TBST, the blots were scanned with a Typhoon imager (GE Healthcare) using an excitation laser (532nm) and a 580nm band-pass filter (580 BP 30).

### Functionality tests by Iodide Efflux

CFTR chloride channel activity was evaluated on transfected HeLa cells treated with radioactive iodide (<sup>125</sup>I) as previously described (Dormer *et al.*, 2001; Norez *et al.*, 2004). The <sup>125</sup>I efflux was realized by the MultiPROBE®IIex robotic liquid handling system (Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France) and measured by the Packard CobraTMII gamma counter (Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France). Statistical analyses and graphic presentations were

obtained using the GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software). Sets of data were compared using analysis of variance (ANOVA) or the Student's t test. Values of  $p < 0.05$  were considered as statistically significant: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Non-significant difference was  $p > 0.05$ . In the functionality tests the pTCF-WT is used as positive control and pTCF-c.1392G>T is used as a negative control instead of the pTCF- c.1521\_1523delCTT as it has been demonstrated that the c.1392G>T mutation is a class II mutation (Farhat *et al.*).

## RESULTS

### Proper folding and processing of the p.Val322Ala CFTR protein in the ER

To evaluate the effect of the c.965T>C mutation (p.Val322Ala) on the protein maturation and processing, western blotting technics was used on HEK293 cells that had been transiently transfected with WT and mutated (p.Phe508del and p.Val322Ala) pTCF.

The matured and non-matured proteins were separated by gel electrophoresis. WT-CFTR gel separation presents two bands (Figure 1a). The first is a band of approximately 140 kDa (band B), which represents the core-glycosylated protein located in ER, and the second is a band of approximate 170 kDa (band C), and represented mature, fully glycosylated protein that had migrated through the Golgi complex to the cell membrane.

For both WT and p.Val322Ala proteins, the bands B and C were observed, confirming a correct processing of the CFTR mutated protein. The band C is not observable for the p.Phe508del protein which is a class II mutation and does not have an ER maturation.

### The p.Val322Ala CFTR protein is correctly localized on cell membrane

To evaluate the effect of the c.965T>C mutation (p.Val322Ala) on the protein localization, immunolocalization technics was used on HeLa cells that had been transiently transfected with WT and mutated (p.Phe508del and p.Val322Ala) pTCF.

The proteins cellular localization was determined by confocal microscopy. Both of the WT and p.Val322Ala CFTR exhibited cell surface staining (Figure 1b), whereas the p.Phe508del CFTR was retained in the endoplasmic reticulum (ER). These experiments indicate that the mutated p.Val322Ala protein is correctly localized at the cell membrane.

### Normal functionality of the p.Val322Ala CFTR protein

We assessed the effect of Val322Ala substitution on the channel activity by iodide efflux. We observed normal activity of the mutated protein stimulated by 10 $\mu$ M forskolin and 30 $\mu$ M genistein. The normal activity was maintained, in these same conditions, after the treatment of the transfected cells by 10 $\mu$ M VX-809 (Vertex pharmaceuticals) for 24h.

## DISCUSSION

The expected alterations of a *CFTR* mutation could vary from a total absence of the protein on the apical surface of epithelial cells to a reduction in the channel activity. The mutation might also have no notable consequences and consider as a polymorphism. Therefore, understanding the possible effect of a *CFTR* mutation is essential to classify it in one or more of the six established classes, or to consider it as a simple polymorphism.

In this paper, the c.965T>C mutation was studied to evaluate the potential alteration(s) of the mutated CFTR. The highly conserved Valine322 amino acid during evolution hypothesizes that its substitution may induce major consequences on protein processing and functionality. However, the substitution of this linear none polar hydrophobic amino acid by a residue that has the same characteristics, alanine, may reduce the impact of the mutation. Nevertheless, this valine322 is subject to another silent amino acid substitution by a methionine due to the c.964G>A mutation. The presence of this mutation in a CF patient highlights on the importance of the conserved valine at this position (Maréchal *et al.*, 2001). The *in silico* program indicates that the c.965T>C is “possibly damaging” by attributing a score of 0.88 over 1 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Four other valine to alanine substitution are already reported in different CFTR domains. The p.Val317Ala mutation is located in the fifth helix of the first TMD1 like the p.Val322Ala mutation. This mutation was identified through neonatal screening for hypertrypsinemia (Ferec *et al.*, 1995), indicating a potential impact on the CF phenotype. However, no protein studies have been conducted to determine the cellular consequences of the substitution. The other mutations are located in the intracellular loop linking the sixth helix of the TMD1 to the NBD1 (p.Val392Ala), in the NBD1 (p.Val456Ala) and NBD2 (p.Val1318Ala). For these mutations, the clinical effects vary from CBAVD with pancreatic sufficiency to a pulmonary infection (<http://www.genet.sickkids.on.ca/app>). Regarding these speculations, *in cellulo* analyses are required in order to give an accurate genetic prenatal

counseling to a French parents having one possibility over four to have a child carrying the c.1521\_1523delCTT and c.965T>C in trans.

The proper folding of the CFTR is essential to pass to the ER quality control system (ERQC) (Skach, 2000) and to engage the COPII vesicle machinery that ensures the transport to the membrane (Kopito, 1999; Wang *et al.*, 2004). The cotranslational formation of a partial CFTR (TMD1, NBD1, R-domain and TMD2) is sufficient to start the membrane translocation (Cui *et al.*, 2007). Interaction between the TMD1 and TMD2 is a major stage for obtaining the trafficable structure (Rosser *et al.*, 2004) and this is highlighted by a high number of disease causing mutations found in the TMDs. Almost 300 mutations among the identified missense CF-causing mutation are localized in these domains (Cheung and Deber, 2008). The position of the Val322Ala substitution may disturb this TMDs crucial interaction. Therefore, the processing of the p.Val322Ala CFTR protein was evaluated by western blotting analyses. A fully glycosylated band was observed as for the WT protein. The immunolocalization images obtained by confocal microscopy confirmed the correct processing of the mutated protein by showing cell membrane staining and not an ER staining like for the c.1521\_1523delCTT mutation. Therefore, the amino acid substitution seems to avoid conformational changes inducing a normal folding and processing of the mutated protein from the endoplasmic reticulum to the cell membrane. However, essential elements ensuring a correct channel activity are located in the helices 5 and 6 (Devidas and Guggino, 1997; Sheppard and Welsh, 1999). Our channel activity test revealed a normal chloride transport across CFTR, indicating no influence of the Val322Ala amino acid substitution on the protein functionality.

These results demonstrate that the Brittany c.965T>C mutation is a polymorphism, and induces neither CF nor CFTR-RD.

**FUNDING:** This work was supported by Poitiers Hospital and University of Poitiers, France and ABCF2 mucoviscidose, France

**ACKNOWLEDGMENTS:** We thank Dr. Anne Cantereau for her excellent assistance in the use of the confocal laser microscope. This work was supported by “association mucoviscidose: ABCF2”. Raed Farhat received a fellowship from CNRS-Lebanon.

**REFERNCES:**

Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002;19(6):575-606.

Cheung JC, Deber CM. Misfolding of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and disease. *Biochemistry.* 2008;47(6):1465-73.

Cui L, Aleksandrov L, Chang XB, Hou YX, He L, Hegedus T, et al. Domain interdependence in the biosynthetic assembly of CFTR. *J Mol Biol.* 2007;365(4):981-94.

Devidas S, Guggino WB. CFTR: domains, structure, and function. *J Bioenerg Biomembr.* 1997;29(5):443-51.

Dormer RL, Dèrand R, McNeilly CM, Mettey Y, Bulteau-Pignoux L, MÈtayÈ T, et al. Correction of delF508-CFTR activity with benzo(c)quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 22):4073-81.

Du K, Sharma M, Lukacs GL. The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(1):17-25.

Farhat R, El-Seedy A, El-Moussaoui K, Pasquet MC, Adolphe C, Bieth E, Languépin J, Sermet-Gaudelus I, Kitzis A, Ladevèze V. Multi-physiopathological consequences of the c.1392G>T CFTR mutation revealed by clinical and cellular investigations.

Farrell PM. Improving the health of patients with cystic fibrosis through newborn screening. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. *Adv Pediatr.* 2000;47:79-115.

Fèrec C, Verlingue C, Parent P, Morin JF, Codet JP, Rault G, et al. Neonatal screening for

cystic fibrosis: result of a pilot study using both immunoreactive trypsinogen and cystic fibrosis gene mutation analyses. *Hum Genet.* 1995;96(5):542-8.

Kopito RR. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev.* 1999;79(1 Suppl):S167-73.

Le Marèchal C, Audrèzet MP, Quèrè I, Ragueènès O, Langonneè S, Fèrec C. Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counselling. *Hum Genet.* 2001;108(4):290-8.

Norez C, Heda GD, Jensen T, Kogan I, Hughes LK, Auzanneau C, et al. Determination of CFTR chloride channel activity and pharmacology using radiotracer flux methods. *J Cyst Fibros.* 2004;3 Suppl 2:119-21.

Riordan JR. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:701-18.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989;245(4922):1066-73.

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989;245(4922):1059-65.

Rosser MF, Grove DE, Chen L, Cyr DM. Assembly and misassembly of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: folding defects caused by deletion of F508 occur before and after the calnexin-dependent association of membrane spanning domain (MSD) 1 and MSD2. *Mol Biol Cell.* 2008;19(11):4570-9.

Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 1999;79(1 Suppl):S23-45.

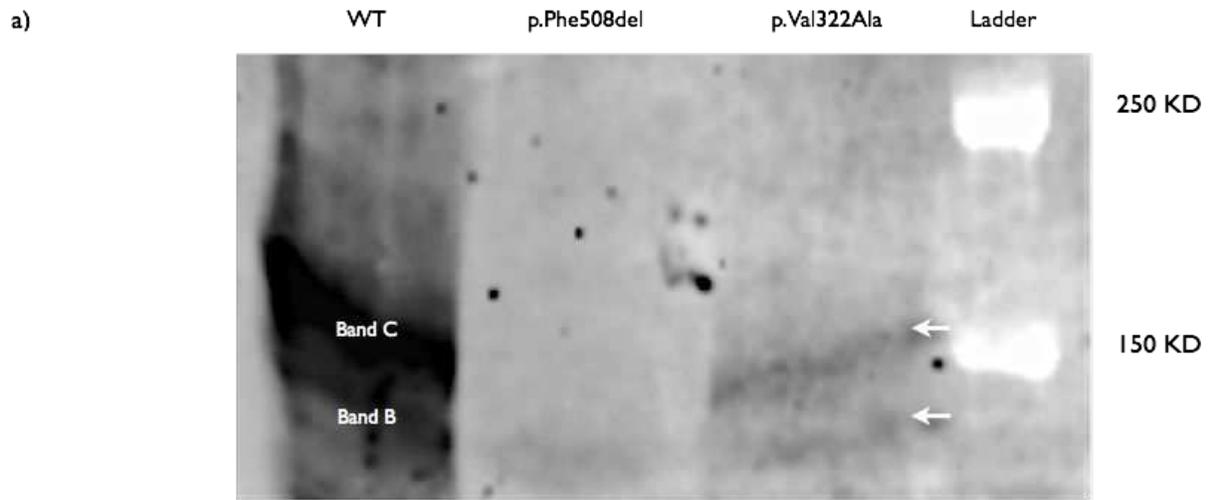
Skach WR. Defects in processing and trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Kidney Int.* 2000;57(3):825-31.

Wang X, Matteson J, An Y, Moyer B, Yoo JS, Bannykh S, et al. COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J Cell Biol.* 2004;167(1):65-74.

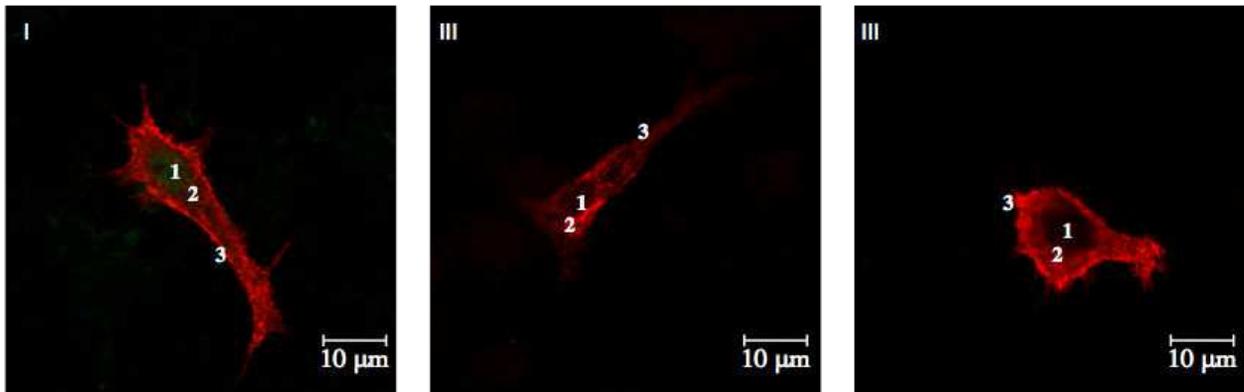
Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993;73(7):1251-4.

Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet.* 1995;29:777-807.

## FIGURES



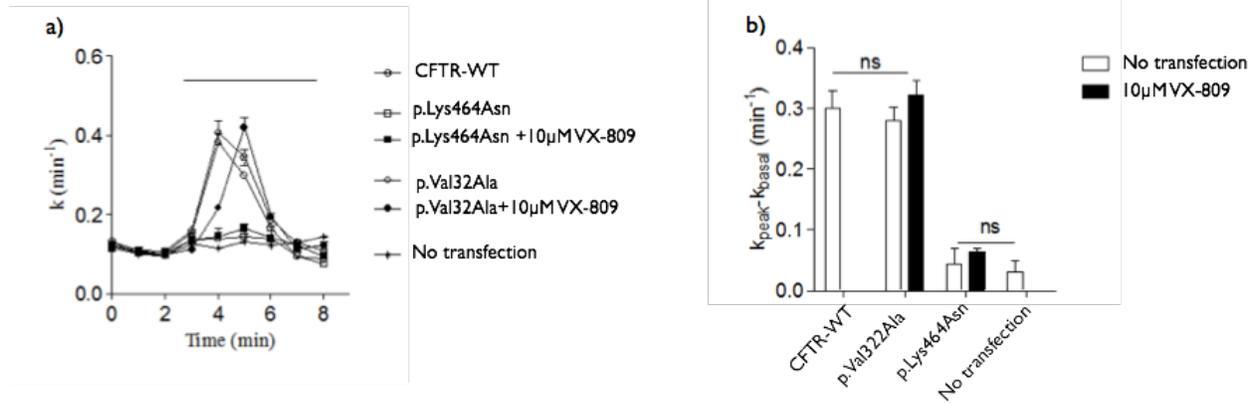
b)



**Figure 1:** Study of the p.Val322Ala mutation on protein processing, localisation and functionality. (a) Processing of WT and mutant CFTR proteins as assessed by the glycosylation status of the CFTR protein at steady state on Western Blotting. Hek293 cells were transiently transfected with WT, or mutants (p.Phe508del and p.Val322Ala) in triplicates. CFTR protein was detected by M3A7 (Chemicon), a mouse monoclonal antibody that recognizes an epitope at the C-terminal of CFTR in the region of residues 1370-1380. White arrows indicate the positions of core-glycosylated (band B) and fully glycosylated (band C) forms of CFTR. Ladder: Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Biorad).

(b) Subcellular localization of WT and mutant CFTR proteins in expressing HeLa cells as assessed by Confocal laser scanning microscopy. The red color results of CFTR protein recognized by the Alexa Fluor 555® (Invitrogen). Numbers indicate the nucleus (1), endoplasmic

reticulum (2) and cell membrane (3). The mutant p.Val322Ala (III) presents a membrane staining comparable to that of the WT (I) transfected cells and does not show a ER retention as for the p.Phe508del (II). A mean number of 15 cells were examined in three independent experiments for each CFTR protein analyzed. Scale Bar, 10  $\mu$ m.



**Figure 2:** Study of the p.Val322Ala CFTR mutation on protein activity. a) Time-dependent stimulation of iodide effluxes in cells transiently transfected by the WT (CFTR-WT, positive control), c.1392G>T (p.Lys464Asn, negative control) and c.965T>C (p.Val32Ala) pTCF plasmids. Channel activity was measured in absence then in presence of 10 μM forskolin and 30 μM genistein. The horizontal bar indicates the application of these drugs. Channel activity was also measured in cells treated with 10 μM VX-809 (Vertex pharmaceuticals) for 24h in the same conditions. b) Histogram showing the correspondent activity of each transfection in presence and absence of 10 μM VX-809. ns: non significant.

9.4. Annexes

Communication affichée à l'European Human Genetics Conference-ESHG 2014, Milan, Italie, 31 Mai au 3 Juin 2014.



**In cellulo and In Silico analyses of the impact of the p.Val322Ala mutation on CFTR protein in a Brittany family**

Raéd Farhat<sup>1</sup>, Ayman El-Seedy<sup>1</sup>, Ariestya Indah Permata Sari<sup>1</sup>, Marie-Claude Pasquet<sup>1,2</sup>, Catherine Adolphe<sup>3</sup>, Alain Kitzis<sup>1,2</sup>, Véronique Ladeveze<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Génétique Moléculaire de Maladies Rares », University of Poitiers, Poitiers, France, <sup>2</sup> Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, Poitiers, France, <sup>3</sup> University of Poitiers, Poitiers, France, <sup>4</sup> Inserm U1078 Génétique, Génomique et Biotechnologies de Brest, Université de Bretagne Occidentale.



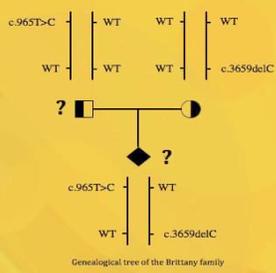
Centre National de Recherche Scientifique Libanais




### Introduction

The c.965T>C (p.Val322Ala) CFTR rare missense mutation has been studied, recently, after its identification in 1995 in French family (Brittany) by Perek *et al.* This exon 8 mutation induces a substitution of the valine322 into alanine at the fifth helix of the first transmembrane domain (TMD1). Recently, the c.965T>C mutation has been detected in a heterozygote healthy future father. His partner has the c.1521\_1523delCTT mutation on one allele and thus the family has one risk over four to have a child carrying both mutations. Therefore, studying the impact(s) of the c.965T>C mutation is essential for a prenatal genetic counselling.

*In cellulo* and *in silico* studies showed that the c.965T>C mutation has no effect on the processing, localization and functionality of the p.Val322Ala CFTR protein.



Genealogical tree of the Brittany family

### In Silico Analyses

#### By PolyPhen-2

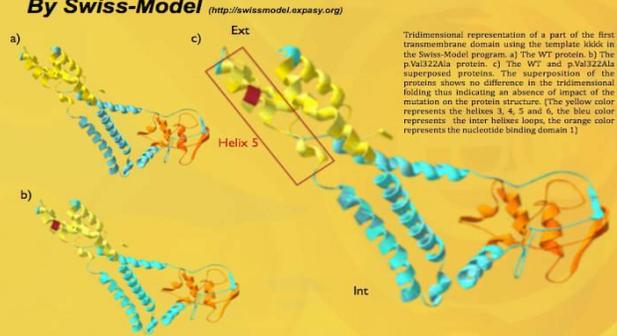
<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>



This mutation is predicted to be POSSIBLY DAMAGING with a score of 0.880 (sensitivity: 0.82; specificity: 0.84)

#### By Swiss-Model

<http://swissmodel.expasy.org/>



Tridimensional representation of a part of the first transmembrane domain using the template knob in the Swiss-Model program. a) The WT protein. b) The p.Val322Ala superposed protein. c) The WT and p.Val322Ala superposed proteins. The superposition of the proteins shows no difference in the tridimensional folding thus indicating an absence of impact of the mutation on the protein structure. (The yellow color represents the helices 3, 4, 5 and 6, the blue color represents the inner helices loops, the orange color represents the nucleotide binding domain 1)

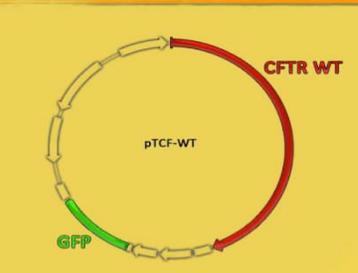
#### By Alignment

<http://www.uniprot.org/help/sequence-alignments>

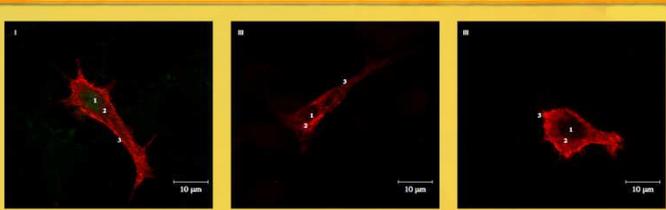
**Helix 5 of TMD1**

301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Homo sapiens</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Pan troglodytes</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Canis familiaris</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Macaca mulatta</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Macaca fascicularis</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Macaca fasciata</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Microcebus murinus</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Mus musculus</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Rattus norvegicus</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Canis lupus familiaris</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Bos taurus</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Canis familiaris</i>
301	YKRTFSAFFSFFVFLVLAIPVALIKGLILKILKIFTTIFSCIVLQNAVTRQPPWAVQT	362	<i>Ovis aries</i>

### In Cellulo Analyses



**Figure** : The pTCF plasmid (generously provided by F. Fanen) is a vector designed to produce endogenous CFTR protein and to visualize transfected mammalian cells using Green Fluorescent Protein (GFP). This plasmid contains the CFTR complementary DNA (cDNA) under the control of the CMV promoter, while the SV40 promoter controls expression of GFP in this study. WT, c.1521\_1523delCTT (p.Phe508del), and c.965T>C pTCF plasmids were used. The two mutated plasmids were obtained by directed mutagenesis of the WT.



Study of the p.Val322Ala mutation on protein processing, localization and functionality. (a) Subcellular localization of WT and mutant CFTR proteins in expressing HeLa cells as assessed by Confocal Laser scanning microscopy. The red color results of CFTR proteins recognized by the Alexa Fluor 555 (Invitrogen). Numbers indicate the nucleus (1), endoplasmic reticulum (2) and cell membrane (3). The mutant p.Val322Ala (II) presents a membrane staining comparable to that of the WT (I) transfected cells and does not show a ER retention as for the p.Phe508del (I). A mean number of 15 cells were examined in three independent experiments for each CFTR protein analyzed. Scale Bar, 10 µm. (b) Processing of WT and mutant CFTR proteins as assessed by the glycosylation status of the CFTR protein at steady state on Western Blot. HeLa293 cells were transiently transfected with WT, or mutants (p.Phe508del and p.Val322Ala) in triplicates. CFTR protein was detected by MA7 (Chemicon), a mouse monoclonal antibody that recognizes an epitope at the C-terminal of CFTR in residues 1370-1380. White arrows indicate the positions of core-glycosylated (band II) and fully glycosylated (band I) forms of CFTR. Ladder: Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (BioRad).

### Conclusions

**In silico**  
The highly conserved Valine322 amino acid during evolution hypothesizes that its substitution may induce major consequences on protein processing and functionality. The PolyPhen-2 indicates that the c.965T>C is "possibly damaging" but the Swiss-Model program shows no difference between Helix 5-WT and the mutated one.

**In cellulo**  
A fully glycosylated band for the p.Val322Ala protein was observed as for the WT. The immunolocalization images obtained by confocal microscopy confirmed the correct processing of the mutated protein by showing cell membrane staining and not an ER staining like for the p.Phe508del mutation. Preliminary iodide efflux tests showed correct activity.

The mutation c.965T>C seems to have no notable consequences and consider as a polymorphism.

### Acknowledgements

We thank Pr Claude Ferec for the identification of the mutation, Dr. Anne Cantereau for her excellent assistance in the use of the confocal laser microscope and Dr Caroline Norez for the preliminary physiological experiments. This work was supported by "association mucoviscidose: ABCF2". Raéd Farhat received a fellowship from CNRS-Lebanon.

165

## CHAPITRE 4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

### 1. CONCLUSIONS GENERALES

Les maladies rares, dont la prévalance varie selon la littérature médicale et les lois de chaque pays entre 1/1000 à 1/200000, sont majoritairement d'origine génétique. Malgré le nombre élevé de patients concernés, la grande variété des maladies rares ainsi que le marché limité des traitements potentiels rendent les recherches scientifiques et thérapeutiques difficiles.

Concernant la mucoviscidose, les recherches scientifiques sur le plan thérapeutique nécessitent les recherches fondamentales permettant de classifier les mutations. Sur le plan de la recherche thérapeutique, les études se repartissent entre le développement de traitements symptomatiques (antibiothérapie, pharmacothérapie, compléments nutritionnels, kinésithérapie) et de traitements étiologiques (cellules souches, thérapie génique, transplantation pulmonaire). Sur le plan fondamental, les axes de recherches concernant les manifestations cliniques de la mucoviscidose (signalisation, immunologie, microbiologie) sont privilégiés dans la mesure où ces études permettent de donner des résultats rapides et pratiques pour soulager la souffrance des patients. Cependant, les recherches génétiques ont un intérêt croissant puisqu'elles permettent la caractérisation et la classification des mutations en vue de personnaliser les traitements pharmaceutiques.

En effet, la classification des mutations du gène *CFTR* est une nécessité pour développer des molécules potentiellement thérapeutiques. Leurs natures varient en fonction de(s) conséquence(s) d'une mutation sur la synthèse, la localisation, la fonctionnalité et/ou la stabilité de la protéine CFTR. De plus, les études moléculaires et cellulaires d'une mutation sont non seulement cruciales dans la réussite du développement

mais aussi dans la prescription du traitement adéquat au patient, le jour où une panoplie de molécules thérapeutiques sera disponible.

Outre leur importance au niveau de la thérapie, les études des mutations de *CFTR* apportent des informations incontournables pour les cliniciens. En effet, elles permettent de donner un conseil génétique avisé lors d'un diagnostic prénatal pour les familles à risque et une prise en charge adaptée aux patients. De plus, la recherche génétique de *CFTR* permet une analyse fondamentale du gène, de son évolution, des origines de ses mutations et de leurs propagations dans les populations.

L'avancée des recherches génétiques de la mucoviscidose se heurte à la rareté de la maladie et à celle de la majorité des mutations. Du fait de la fréquence élevée de la mutation c.1521\_1523delCTT, les autres mutations identifiées, dont le nombre ne cesse de croître et dépasse actuellement les 1960 ([www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca), dernier accès le 7 Mai 2014), sont peu fréquentes, rares ou même isolées. Malgré cela, chaque mutation nouvellement identifiée doit en principe être classifiée dans l'une des six classes de mutations en fonction de son effet. Ainsi les études d'une mutation *CFTR* peuvent être dans certains cas uniquement bénéfiques pour une seule famille.

Dans nos travaux, les études des mutations c.1392G>T, c.3909C>G et leurs allèles complexes correspondants ainsi que celles de la mutation c.965T>C ont été nécessaires pour une meilleure corrélation phénotype-génotype. Nous avons montré que : 1) la mutation familiale c.1392G>T est une mutation de classe V et II et que son allèle complexe aggrave l'épissage aberrant, 2) la mutation cosmopolite c.3909C>G est une mutation de classe II et l'effet sur l'épissage résulte de son allèle complexe et 3) la mutation familiale c.965T>C est un simple polymorphisme.

Ces résultats ont montré l'importance de l'étude d'une mutation à différents niveaux cellulaires et cela par l'intermédiaire des *analyses in silico*, *in cellulo* et *in vivo*. De plus, ils soulignent la nécessité d'étudier les allèles complexes, qui peuvent avoir un effet modulateur sur la mutation seule. Les résultats ont aussi permis d'évaluer la fiabilité des programmes *in silico* en comparant les données biologiques aux prédictions informatiques. En outre, les études de la mutation c.3909C>G dans la population libanaise nous ont amené

à discuter son origine phénicienne probable et l'état actuel de la situation de la mucoviscidose au Liban.

### 1.1. « Les études d'une mutation » et non pas « L'étude d'une mutation »

Lors des travaux menés sur la mutation c.1392G>T, deux études ont été réalisées : une au niveau de l'ARNm et une autre au niveau de la protéine. Les résultats obtenus ont montré que la mutation a un effet sur l'épissage en augmentant considérablement le taux d'ARNm ayant subi un épissage aberrant, et un effet sur la protéine en induisant un défaut de maturation. Ainsi, la mutation c.1392G>T est classée dans deux classes distinctes II et V. En conséquence le phénotype du patient est expliqué par deux mécanismes cellulaires distincts et une meilleure approche thérapeutique sera donc possible.

Cette approche à multiples niveaux a été appliquée aussi dans l'étude de la mutation c.3909C>G. Au niveau de l'ARNm, l'étude *in cellulo* n'a révélé aucun épissage aberrant. Toutefois, il est important de noter qu'une partie intronique est détectée dans l'ARNm WT et c.3909C>G quelle que soit la lignée cellulaire utilisée. Cela résulte probablement de la construction plasmidique et n'est pas lié à la présence ou non de la mutation. Au niveau protéique, un défaut de maturation et une localisation au niveau du RE ont été observés. De plus, les premiers résultats de physiologie indiquent que la protéine n'est pas fonctionnelle, même en présence du correcteur VX-809 (résultats préliminaires). Cela confirme la sévérité de la mutation c.3909C>G et son appartenance à la classe II.

Quant à la mutation c.965T>C, une étude de la protéine a été seulement effectuée vu la localisation de la mutation et l'absence d'épissage aberrant prédit par les programmes informatiques. L'étude de l'effet de la protéine a permis de considérer cette mutation comme un polymorphisme (maturation, localisation et activité correctes).

Pour les trois mutations, l'effet au niveau de la protéine est déterminé en étudiant la maturation par western blotting, la localisation par microscopie confocale et la fonctionnalité par méthodes d'efflux. Cela permet de confirmer les diverses observations et de préciser si la mutation affecte la synthèse ou la fonctionnalité de la protéine. Au niveau de l'ARNm, trois transfections indépendantes pour chaque lignée

(HeLa, HEK293 et HT29) ont été réalisées pour vérifier la reproductivité des expériences.

L'ensemble des études de l'ARN et de la protéine ont été réalisées *in cellulo* mais parfois des expériences *in vivo* sont requises. Par exemple, dans le cas de la mutation c.1392G>T, les études *in vivo* ont été effectuées pour confirmer l'épissage alternatif aberrant observé *in cellulo* et l'absence de fonctionnalité chez le patient par la technique d'exploration du canal. Pour la mutation c.3909C>G, les études *in vivo* sont envisagées en perspective.

Aux cours de la réalisation des études des mutations, plusieurs laboratoires et centres hospitaliers ont collaboré ensemble. Les techniques de biologie moléculaire, microbiologie, culture cellulaire et biochimie ont été réalisées dans le laboratoire de « Génétique Moléculaire de Maladies Rares ». Le microscope confocal Olympus FV100 (Olympus) et le robot *MultiPROBE®IIex robotic liquid handling system* (Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France) ont été utilisés grâce aux collaborations avec les plateformes « ImageUP » et « MUCOScreen » respectivement.

## 1.2. Les études d'une mutation dans le cadre de ses allèles complexes

La mutation c.1392G>T a été étudiée en association avec le polymorphisme TG(11)T(5) puisque cet allèle complexe a été identifié chez le patient par séquençage direct du gène *CFTR*. Les études *in vivo* et *in cellulo* de l'ARNm montrent une augmentation de l'épissage aberrant quand la mutation est associée au TG(11)T(5) en comparaison avec l'association de la mutation avec TG(11)T(7). Les résultats *in cellulo* sont identiques quelles que soient les cellules transfectées et montrent que la mutation induit trois types de transcrit : 1) un transcrit complet, 2) un transcrit avec saut d'exon 10 et 3) un transcrit avec un exon 10 avec -5pdb. En association avec le TG11T5, le saut d'exon 10 devient plus intense et un exon 10 avec -118pdb est observable (cet épissage aberrant est dû au T5 et non pas à la mutation c.1392G>T). Le saut d'exon est confirmé par les études réalisées sur les extractions d'ARN des cellules épithéliales nasales obtenues des parents. Toutefois, *in vivo*, les épissages aberrants de -5pdb et -118pdb ne sont plus détectés. Comme ils induisent des décalages du cadre de lecture, l'action du mécanisme NMD est envisagée.

L'ensemble des études effectuées sur cet allèle complexe permet d'envisager un double traitement personnalisé, lorsqu'il sera disponible, pour contrer les effets sur l'épissage et sur la protéine.

Dans le cas de la mutation c.3909C>G, un allèle complexe, associant la mutation exonique à la mutation c.869+11C>T de l'intron 7 et le polymorphisme GATT(6) de l'intron 6, a été identifié puis étudié. A la différence de l'allèle complexe renfermant la mutation c.1392G>T où une construction plasmidique regroupant les deux mutations est possible, la distance séparant la mutation c.3909C>G de l'exon 24 et les variations des introns 6 et 7 empêche une étude *in cellulo* par une seule construction plasmidique. Ainsi, deux constructions ont été réalisées pour étudier l'effet de l'allèle complexe sur l'épissage. La première révèle une absence totale d'un effet de la mutation c.3909C>G sur l'épissage. La deuxième montre un très faible saut d'exon 7, jamais décrit auparavant. Une étude *in vivo* est envisageable en perspective.

Comme une ou plusieurs variations du gène *CFTR* peuvent être associées en cis et que les combinaisons de mutations sont aléatoires et ne peuvent être déterminées que par des approches individuelles, l'effet d'une mutation doit être étudié dans le cadre de son allèle complexe identifié par séquençage direct du gène de chaque patient.

### 1.3. Utilité de la prédiction des effets d'une mutation par les programmes informatiques ?

Les études des mutations c.1392G>T, c.3909C>G et c.965T>C ont débuté par des analyses *in silico* afin de prédire leurs effets sur l'ARNm et la protéine.

Le site HSF a permis d'envisager l'effet des mutations c.1392G>T et c.3909C>G sur l'épissage. Pour la mutation c.1392G>T, le programme prédit un des effets identifiés (le décalage de -5pdb) dans les études biologiques. La mutation substituant le dernier nucléotide de l'exon 10 affecte le site donneur. Cette mutation conduit à la perte du motif AG, localisé dans l'extrémité 3' de l'exon 10, nécessaire pour déterminer l'identité de l'exon. Le saut d'exon complet n'a pas été décrit par le programme HSF.

Concernant la mutation c.3909C>G, l'effet prédit sur l'épissage n'a pas été retrouvé dans les études biologiques. En effet, la mutation c.3909C>G n'affecte pas un

motif important dans le processus d'épissage. Toutefois, la substitution provoque la formation, à la place du motif normal AC, d'un motif AG considéré par le programme HSF comme un site d'épissage indiquant la fin de l'exon 24.

Dans les études protéiques, plusieurs programmes informatiques ont été utilisés pour la prédiction de l'effet d'une mutation sur la protéine. Les programmes d'alignement, PolyPhen-2 et *Swiss-Model* ont permis, respectivement, l'évaluation de la conservation de l'acide aminé au cours de l'évolution, la prédiction de la sévérité de la mutation et la visualisation de l'effet d'une telle substitution sur la structure tridimensionnelle de la protéine.

Pour les trois mutations les alignements montrent une conservation entre les espèces des acides aminés initiaux, ce qui indiquerait que ces substitutions peuvent provoquer des modifications dans la structure, la fonctionnalité ou la stabilité de la protéine. Le programme PolyPhen-2 attribue aux mutations p.Lys464Asn et p.Asn1303Lys un score maximal et les considère comme *Probably Damaging*. Un moindre score est attribué à la mutation p.Val322Ala et son impact sur la protéine est *Possibly Damaging*. Ces résultats s'expliquent par les positions respectives de chaque acide aminé substitué au niveau des domaines de la protéine. Les mutations p.Lys464Asn et p.Asn1303Lys sont localisées dans les NBD1 et NBD2 respectivement alors que la mutation p.Val322Ala est localisée dans le DTM1. Les résultats biologiques confirment ces observations en indiquant un défaut de maturation des protéines p.Lys464Asn et p.Asn1303Lys, alors que la protéine p.Val322Ala présente une maturation et une activité similaires à celles du WT. Les analyses tridimensionnelles ont soutenu les résultats *in silico* et *in cellulo* pour la mutation p.Asn1303Lys où une modification de la structure a été observée par le programme *Swiss-Model*. Quant à la mutation p.Lys464Asn, une modification de structure n'est pas observée. Cependant le score élevé obtenu par le site PolyPhen-2 peut s'expliquer par le fait que la substitution se trouve dans le Walker A du NBD1.

Les programmes informatiques peuvent être d'une très grande utilité pour prédire l'effet d'une mutation avant d'entamer les études biologiques. Cependant, les résultats des programmes informatiques doivent être analysés avec précaution et en

prenant en compte la localisation de la mutation au niveau du gène et des domaines de la protéine. De plus, les résultats des études biologiques restent uniquement les seules données fiables et décisives lors de la classification des mutations.

#### 1.4. Les études d'une mutation dans une population : Cas de c.3909C>G

Les mutations c.1392G>T et c.965T>C sont rarement identifiées (une famille ou deux uniquement) contrairement à la mutation c.3909C>G dont la fréquence mondiale est élevée ce qui la met en quatrième position. La comparaison des fréquences de la mutation dans divers pays indique que cette mutation est présente surtout dans le pourtour de la méditerranée. Les études précédentes ont montré que la fréquence la plus élevée de cette mutation est au Liban (Desgeorges et al., 1997; Farra et al., 2010). Cela a suscité notre intérêt pour étudier la mutation c.3909C>G dans la population libanaise en recrutant plusieurs patients porteurs de la mutation. Le séquençage direct des patients libanais a permis, au cours de notre étude, d'associer la mutation c.3909C>G à deux polymorphismes dans les introns 6 et 7 dans la population libanaise. Cet allèle complexe est toujours associé à la mutation c.3909C>G.

La fréquence de la mutation c.3909C>G dans la population libanaise nous a permis de postuler que son origine pourrait être phénicienne. En effet, la migration des phéniciens et leurs activités expliqueraient sa diffusion dans les pays de la méditerranée. L'histoire des phéniciens marquée par le voyage et la migration de cette population a sûrement induit l'introduction de nouveaux allèles dans les pays de la méditerranée. Cela a suscité l'intérêt des chercheurs pour retracer l'expansion de ce peuple à travers la méditerranée en se basant sur des comparaisons d'haplotypes de la population libanaise (Zalloua *et al.*, 2008a) et ceux des populations de la méditerranée (Zalloua *et al.*, 2008b). De plus, dans ces études, des comparaisons d'haplotypes entre des sites phéniciens et des sites non-phéniciens ont permis de déterminer des haplogroupes avec une signature phénicienne : Haplogroupe J2 et particulièrement six *short sequence repeat* du chromosome Y. Les recherches de ces haplogroupes chez des porteurs mâles de la mutation c.3909C>G de divers populations du monde peuvent être utiles pour déterminer si l'origine de la mutation est phénicienne. La limite de cette investigation, qui consiste à trouver un nombre suffisant de patients, peut être

contournée par la recherche de l'haplotype de marqueurs *CFTR* associés à la mutation c.3909C>G dans les populations ayant eu une influence phénicienne, notamment la population libanaise. En effet, il a été détecté que la mutation c.3909C>G est toujours dans un même haplotype de *CFTR* (Morral *et al.*, 1996 ; Mateu *et al.*, 2002 ; Cordovado *et al.*, 2012). Si nous considérons les marqueurs J44 (partie promotrice), GATT (de l'intron 6), T854 (de l'exon 15), IVS17bTA (de l'exon 20) et TUB20 (de l'exon 23), l'haplotype à ces marqueurs est 21-6-1-31-2 (Morral *et al.*, 1996 ; Mateu *et al.*, 2002). Le séquençage de *CFTR* des patients libanais nous a permis de déterminer les mêmes différents marqueurs, à l'exception de J44 (non réalisé). Ce même haplotype est identifié aussi avec la mutation c.1624G>T et avec c.1521\_1523delCTT (Morral *et al.*, 1996 ; Mateu *et al.*, 2002 ; Cordovado *et al.*, 2012). De ce fait, ces trois mutations semblent avoir une même origine (Morral *et al.*, 1996 ; Mateu *et al.*, 2002). La faible fréquence de cet haplotype (21-6-1-31-2) dans les chromosomes européens non CF indique que l'origine est non européenne (Morral *et al.*, 1996). La recherche d'une fréquence suffisamment élevée pourrait induire le repérage de la population où ces mutations ont pu surgir (Mateu *et al.*, 2002). Dans l'étude mondiale menée pour la recherche de cette origine, aucune population n'a présenté une fréquence suffisante pour qu'elle soit à l'origine de ces mutations (Mateu *et al.*, 2002). Cependant, cette étude a établi que la fréquence la plus élevée, mais pas suffisamment, est présente chez les Druzes de Palestine (Les druzes sont une petite communauté religieuse répartie entre la Syrie, la Palestine et le Liban). Une fréquence plus élevée pourrait être détectée chez la population libanaise qui est proche géographiquement des Druzes. Jusqu'à maintenant aucune étude des marqueurs *CFTR* n'a été effectuée sur la population Libanaise saine. Une telle étude pourrait soutenir l'hypothèse de l'origine phénicienne de la mutation c.3909C>G.

### 1.5. Situation de la Mucoviscidose au Liban

Les investigations sur la mutation c.3909C>G dans la population libanaise ont conduit à l'établissement de collaborations avec plusieurs organismes travaillant dans le domaine de la mucoviscidose. Le recrutement des patients c.3909C>G libanais, a été effectué avec l'association Vaincre La Mucoviscidose au Liban et l'Unité de Génétique Médicale de la Faculté de Médecine de l'Université Saint Joseph à Beyrouth. De plus,

nous avons commencé une nouvelle collaboration avec des rhinologues de l'Hôpital Hôtel-Dieu de Beyrouth pour l'obtention de cellules nasales de patients c.3909C>G. Certains contacts ont été établis avec le Ministère de la Santé pour l'obtention de données statistiques relatives aux maladies génétiques et à la mucoviscidose au Liban. Ces collaborations et contacts nous ont permis de déterminer la situation actuelle de la maladie concernant sa compréhension, son diagnostic, la prise en charge des patients et le développement des études scientifiques au Liban.

Au niveau ministériel, la mucoviscidose est juste listée parmi les maladies génétiques qui affectent la population libanaise. L'incidence de la maladie dans la population n'a jamais été recherchée et nous ne possédons pas d'étude statistique pouvant recenser le nombre de patients CF sur le territoire libanais. Cependant, en se basant sur la longue histoire de flux migratoires de diverses populations vers le Liban, sur les incidences de la maladie dans les pays avoisinants et sur la récurrence de mariages consanguins dans certaines régions libanaises, nous pouvons estimer que l'incidence est proche de celles des pays Européens (entre 1/3000 et 1/4000).

Sur le plan clinique, le diagnostic médical et l'orientation des patients vers la réalisation d'un test de sueur et des recherches génétiques sont réalisés lorsque les patients présentent des symptômes CF ou CFTR-RD. Cependant, la prise en charge n'est pas systématique ; cela est dû essentiellement à l'absence de moyens financiers des familles concernées et la non-couverture de la maladie par la Caisse Nationale de la Sécurité Sociale. Ainsi, la kinésithérapie est limitée à certains patients et beaucoup n'ont pas de traitement antibiotique. De plus, le diagnostic néonatal de la mucoviscidose n'est pas règlementé ou obligatoire.

Au niveau de la recherche scientifique, certains laboratoires utilisent des kits, comme CF30 (Elucigene) pour l'identification des mutations chez les patients et les porteurs. Seulement trois études portent sur la génétique de la mucoviscidose dans la population Libanaise en établissant les profils mutationnels. Ainsi, ce travail est le premier à effectuer une recherche d'allèles complexes par un séquençage complet du gène *CFTR* de plusieurs patients et de leurs parents.

## 2. PERSPECTIVES

Dans ces travaux, nous avons essayé d'élucider les mécanismes physiopathologiques de trois mutations du gène *CFTR*. Les études *in silico*, *in cellulo* et *in vivo* au niveau du gène, de l'ARNm et de la protéine ont permis non seulement de classer les mutations mais aussi d'établir une démarche lors de la classification.

Cette démarche a d'abord démontré son intérêt lors des études de la mutation c.1392G>T. Un effet sur l'épissage, aggravé dans le cadre de l'allèle complexe, et un effet sur la maturation de la protéine ont caractérisé cette mutation de classe II et V. Une étude quantitative plus précise par RT-PCR serait envisageable pour déterminer exactement le taux d'épissage aberrant induit par la mutation et par l'allèle complexe. La réalisation d'une telle technique nécessite l'obtention des cellules nasales du patient suite aux consentements des parents, ce que nous n'avons pas pu obtenir à l'heure actuelle.

La même démarche a été par la suite appliquée lors de l'étude de la mutation c.3909C>G. Aucun épissage aberrant spécifique de la mutation c.3909C>G n'a été détecté *in cellulo*. Une étude *in vivo* sur l'ARNm d'un patient c.3909C>G homozygote ou c.3909C>G/c.1521\_1523delCTT serait utile pour vérifier si l'allèle complexe, contenant les trois variations, induirait une augmentation des épissages aberrants observés avec les deux polymorphismes associés. Un autre aspect de la mutation c.3909C>G, non abordé dans ces travaux, est son impact sur le rôle régulateur de CFTR sur les canaux ENaCs (Szollosi *et al.*, 2010). Des études *in cellulo* peuvent être envisagées en réalisant des doubles transfections dans des lignées humaines suivies par de tests de *patch-clamp* qui pourraient aboutir à une meilleure compréhension de la dérégulation de l'interaction avec les canaux ENaC et les p.Asn1303Lys-CFTR.

Au cours de notre étude de *CFTR* dans la population libanaise, nous avons proposé une hypothèse, attribuant une origine phénicienne à la mutation c.3909C>G, et nous avons suggéré deux moyens pour la vérifier. La recherche des haplogroupes phéniciens sur le chromosome Y chez des patients mâles c.3909C>G de diverses populations, ainsi que la recherche de la fréquence, dans la population libanaise, de l'haplotype (21-6-1-31-2) des marqueurs *CFTR*, pourraient confirmer ou non l'origine phénicienne de la mutation.

La situation de la mucoviscidose au Liban sur les plans gouvernemental, médical, scientifique et humain souligne le grand intérêt d'établir un centre de recherche prenant en charge les divers aspects de la maladie. Ainsi, il est envisageable de mettre en place un plan de travail regroupant les divers organismes (associations, laboratoires, hôpitaux...) concernés par la maladie pour : 1) Clarifier la situation de la mucoviscidose sur le terrain (incidence, prévalence, répartition des patients dans les régions, nombre de patients pris en charge...), 2) Initier les recherches scientifiques en comptant sur les expertises de laboratoires locaux et étrangers, 3) Assurer le diagnostic néonatal et la prise en charge de la maladie en incitant les ministères concernés de lister la mucoviscidose parmi les maladies couvertes par la Caisse Nationale de Sécurité Sociale, 4) Mieux expliquer la maladie aux familles atteintes et au grand public en travaillant avec les associations. La recherche de partenaires financiers a été déjà initiée. Le laboratoire de Génétique de Maladies Rares de l'Université de Poitiers serait le partenaire scientifique lors de la réalisation de ce projet.

## REFERENCES

---

### A

---

Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med.* 2010;363(21):1991-2003.

Amaral MD. CFTR and chaperones: processing and degradation. *J Mol Neurosci.* 2004;23(1-2):41-8.

Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science.* 1991a;253(5016):202-5.

Anderson MP, Berger HA, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. Nucleoside triphosphates are required to open the CFTR chloride channel. *Cell.* 1991b;67(4):775-84.

Annilo T, Chen ZQ, Shulenin S, Costantino J, Thomas L, Lou H, et al. Evolution of the vertebrate ABC gene family: analysis of gene birth and death. *Genomics.* 2006;88(1):1-11.

---

### B

---

Bachhuber T, König J, Voelcker T, Mörle B, Schreiber R, Kunzelmann K. Cl<sup>-</sup> interference with the epithelial Na<sup>+</sup> channel ENaC. *J Biol Chem.* 2005;280(36):31587-94.

Baker JM, Hudson RP, Kanelis V, Choy WY, Thibodeau PH, Thomas PJ, et al. CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(8):738-45.

Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, et al. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell*. 1992;68(4):809-18.

Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebok Z, Bubien JK, Hong J, et al. Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med*. 1997;3(11):1280-4.

Berdiev BK, Qadri YJ, Benos DJ. Assessment of the CFTR and ENaC association. *Mol Biosyst*. 2009;5(2):123-7.

Berger HA, Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Howard PW, Maurer RA, et al. Identification and regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-generated chloride channel. *J Clin Invest*. 1991;88(4):1422-31.

Berger A, Ikuma M, Hunt J, Thomas P, Welsh M. Mutations That Change the Position of the Putative -Phosphate Linker in the Nucleotide Binding Domains of CFTR Alter Channel Gating. *J. Biol. Chem.* Published online November 5, 2001.

Berget SM. Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem*. 1995;270(6):2411-4.

Berget SM, Sharp PA. A spliced sequence at the 5'-terminus of adenovirus late mRNA. *Brookhaven Symp Biol*. 1977(29):332-44.

Beroud C, Collod-Bèrout G, Boileau C, Soussi T, Junien C. UMD (Universal mutation database): a generic software to build and analyze locus-specific databases. *Hum Mutat*. 2000;15(1):86-94.

Beroud C, Hamroun D, Collod-Bèrout G, Boileau C, Soussi T, Claustres M. UMD (Universal Mutation Database): 2005 update. *Hum Mutat*. 2005;26(3):184-91.

Bienvenu T. Les bases moléculaires de l'hétérogénéité phénotypique dans la mucoviscidose. *L'essentiel de l'information scientifique et médicale*. 1997;55(2):113-121.

Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:291-336.

Blackledge NP, Carter EJ, Evans JR, Lawson V, Rowntree RK, Harris A. CTCF mediates insulator function at the CFTR locus. *Biochem J*. 2007;408(2):267-75.

Blackledge NP, Ott CJ, Gillen AE, Harris A. An insulator element 3' to the CFTR gene binds CTCF and reveals an active chromatin hub in primary cells. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(4):1086-94.

Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat.* 2002;19(6):575-606.

Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, et al. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros.* 2011;10 Suppl 2:S86-102.

Borgo G, Mastella G, Gasparini P, Zorzanello A, Doro R, Pignatti PF. Pancreatic function and gene deletion F508 in cystic fibrosis. *J Med Genet.* 1990;27(11):665-9.

Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:537-92.

Bossuyt X, Boeynaems J-M. Repres en diagnostic de laboratoire. Editeur : Garant. ISBN : 9044110225, 9789044110227.

Buratti E, Baralle FE. Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9. *J Biol Chem.* 2001;276(39):36337-43.

---

## C

---

Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3568-71.

Chabot H, Vives MF, Dagenais A, Grygorczyk C, Berthiaume Y, Grygorczyk R. Downregulation of epithelial sodium channel (ENaC) by CFTR co-expressed in *Xenopus* oocytes is independent of Cl<sup>-</sup> conductance. *J Membr Biol.* 1999;169(3):175-88.

Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, et al. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell.* 1990;63(4):827-34.

Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell*. 1991;66(5):1027-36. PubMed PMID: 1716180.

Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet*. 1993;3(2):151-6.

Clancy JP, Bebök Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, et al. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(7):1683-92.

Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C, Ferec C, et al. Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mutat*. 2000;16(2):143-56. doi: 10.1002/1098-1004(200008)16:2<143::AID-HUMU7>3.0.CO;2-J. PubMed PMID: 10923036.

Cordovado SK, Hendrix M, Greene CN, Mochal S, Earley MC, Farrell PM, et al. CFTR mutation analysis and haplotype associations in CF patients. *Mol Genet Metab*. 2012;105(2):249-54.

Csank AK, Henikoff S. Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. *Trends Genet*. 1998;14(5):200-4.

Cuppens H, Teng H, Raeymaekers P, De Boeck C, Cassiman JJ. CFTR haplotype backgrounds on normal and mutant CFTR genes. *Hum Mol Genet*. 1994;3(4):607-14.

---

## D

Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(5):475-82.

De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. 2006;61(7):627-35.

Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. 2001;42(7):1007-17.

Delaney SJ, Rich DP, Thomson SA, Hargrave MR, Lovelock PK, Welsh MJ, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variants are not conserved and fail to produce chloride channels. *Nat Genet.* 1993;4(4):426-31.

Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature.* 1992;358(6389):761-4.

Desgeorges M, Mègarbanè A, Guittard C, Carles S, Loiselet J, Demaille J, et al. Cystic fibrosis in Lebanon: distribution of CFTR mutations among Arab communities. *Hum Genet.* 1997;100(2):279-83.

Desmet FO, Bèroud C. Bioinformatics and mutations leading to exon skipping. *Methods Mol Biol.* 2012;867:17-35.

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-BÈroud G, Claustres M, BÈroud C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(9):e67.

Deutsch M, Long M. Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(15):3219-28.

Devidas S, Guggino WB. CFTR: domains, structure, and function. *J Bioenerg Biomembr.* 1997;29(5):443-51.

Disset A, Michot C, Harris A, Buratti E, Claustres M, Tuffery-Giraud S. A T3 allele in the CFTR gene exacerbates exon 9 skipping in vas deferens and epididymal cell lines and is associated with Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens (CBAVD). *Hum Mutat.* 2005;25(1):72-81.

Donaldson R, Boucher R. Physiopathologie de la mucoviscidose. Centre de traitement et d'étude de la mucoviscidose de l'Université de Caroline du Nord. Chapel Hill, N.C., Etats-Unis Ann Nestlé [Fr] 2006;64:101-109. DOI: 10.1159/000099043.

Du K, Sharma M, Lukacs GL. The DeltaF508 cystic fibrosis mutation impairs domain-domain interactions and arrests post-translational folding of CFTR. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(1):17-25.

Dulhanty AM, Riordan JR. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase causes a conformational change in the R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biochemistry*. 1994;33(13):4072-9.

Dulhanty AM, Chang XB, Riordan JR. Mutation of potential phosphorylation sites in the recombinant R domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator has significant effects on domain conformation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206(1):207-14.

---

## E

---

El-Seedy A, Dudognon T, Bilan F, Pasquet MC, Reboul MP, Iron A, et al. Influence of the duplication of CFTR exon 9 and its flanking sequences on diagnosis of cystic fibrosis mutations. *J Mol Diagn*. 2009;11(5):488-93.

El-Seedy A, Pasquet MC, Bienvenu T, Bieth E, Audrezet MP, Kitzis A, et al. Consequences of partial duplications of the human CFTR gene on cf diagnosis: mutations or ectopic variations. *J Cyst Fibros*. 2013;12(4):407-10. doi: 10.1016/j.jcf.2012.11.006. PubMed PMID: 23261175.

---

## F

---

Fairbrother WG, Yeo GW, Yeh R, Goldstein P, Mawson M, Sharp PA, et al. RESCUE-ESE identifies candidate exonic splicing enhancers in vertebrate exons. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Web Server issue):W187-90.

Fanen P, Clain J, Labarthe R, Hulin P, Girodon E, Pagesy P, et al. Structure-function analysis of a double-mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein occurring in disorders related to cystic fibrosis. *FEBS Lett*. 1999;452(3):371-4. PubMed PMID: 10386624.

Fanen P, Wohlhuter-Haddad A, Hinzpeter A, Genetics of Cystic fibrosis: CFTR mutation toward genotype-based CF therapies. *Int. J. Of Biochem. & Cell Biol*. 2014 (Article in Press)

Fanning TG, Singer MF. LINE-1: a mammalian transposable element. *Biochim Biophys Acta*. 1987;910(3):203-12.

Farhat R, El-Seedy A, El-Moussaoui K, Pasquet MC, Adolphe C, Bieth E, Languépin J, Sermet-Gaudelus I, Kitzis A, Ladevèze V. Multi-physiopathological consequences of the c.1392G>T CFTR mutation revealed by clinical and cellular investigations. *Soumis*

Farra C, Menassa R, Awwad J, Morel Y, Salameh P, Yazbeck N, et al. Mutational spectrum of cystic fibrosis in the Lebanese population. *J Cyst Fibros*. 2010;9(6):406-10.

Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr*. 2008;153(2):S4-S14.

Férec C. Date de création du document 2010-2011. La mucoviscidose: du gène CFTR au conseil génétique. Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale. Laboratoire de Génétique Moléculaire–C.H.R.U. Brest.

Fiel SB. Clinical management of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Lancet*. 1993;341(8852):1070-4.

Flicek P, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, et al. Ensembl 2008. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D707-14.

---

## G

Garg K, Green P. Differing patterns of selection in alternative and constitutive splice sites. *Genome Res*. 2007;17(7):1015-22.

Goodstadt L, Ponting CP. Phylogenetic reconstruction of orthology, paralogy, and conserved synteny for dog and human. *PLoS Comput Biol*. 2006;2(9):e133.

Gottesman MM, Ambudkar SV. Overview: ABC transporters and human disease. *J Bioenerg Biomembr*. 2001;33(6):453-8.

Green RE, Lewis BP, Hillman RT, Blanchette M, Lareau LF, Garnett AT, et al. Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics*. 2003;19 Suppl 1:i118-21.

Gregory RJ, Rich DP, Cheng SH, Souza DW, Paul S, Manavalan P, et al. Maturation and function of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator variants bearing mutations in putative nucleotide-binding domains 1 and 2. *Mol Cell Biol.* 1991;11(8):3886-93.

Griesenbach U, Alton EW. Current status and future directions of gene and cell therapy for cystic fibrosis. *BioDrugs.* 2011;25(2):77-88.

Grimaldi G, Skowronski J, Singer MF. Defining the beginning and end of KpnI family segments. *EMBO J.* 1984;3(8):1753-9.

Grove DE, Rosser MF, Watkins RL, Cyr DM. Analysis of CFTR folding and degradation in transiently transfected cells. *Methods Mol Biol.* 2011;741:219-32.

---

## H

---

Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem.* 1999;274(31):21873-7.

Hamosh A, Trapnell BC, Zeitlin PL, Montrose-Rafizadeh C, Rosenstein BJ, Crystal RG, et al. Severe deficiency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator messenger RNA carrying nonsense mutations R553X and W1316X in respiratory epithelial cells of patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 1991;88(6):1880-5.

Haute Autorité de santé. Janvier 2009. état des lieux en santé publique : le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France : état des lieux et perspectives après 5 ans de fonctionnement (Rapport)

Hefferon TW, Broackes-Carter FC, Harris A, Cutting GR. Atypical 5' splice sites cause CFTR exon 9 to be vulnerable to skipping. *Am J Hum Genet.* 2002;71(2):294-303.

Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. *Res Microbiol.* 2001;152(3-4):205-10.

Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, et al. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature.* 1986;323(6087):448-50.

Holland B, Cole S, Kuchler K, Higgins C. ABC Proteins: From Bacteria to Man. Editeurs: cademic Press, 2003. ISBN: 0080481876, 9780080481876.

Hughes AL. Evolution of the ATP-binding-cassette transmembrane transporters of vertebrates. *Mol Biol Evol.* 1994;11(6):899-910.

Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nat Genet.* 1996;12(3):325-8.

Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, et al. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature.* 1990;346(6282):362-5.

---

## J

James S. Exploring the World of the Celts. Editeurs : Thames & Hudson, Limited, 1993. ISBN : 0500279985, 9780500279984.

Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, et al. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science.* 2003;302(5653):2141-4.

---

## K

Karpowich N, Martsinkevich O, Millen L, Yuan YR, Dai PL, MacVey K, et al. Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure.* 2001;9(7):571-86.

Kelemen O, Convertini P, Zhang Z, Wen Y, Shen M, Falaleeva M, et al. Function of alternative splicing. *Gene.* 2013;514(1):1-30.

Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med.* 1990;323(22):1517-22.

Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, et al. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet*. 2008;372(9640):719-27.

Kiesewetter S, Macek M, Davis C, Curristin SM, Chu CS, Graham C, et al. A mutation in CFTR produces different phenotypes depending on chromosomal background. *Nat Genet*. 1993;5(3):274-8.

Kim SJ, Skach WR. Mechanisms of CFTR Folding at the Endoplasmic Reticulum. *Front Pharmacol*. 2012;3:201.

Koch C, Cuppens H, Rainisio M, Madessani U, Harms H, Hodson M, et al. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol*. 2001;31(1):1-12.

Kopito RR. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev*. 1999;79(1 Suppl):S167-73.

Kos V, Ford RC. The ATP-binding cassette family: a structural perspective. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(19):3111-26.

Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet*. 1992;50(6):1178-84.

---

## L

---

La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*. 1991;352(6330):77-9.

Lansdell KA, Delaney SJ, Lunn DP, Thomson SA, Sheppard DN, Wainwright BJ. Comparison of the gating behaviour of human and murine cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channels expressed in mammalian cells. *J Physiol*. 1998;508 ( Pt 2):379-92.

Larriba S, Bassas L, Gimenez J, Ramos MD, Segura A, Nunes V, et al. Testicular CFTR splice variants in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Mol Genet.* 1998;7(11):1739-43.

Leonard A, Lebecque P, Dingemanse J, Leal T. A randomized placebo-controlled trial of miglustat in cystic fibrosis based on nasal potential difference. *J Cyst Fibros.* 2012;11(3):231-6.

Lewandowska MA, Costa FF, Bischof JM, Williams SH, Soares MB, Harris A. Multiple mechanisms influence regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43(3):334-41.

Li C, Ramjeesingh M, Wang W, Garami E, Hewryk M, Lee D, et al. ATPase activity of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* 1996;271(45):28463-8.

Loirat F, Hazout S, Lucotte G. G542X as a probable Phoenician cystic fibrosis mutation. *Hum Biol.* 1997;69(3):419-25.

Loumi O, Ferec C, Mercier B, Creff J, Fercot B, Denine R, et al. CFTR mutations in the Algerian population. *J Cyst Fibros.* 2008;7(1):54-9.

Lubamba B, Dhooghe B, Noel S, Leal T. Cystic fibrosis: insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clin Biochem.* 2012;45(15):1132-44.

Lubamba B, Lebacq J, Lebecque P, Vanbever R, Leonard A, Wallemacq P, et al. Airway delivery of low-dose miglustat normalizes nasal potential difference in F508del cystic fibrosis mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(11):1022-8.

Lucarelli M, Pierandrei S, Bruno S-M, Strom R. The Genetics of CFTR: Genotype – Phenotype Relationship, Diagnostic Challenge and Therapeutic Implications. InTech, 2012. ISBN: 978-953-51-0287-8. DOI: 10.5772/30281.

Lukacs GL, Mohamed A, Kartner N, Chang XB, Riordan JR, Grinstein S. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart ( $\Delta$ F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J.* 1994;13(24):6076-86.

Mak V, Jarvi KA, Zielenski J, Durie P, Tsui LC. Higher proportion of intact exon 9 CFTR mRNA in nasal epithelium compared with vas deferens. *Hum Mol Genet.* 1997;6(12):2099-107.

Maquat LE, Carmichael GG. Quality control of mRNA function. *Cell.* 2001;104(2):173-6.

Mateu E, Calafell F, Ramos MD, Casals T, Bertranpetit J. Can a place of origin of the main cystic fibrosis mutations be identified? *Am J Hum Genet.* 2002;70(1):257-64.

Matsui H, Verghese MW, Kesimer M, Schwab UE, Randell SH, Sheehan JK, et al. Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces. *J Immunol.* 2005;175(2):1090-9.

McCarthy VA, Harris A. The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol.* 2005;40(1):1-8.

McLachlan G, Davidson H, Holder E, Davies LA, Pringle IA, Sumner-Jones SG, et al. Pre-clinical evaluation of three non-viral gene transfer agents for cystic fibrosis after aerosol delivery to the ovine lung. *Gene Ther.* 2011;18(10):996-1005.

Meacham GC, Lu Z, King S, Sorscher E, Tousson A, Cyr DM. The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO J.* 1999;18(6):1492-505.

Morrall N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez J, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation ( $\Delta$ F508) in European populations. *Nat Genet.* 1994;7(2):169-75.

Morrall N, D'rk T, Llevadot R, Dziadek V, Mercier B, FÈrec C, et al. Haplotype analysis of 94 cystic fibrosis mutations with seven polymorphic CFTR DNA markers. *Hum Mutat.* 1996;8(2):149-59.

---

## N

Niksic M, Romano M, Buratti E, Pagani F, Baralle FE. Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9. *Hum Mol Genet.* 1999;8(13):2339-49.

Noël S, Wilke M, Bot AG, De Jonge HR, Becq F. Parallel improvement of sodium and chloride transport defects by miglustat (n-butyldeoxynojirimycin) in cystic fibrosis epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;325(3):1016-23.

Norez C, Antigny F, Noel S, Vandebrouck C, Becq F. A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(2):217-25.

---

## O

Osborne L, Santis G, Schwarz M, Klinger K, D'rk T, McIntosh I, et al. Incidence and expression of the N1303K mutation of the cystic fibrosis (CFTR) gene. *Hum Genet*. 1992;89(6):653-8.

---

## P

Pagani F, Buratti E, Stuani C, Romano M, Zuccato E, Niksic M, et al. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. *J Biol Chem*. 2000;275(28):21041-7.

Parad RB, Comeau AM. Diagnostic dilemmas resulting from the immunoreactive trypsinogen/DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm. *J Pediatr*. 2005;147(3 Suppl):S78-82.

Pollet JF, Van Geffel J, Van Stevens E, Van Geffel R, Beauwens R, Bollen A, et al. Expression and intracellular processing of chimeric and mutant CFTR molecules. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1500(1):59-69.

Price MP, Ishihara H, Sheppard DN, Welsh MJ. Function of *Xenopus* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl channels and use of human-*Xenopus* chimeras to investigate the pore properties of CFTR. *J Biol Chem*. 1996;271(41):25184-91.

Prickett M, Jain M. Gene therapy in cystic fibrosis. *Transl Res*. 2013;161(4):255-64.

---

## Q

Qu BH, Strickland E, Thomas PJ. Cystic fibrosis: a disease of altered protein folding. *J Bioenerg Biomembr.* 1997;29(5):483-90.

---

## R

Rave-Harel N, Kerem E, Nissim-Rafinia M, Madjar I, Goshen R, Augarten A, et al. The molecular basis of partial penetrance of splicing mutations in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet.* 1997;60(1):87-94.

Raviv U, Giasson S, Kampf N, Gohy JF, Jèroeme R, Klein J. Lubrication by charged polymers. *Nature.* 2003;425(6954):163-5.

Redman JB, Fenwick RG, Fu YH, Pizzuti A, Caskey CT. Relationship between parental trinucleotide GCT repeat length and severity of myotonic dystrophy in offspring. *JAMA.* 1993;269(15):1960-5.

Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):218-27.

Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:701-26.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989;245(4922):1066-73.

Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr.* 1998;132(4):589-95.

Rozmahel R, Heng HH, Duncan AM, Shi XM, Rommens JM, Tsui LC. Amplification of CFTR exon 9 sequences to multiple locations in the human genome. *Genomics.* 1997;45(3):554-61.

---

## S

Santis G, Osborne L, Knight R, Hodson ME, Ramsay M. Genetic influences on pulmonary severity in cystic fibrosis. *Lancet*. 1990;335(8684):294.

Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, et al. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(10):1262-72.

Sermet-Gaudelus I, Renouil M, Fajac A, Bidou L, Parbaille B, Pierrot S, et al. In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Med*. 2007;5:5.

Sermet-Gaudelus I, Roussel D, Bui S, Deneuille E, Huet F, Reix P, et al. The CF-CIRC study: a French collaborative study to assess the accuracy of cystic fibrosis diagnosis in neonatal screening. *BMC Pediatr*. 2006;6:25.

Serre JL, Simon-Bouy B, Mornet E, Jaume-Roig B, Balassopoulou A, Schwartz M, et al. Studies of RFLP closely linked to the cystic fibrosis locus throughout Europe lead to new considerations in populations genetics. *Hum Genet*. 1990;84(5):449-54.

Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*. 1999;79(1 Suppl):S23-45.

Sondo E, Tomati V, Caci E, Esposito AI, Pfeffer U, Pedemonte N, et al. Rescue of the mutant CFTR chloride channel by pharmacological correctors and low temperature analyzed by gene expression profiling. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;301(4):C872-85.

Strom CM, Huang D, Buller A, Redman J, Crossley B, Anderson B, et al. Cystic fibrosis screening using the College panel: platform comparison and lessons learned from the first 20,000 samples. *Genet Med*. 2002;4(4):289-96. doi: 10.109700125817-200207000-00007. PubMed PMID: 12172395.

Strong TV, Wilkinson DJ, Mansoura MK, Devor DC, Henze K, Yang Y, et al. Expression of an abundant alternatively spliced form of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene is not associated with a cAMP-activated chloride conductance. *Hum Mol Genet*. 1993;2(3):225-30.

Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science*. 1995;269(5225):847-50.

Stutts MJ, Rossier BC, Boucher RC. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inverts protein kinase A-mediated regulation of epithelial sodium channel single channel kinetics. *J Biol Chem*. 1997;272(22):14037-40.

Suaud L, Yan W, Rubenstein RC. Abnormal regulatory interactions of I148T-CFTR and the epithelial Na<sup>+</sup> channel in *Xenopus* oocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(1):C603-11.

Sutherland GR, Richards RI. Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(9):3636-41.

Szollosi A, Vergani P, Csányi L. Involvement of F1296 and N1303 of CFTR in induced-fit conformational change in response to ATP binding at NBD2. *J Gen Physiol*. 2010;136(4):407-23.

---

## T

---

Tabcharani JA, Low W, Elie D, Hanrahan JW. Low-conductance chloride channel activated by cAMP in the epithelial cell line T84. *FEBS Lett*. 1990;270(1-2):157-64.

Tabcharani JA, Linsdell P, Hanrahan JW. Halide permeation in wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels. *J Gen Physiol*. 1997;110(4):341-54.

Tarran R, Grubb BR, Parsons D, Picher M, Hirsh AJ, Davis CW, et al. The CF salt controversy: in vivo observations and therapeutic approaches. *Mol Cell*. 2001;8(1):149-58.

Teng H, Jorissen M, Van Poppel H, Legius E, Cassiman JJ, Cuppens H. Increased proportion of exon 9 alternatively spliced CFTR transcripts in vas deferens compared with nasal epithelial cells. *Hum Mol Genet*. 1997;6(1):85-90.

Thomas PJ, Shenbagamurthi P, Sondak J, Hullihen JM, Pedersen PL. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Effects of the most common cystic fibrosis-causing mutation on the secondary structure and stability of a synthetic peptide. *J Biol Chem*. 1992;267(9):5727-30.

Tsui LC. Mutations and sequence variations detected in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene: a report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Hum Mutat.* 1992;1(3):197-203.

Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science.* 1985;230(4729):1054-7.

---

## V

Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature.* 2005;433(7028):876-80.

Verhaeghe C. Année Académique 2006-2007. Etude des mécanismes moléculaires responsables d'un état inflammatoire intrinsèque dans la mucoviscidose. Université de Liège Faculté de sciences. Laboratoire de génétique Humaine. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences.

Voilley N, Bassilana F, Mignon C, Merscher S, Mattèi MG, Carle GF, et al. Cloning, chromosomal localization, and physical linkage of the beta and gamma subunits (SCNN1B and SCNN1G) of the human epithelial amiloride-sensitive sodium channel. *Genomics.* 1995;28(3):560-5.

Voilley N, Lingueglia E, Champigny G, Mattèi MG, Waldmann R, Lazdunski M, et al. The lung amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> channel: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis, and molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(1):247-51.

---

## W

Wainwright BJ, Scambler PJ, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, et al. Localization of cystic fibrosis locus to human chromosome 7cen-q22. *Nature.* 1985;318(6044):384-5.

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1982;1(8):945-51.

Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet.* 2007;8(10):749-61.

Wang J, Smith PJ, Krainer AR, Zhang MQ. Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(16):5053-62.

Ward CL, Kopito RR. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem.* 1994;269(41):25710-8.

Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell.* 1993;73(7):1251-4.

Wilschanski M, Famini C, Blau H, Rivlin J, Augarten A, Avital A, et al. A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(3 Pt 1):860-5.

Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, et al. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med.* 2003;349(15):1433-41.

---

## Y

---

Yu S, Pritchard M, Kremer E, Lynch M, Nancarrow J, Baker E, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science.* 1991;252(5009):1179-81.

---

## Z

---

Zalloua PA, Platt DE, El Sibai M, Khalife J, Makhoul N, Haber M, et al. Identifying genetic traces of historical expansions: Phoenician footprints in the Mediterranean. *Am J Hum Genet.* 2008a;83(5):633-42.

Zalloua PA, Xue Y, Khalife J, Makhoul N, Debiante L, Platt DE, et al. Y-chromosomal diversity in Lebanon is structured by recent historical events. *Am J Hum Genet.* 2008b;82(4):873-82.

Zhang D, Ciciriello F, Anjos SM, Carissimo A, Liao J, Carlile GW, et al. Ouabain Mimics Low Temperature Rescue of F508del-CFTR in Cystic Fibrosis Epithelial Cells. *Front Pharmacol.* 2012;3:176.

# CURRICULUM VITAE ET PUBLICATIONS

## **Raëd FARHAT**

Nationalité Libanaise

28 ans

Né le 02/09/1985 à Beyrouth

Tel. Mobile: +33 6 49 888 352

12, Rue Louis Pasteur, Résidence Michel Foucault, B104, 86000 POITIERS

Email: [raed.farhat@univ-poitiers.fr](mailto:raed.farhat@univ-poitiers.fr)

**Doctorant de l'Université de Poitiers**  
Secteur de Recherche Aspects Moléculaires et  
Cellulaires de la Biologie

## **Formation**

---

*Depuis Janvier 2011*

### **Doctorant**

Soutenance prévue le 3 Juillet 2014

Université de Poitiers, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées, Laboratoire de Génétique Moléculaire de Maladies Rares

Multiplés conséquences physiopathologiques de mutations et d'allèles complexes du gène *CFTR* : l'importance des études génétique, moléculaire, cellulaire & *in silico* dans la détermination de l'impact de ces variations sur l'épissage et la protéine.

*2007-2010*

### **Master Recherche en Biochimie**

Université Saint-Esprit de Kaslik, Faculté des Sciences et de Génie Informatique, Département "Chimie et Sciences de la Vie".

Spécialité Pharmacologie et Cosmétologie (Avec les Cours de l'option génétique).

Moyenne Générale: 88.88/100

Mémoire en pharmacogénétique : Evaluation de l'effet des polymorphismes du gène *Cyp1A1* sur la susceptibilité aux cancers pulmonaires chez des patients libanais. Note finale : 95/100

*2003-2007*

### **Licence en Biochimie**

Université Saint-Esprit de Kaslik, Faculté des Sciences et de Génie Informatique, Département "Chimie et Sciences de la Vie".

Moyenne Générale : 82.9/100

Cours théoriques relatifs à tous les domaines de la biochimie

15 heures de laboratoire/cours

Une vingtaine de projets présentés par écrit et oral

*1988-2003*

### **Baccalauréat Français**

Lycée Français-Mission Laïque Française, Nahr Ibrahim, Jounieh, Liban

Série: Scientifique, Spécialité: Sciences de la Vie et de la Terre

## Expériences Professionnelles

---

*Mars 2014*

**Agent Temporaire Vacataire**

Université de Poitiers, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

16 heures de travaux pratiques

TP Méthodologie de Recherche Biomédicale, Niveau L2, Extraction de l'ADN d'une culture cellulaire, détermination de la qualité et quantité de l'ADN

*Mai 2013*

**Agent Temporaire Vacataire**

Université de Poitiers, CNRS, UMS 2268, Juriscope

Dactylographe des documents de traduction d'une loi française en langues arabes

*Mars 2013*

**Agent Temporaire Vacataire**

Université de Poitiers, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

54 heures de travaux pratiques et 12 heures de travaux dirigés.

TP Stabilité et Variabilité du Génome, Niveau L3, Réalisation de caryotypes humain et murin, observations, comptage et comparaison des chromosomes

TP Expérimentation en Biologie, Niveau L1, Extraction de l'ADN d'une culture cellulaire, détermination de la qualité et quantité de l'ADN

TP Electrochimie, Niveau L1, Détermination du pKa d'une solution acide-base

TD Expérimentation en Biologie, Niveau L1, Techniques d'extraction et de purification des protéines et de l'ADN, dosage quantitatif et qualitatif

*Mars 2012*

**Agent Temporaire Vacataire**

Université de Poitiers, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

6 heures de travaux pratiques

TP Stabilité et Variabilité du Génome

*Depuis 2012*

**Co-encadrement de stagiaires niveaux L3, M1 et M2**

Université de Poitiers, Laboratoire de Génétique Moléculaire de Maladies Rares

Co-encadrer des stagiaires dans les expériences et les rapports nécessaires pour la validation de leurs stages effectués dans le laboratoire

*2009-2010*

**Chargé des rémunérations et des avantages sociaux**

Ressources Humaines, « ABC Group », Dbayeh, Liban

Responsable des dossiers et des salaires de plus de 700 employés

*Eté 2009*

**Stagiaire en contrôle de qualité alimentaire**

Département Contrôle Qualité, « Hawa Chicken », Safra, Liban

Vérification des étapes de la production selon les normes de qualité (ISO 22000)

*Eté 2006*

**Stagiaire dans un laboratoire médical**

Laboratoire « Memmer Lab », Jounieh, Liban

Observation des tests effectués

Initiation à l'utilisation des machines d'analyse

Présentation d'un Rapport de stage (note: 90/100)

*2005-2009*

**Cours particuliers** en Biologie, Chimie, et Mathématiques

## Valorisation de la thèse

---

### Articles présents dans le rapport de thèse

**Article 1, Accepté en premier auteur:** Biochemistry and Cell Biology, Multi-physiopathological consequences of the c.1392G>T CFTR mutation revealed by clinical and cellular investigations

**Article 2, Rédigé:** Probable Phoenician origin of the c.3909C>G mutation and its impact on CFTR protein processing and of its complex allele on splicing

**Article 3, Rédigé:** Impact of the c.965T>C (p.Val322Ala) mutation on the CFTR protein in a Brittany family.

**Article 4, Accepté en second auteur:** Health 2014 (Scientific Research), Minigene analysis of the c.743+40A>G intronic variant in the CFTR gene

### Juin 2013

**35<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Society Conference,** Lisbonne, Portugal

**Communication affichée:** Detection of a novel complex allele c.[869+11C>T;3909C>G] in *CFTR* gene

**Résumé publié** dans "Journal of Cystic Fibrosis, Vol.12 Suppl. 1, June 2013, ISSN 1569-1993, Abstracts of the 36th European Cystic Fibrosis Conference, Lisbon, Portugal, 12-15 June 2013"

### Mars 2013

**7<sup>th</sup> European CF Young Investigator Meeting,** Paris, France

**Communications orale et affichée:** Multi-physiopathological consequences of the c.1392G>T mutation.

### Février 2013

**13<sup>eme</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs Français,** Association Vaincre la Mucoviscidose, Paris, France

**Communication affichée:** Multi-physiopathological consequences of the c.1392G>T mutation.

### Juin 2012

**35<sup>th</sup> European Cystic Fibrosis Society Conference,** Dublin, Irlande

**Communications orale et affichée:** Co-implication of mutations in 5' and 3' regions of CFTR exon 10 in its alternative splicing: prediction to pathology.

**Résumé publié** dans le "Journal of Cystic Fibrosis, Vol.11 Suppl. 1, June 2012, ISSN 1569-1993, Abstracts of the 35th European Cystic Fibrosis Conference, Dublin, Ireland, 6-9 June 2012"

### Avril 2012

**12<sup>eme</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs Français,** Association Vaincre la Mucoviscidose, Paris, France

**Communication affichée:** Etude de la mutation c.3909C>G sur sa fréquence dans la population libanaise, son impact sur l'épissage et sur la protéine.

### Février 2011

**11<sup>eme</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs Français,** Association Vaincre la Mucoviscidose Paris, France

## Formations

---

*De Janvier 2011 à Mars 2013*

### **Formations de l'École Doctorale Biosanté**

Université de Poitiers, Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées

Séminaire résidentiel de trois jours: Lac d'Egletons, France

Thème: De la molécule au médicament

Conduite de Thèse: Rôle du doctorant dans une équipe, ses droits et ses devoirs, gestion du temps, maintien du carnet de laboratoire et présentation des travaux des doctorants

Encadrement d'équipe: Techniques d'encadrement d'une équipe, Moyens de communication, Répartitions des tâches

Endnote: Initiation au programme EndNote et EndNote web

### **Formation de la Plateforme ImageUp**

Université de Poitiers, Pole Biologie santé

Initiation aux plateformes de Cryométrie, Microscopie Electronique et Microscopie Confocale

## Compétences

---

### **Techniques de Laboratoire**

Techniques du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire: PCR, Séquençage, Clonage, Extraction d'ADN, d'ARN et de Plasmides, Mutagénèses Dirigées, Culture de Cellules Eucaryotes, Transfections, Microscopie Confocale

Techniques de Biochimie: Extraction de protéines, Western Blot

Techniques de Microbiologie et Culture bactérienne: Culture DH5a, Culture Bactérienne, Transformation, Clonage

Collecte des échantillons et questionnaires pour des études épidémiologiques: Biopsies, Sang

Techniques du laboratoire de Chimie et des Machines d'Analyse de Biochimie analytique: HPLC, GC-MS

### **Présentation, Informatique et Multimédia**

Utilisation des logiciels de Microsoft Office: Word, Excel, Power Point

Utilisation des logiciels d'Apple: KeyNote, Pages, Numbers, Photoshop Utilisation des logiciels de Bioinformatique: ChemDraw, ImageJ, Swiss-Model, Single Nucleotide Polymorphis, Human Slicing Finder

Utilisation des logiciels de Comptabilité et Statistique: JD Edward, SPSS, statistique de petits échantillons

Utilisation des équipements et logiciels d'Audio-visuel: FinalCut

## Langues

---

### **Trilingue**

Français: Langue d'enseignement, Anglais: Langue enseignée comme LV1, Arabe: Langue enseignée comme LV2 Italien: Débutant

## Activités et Centres d'intérêt

---

*De Novembre 2011 à Mars 2013*

**Vice-Président puis Président de l'Association PictaCèdres**, Association Franco-Libanaise à Poitiers (Restructuration interne de l'association fondée en 2001, Diversification des événements, Augmentation de la visibilité de l'association dans la ville de Poitiers, Participation à des événements avec des nouveaux partenaires et d'autres associations)

*Janvier 2012*

**Créateur et animateur du premier Journal Club de l'Institut de Physiologie et Biologie Cellulaire**, Première structure de rencontre des doctorants de l'institut

*Eté 2010*

**Plongée sous-marine**, Open Water Diver

*Hiver 2002*

**Astronomie**, Diplôme en Introduction à l'astronomie

## Références

---

**Professeur Alain KITZIS** +33 05 49 45 49 73

Responsable du Laboratoire de Génétique à l'Université de Poitiers

**Docteur Véronique LADEVEZE** +33 5 49 45 49 77

Directeur du projet de thèse à l'Université de Poitiers

**Professeur Naim OUAINI** +961 3 768 625

Chef de département de biochimie de la faculté des sciences et du génie informatique, Université Saint-Esprit de Kaslik

**Docteur Magida JALBOUT** +961 3 166 423

Encadrant du mémoire, faculté des sciences et du génie informatique, Université Saint-Esprit de Kaslik

**Madame Cassandra ZGHEIB** +961 3 998 163

Coordinatrice de l'unité de rémunérations et avantages sociaux aux ressources humaines, ABC

# Minigene analysis of the c.743+40A>G intronic variant in the *CFTR* gene

Ayman El-Seedy,<sup>1‡</sup> Raed Farhat,<sup>1</sup> Marie-Claude Pasquet,<sup>1,2</sup> Alain Kitzis,<sup>1,2</sup> and Véronique Ladeveze<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Génétique Moléculaire de Maladies Rares, Pôle Biologie Santé, Université de Poitiers, 86073 Poitiers cedex 9, France ; <sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers, 86021 Poitiers, France

‡ Present address: Department of Genetics, Alexandria University, Aflaton St.-EL-Shatby, Alexandria 21545, Egypt

Email: veronique.ladeveze@univ-poitiers.fr

Received \*\*\*\* 2014

Copyright © 2014 by EL-Seedy *et al.*, and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



---

## Abstract

Since the identification of the cystic fibrosis transmembrane regulator (*CFTR*) gene in 1989, many polymorphisms have been identified in cystic fibrosis (CF) or *CFTR*-related disorders (*CFTR*-RDs) patients and still remain to be characterized at the molecular level. These polymorphisms are difficult to classify as pathogenic or non-disease causing because the polymorphisms are either located in the coding region, but are synonymous, or are found in the intronic regions. Here we investigated the potential impact of the c.743+40A>G polymorphism within *CFTR* intron 6 on the alternative splicing. Indeed, this variant has been observed frequently in our examined patients. Moreover, a family carrying this variant exhibited *CFTR*-RD phenotype.

**Methods:** By denaturing high pressure liquid phase chromatography (DHPLC) and sequencing, thirty of 293 subjects French origin were carried the c.743+40A>G variant. Of these 16 patients were affected by CF or CFTR-RD. Wild-type sequences and mutant *CFTR* intron 6 and its boundaries were inserted into the pTBNdeI hybride minigene and expressed in three different cell lines. After RT-PCR analysis of mRNA using specific primers, sequences of the minigene transcripts were obtained.

**Results:** No aberrant splicing was detected with minigene carrying c.743+40A>G variant in all transfected cell lines. However, an alternative splicing in the positive control was detected with a minigene carrying the c.1392G>T+1G>T mutation: 5 nucleotides were deleted from mRNA sequences, indicating that used cell lines are appropriate for studying the splicing.

**Conclusion:** Transient transfections of a minigene containing the c.743+40A>G polymorphism showed no splicing errors, and thus this intronic alteration was finally classified as non-pathogenic. As it is always associated with c.2562T>G and c.4389G>A, or TG12-7T polymorphisms, further experiments are needed to determine the role of these complex alleles in disease pathogenesis.

### Keywords

Cystic fibrosis, polymorphism, complex allele, hybrid minigene, splicing

---

## 1. Introduction

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive genetic disorder caused by a variety of sequence alterations in the *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane regulator conductance) gene. Up to now, more than 1960 mutations and polymorphisms have been reported to the Cystic Fibrosis Mutation Database [1]. Genomic surveys indicate that polymorphisms affecting transcription and mRNA processing, including splicing and turnover, may account for the main share of genetic factors in human phenotypic variability; however, most of these polymorphisms remain yet to be understand [2]. After complete sequence analysis of the *CFTR* gene in various laboratories, many polymorphisms have been identified. Molecular and cellular studies have also uncovered a large number of putative mutations or

polymorphisms which showed phenotypic variability. For this reason, further studies are still needed to determine their eventual pathological effects. So, the comprehensive study will help in giving an accurate genetic counselling and prognosis for patients or individuals. In this respect, it is now clear that single nucleotide polymorphisms may also strongly influence gene expression at the splicing level [3]. Moreover, functional polymorphisms in the *CFTR* gene can alter the expression of the CFTR protein [3]. Previous studies have suggested that the most frequent polymorphism in *CFTR* gene, the c.1408A>G in exon 11, (p.Met470Val) plays a role in modulating CFTR protein at both the transcriptional and translational levels. It was reported that the Met470 CFTR was associated with a 1.7-fold of the Val470 CFTR function [4]. Similarly, the cDNA single-nucleotide polymorphisms c.2562T>G (exon 15) and c.4389G>A (exon 27) may affect RNA splicing by changing regulatory-sequence motifs of exonic splice enhancers, leading to increased lower amounts of normal transcripts [5]. In addition, the polythymidine variants in intron 9 are associated with the efficient usage of the intron 9 splicing acceptor site, and induce exon 10 skipping. The 5T results in approximately 90% of exon 10 skipping, leading to a non-functional CFTR, thereby is considered as a disease mutation with incomplete penetrance [6].

More recently, the c.743+40A>G polymorphism in intron 6 is found as a frequent polymorphism after an extensive molecular genetic investigation at the *CFTR* gene in french *CFTR*-related disorders (*CFTR*-RDs) patients. It was classified as non-*CF*-causing allele on the basis of its frequency [7]. This polymorphism has sporadically been observed as uncommon in Uruguayan [8]; Slovak [9], and Algerian patients [10] but relatively frequent (2.5%-4.0%) in Spanish patients [11].

Interestingly, we present here a family carrying the c.743+40A>G polymorphism in cis with c.2562G and c.4389T variants on the same allele in exons 15 and 27 respectively whereas each of them has no effect on CFTR. The father and his son had pancreatic inflammation with elevated sweat chloride levels in the absence of cystic fibrosis or any deleterious mutation. In order to investigate the eventual pathogenicity of the c.743+40A>G polymorphism we examine its effect upon mRNA level *in cellulo* using cultured cell-line (HeLa, HT29, HEK293) for minigene expression, a highly sensitive tool used to regularly screen putative CFTR mutations in CF patients.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Ethics statement

The study was performed according to French legislation and the recommendations of the local ethics committee in accordance with the Declaration of Helsinki. Written consent to the genetic study was obtained from all patients before withdrawal of blood as well as their permission for publication.

### 2.2. Mutation nomenclature

The recommendations of the Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) were followed for exon numbering and mutation names. The current recommendations suggest using +1 as the A of the initiation ATG codon in the the CFTR cDNA sequence (GenBank [NM\\_000492.2](#)) as the reference sequence.

### 2.3. Analysis of c.743+40A>G variant in the general population

Between April 2007 and January 2010, 640 subjects French origin had been referred to our CF Center at the Hospital of Poitiers (CHU), for genetic counseling purposes were examined. All genomic DNA samples were extracted from peripheral blood cells using the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen) according to the supplier's protocol. Extensive *CFTR* gene analyses were performed in the patients using a combination of methods: (i) screening for frequent mutations using diverse commercial assays; (ii) scanning of the 27 exons and their boundaries using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [12], or denaturing high pressure liquid phase chromatography (DHPLC) [13]. The screening of the c.743+40A>G variant has been performed by DHPLC analysis followed by automated DNA sequencing. PCR primers were: forward primer 5'-TCCTTTTACTTGCTTTCTTTCA-3' (HPCF-6aA) and reverse 5'-TATGCATAGAGCAGTCCTGGTT-3' (HPCF-6aB). The PCR conditions were as follows: denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 55°C for 30 s and extension at 74°C for 40 s, for 32 cycles. DNA samples of cases were analysed by previously reported methods. All 27 exons of *CFTR* were amplified by PCR followed by direct sequencing of all exons and exon-intron boundaries.

### 2.4. Generation of the minigene constructs

The construction and validation of the hybrid minigene used in this study has been described elsewhere [14]. Briefly, a 1666bp PCR fragment encompassing exon6 and exon7

and its flanking introns were amplified from normal and mutated human genomic DNA. After restriction enzyme digestion of used plasmid by *NdeI* restriction enzyme site, PCR products were inserted into pTB*NdeI* plasmid (kindly donated by F. Pagani). All hybrid minigene constructs were sequenced to verify the correct insertion of the wild-type and mutated DNA fragments with 2,3 $\alpha$  and BraRev primers (Table 1). For the construction of the positive control c.1392+1G>T, after insertion of the 483bp fragment containing exon 10 and its adjacent introns, site directed mutagenesis was performed on the minigene containing the wild-type fragment with forward primer 5'GATCCACTGGAGCAGGCAAGTTAGTTCTTTTGT'3 and reverse primer 5'CTTGCTGCTCCAGTGGATCCAGCAACCGC'3. Presence of the desired mutation and absence of PCR-artifacts were confirmed by sequencing.

## 2.5. Transfection, RNA isolation and RT-PCR amplification

Cells were grown in a DMEM medium with Glutamax-I (Life Technologies) amended with 10% fetal bovine serum (FBS,Gibco), and 100 unit/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin in a humidified incubator at 37°C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. WT and CFTR mutants were transiently expressed in HeLa, HT 29 and HEK 293 cells following the use of LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions. At least three independent transfections were performed in these three different lines. cDNA synthesis was carried out at 37°C for 1 hour. The reaction was stopped by 2 minute incubation at 100°C. RT-PCR was performed using primers designed for the exons of plasmid (Table 1). PCR was performed using a 9700 GeneAmp Thermo Cycler (Perkin Elmer) under the following cycling conditions: initial denaturation at 94°C for 2 minutes, followed by 30 cycles at: 94°C for 30 seconds, 58°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, followed by a final 5 minutes extension step at 72°C. The reaction was verified by 1.5% agarose gel electrophoresis.

## 2.6. DNA sequence analysis

Sequence analysis was performed using the ABI PRISM™ Big Dye Terminator™ Cycle Sequencing Ready Kit (Applied Biosystems) and analyzed on an ABI PRISM™ 3130 automatic sequencer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocols. The obtained sequences were compared with the published sequence database (available at <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app>).

## 2.7. Splice-site predictions

In order to identify the potential impact of the c.743+40A>G variant on splicing, *in silico* analyses were performed with mutant and reference sequences using four different programs: Neural Network SPLICE (NNSplice) 0.9 from the Berkeley Drosophila Genome Project (available at [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)), NetGene2 (available at <http://www.cbs.dtu.dk/service/NetGene2/>), Human Splicing Finder (HSF)-Version 2.4 (available at <http://www.umd.be/HSF/>), and Putative Exonic Splicing (PESX) (available at <http://cubweb.biology.columbia.edu/Pesx/>).

## 3. RESULTS

### 3.1. Analysis of c.743+40A>G variant in the general population

During the genetic characterization of the 640 enrolled subjects, 293 participants have completed the comprehensive examination of intron 6. Of these, 30 were carried the c.743+40A>G polymorphism within *CFTR* intron 6. 16 patients of them were initially screened on the basis of complete clinical symptoms and were diagnosed as having CF or CFTR-RD. **Figure 1** shows the abnormal DHPLC profile of the target variant in these patients. There is a high degree of phenotypic variability associated with this polymorphism. The c.743+40A>G allele was found in patients presenting: suspected CF (n=2), congenital bilateral absence of vas deference (CBVAD) (n=1), other causes of infertility (n=7), disseminated bronchiectasis (n=2), pulmonary disease (n=2), and hyperechogenicity (n=2). Detailed information on *CFTR* genotype and clinical data from selected CF or CFTR-RD patients for this study had been reported in **Table 2**. TG12-7T haplotype were found in 9 patients. Two cases with the TG12-5T were found in the CBAVD and infertility patients suggesting that the haplotype TG12-5T might be the most common disease-associated combination and impair the process of CBAVD.

### 3.2. Family Data

Here we present the main clinical feature of the family members. The family studied has the c.743+40A>G polymorphism, in association with c.2562T> G (exon 15), and the c.4389G>A (exon 27) polymorphisms in cis. The father has major health problems but not cystic fibrosis. This patient has a history of chronic diarrhea, but now can lead to a number of tools extremely important (40 to 50 per day), and while the specific genes for pancreatitis are normal (tested at the University Hospital of Brest). In addition, there is a suspicion of asthma since childhood related to nocturnal and wheezing dyspnea. The mother has one normal allele, and the other one c.2562T> G (exon 15) and c.4389G> A (exon 27). She shows no sign of deleterious symptoms. The couple has 2 children, and both carry the father's allele c.743+40A>G. The son in good health carries the WT allele of the mother, and the

other one has the mutant allele from the mother and he has a pathology of type CFTR-RD, but less severe than his father.

### 3.3. Splice-site predictions

The effect of the predicted splicing variant (c.743+40A>G) was first analyzed by computer-assisted splice-site prediction using the NNSplice, and NetGene2 programs. The programs recognized the wild-type as well as the mutant splice site without any appreciable score reduction. Conversely, HSFv2.4.1 program analysis revealed that the donor-site score ranged from 2.54 in the absence of polymorphism, to 3.37 when the substitution took place. Finally, PESX analysis showed minor changes in ESS distribution, whereas Rescue-ESE showed no change either in the wild-type or in the mutant sequence.

### 3.4. CFTR Minigene Analysis of c.743+40A>G in Intron 6

We investigated the effect of c.743+40A>G variant using a hybrid minigene splicing approach. The primers used do not amplify eventual ectopically expressed *CFTR* and a 1666pb fragment specific was obtained ([Figure 2A&B](#)). After transfections, the 540 bp products are due to the correct splicing of intron 6 and its flanking exons, indicating that this polymorphism did not induce any aberrant splicing in the minigene assay ([Figure 2C](#)). Direct sequence showed a correct splicing (exon 6-exon 7). As we tested two times (24h and 48h) our data suggested that the mutant RNA was correctly spliced and stably expressed ([Figure 2C](#)). Whereas the positive control minigenes which contained c.1392+1G>T (or G>C) mutations were composed of exon10 and its flanking introns of the *CFTR* gene ([Figure 3A](#)). DNA sequence of RT-PCR products generated with c.1392+1G>T (or G>C) mutations showed a frameshift transcript, deleted of 5 nucleotides of exon 10 ([Figure 3B](#)), demonstrating that the cell lines used in this study were adapted to estimate splicing ([Figure 3C](#)). These experiments were repeated three times independently in three types of cells.

## 4. Discussion

A significant fraction (about 13%) of *CFTR* mutations is classified as “splicing mutations”, but for almost 40% of these, their role in affecting the splicing is not yet defined. Splicing mutations act by directly disrupting splice sites or by creating new ones [15].

Studying the influence of polymorphisms on disease susceptibility in multiple ethnically and geographically distinct disease and control populations is important [16].

Over 200 polymorphisms have been identified within CFTR gene ([www.genet.sickkids.on.ca/cftr](http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr)). These do not cause CF, but may alter CFTR protein production and/or function. Such alterations may be clinically insignificant in individuals without additional CFTR mutations, but have an influence on disease phenotype in patients with co-existing mutations [17]. For example, the cDNA single-nucleotide polymorphisms c.2562T>G and c.4389G>A may affect pre-mRNA splicing by changing regulatory-sequence motifs of exonic splice enhancers, leading to increase skipping of exons 10 and 13 and lower amounts of normal transcripts [5].

This study aims at disclosing the new putative splicing polymorphism c.743+40A>G by hydride minigene assay beside its frequency in the general population. The clinical investigation and mutational data of patients, who had this polymorphism in the *CFTR* gene were identified. This finding has shown that this polymorphism is associated with CFTR-RD diseases. Moreover, in a family, this polymorphism is present in cis with c. 2562T> G and c.4389 G>A variants on the same allele in exons 15 and 27 respectively. The father has a severe pancreatic symptoms and his son has weak pancreatic inflammation with elevated sweat chloride levels in the absence of cystic fibrosis and any deleterious mutation. For this reason, we have chosen to study this nucleotide change. Here, we present epidemiological data in studied families. The c.743+40A>G polymorphism has been shown to be relatively frequent in French population (5%) whereas, only 4% in the Spanish population [11]. Other previous studies screening for this variant in patients have been reported [6,7,9]. Moreover, single nucleotide substitutions may have a profound effect on the splicing efficiency inducing both exon inclusion and skipping. The changes in the splicing pattern were modulated by the composition of the polymorphic TG/T locus in intron 9 [18]. Thus, we have investigated the effect of c.743+40A>G using minigene constructs; the results revealed that this variant could not induce aberrant splicing of intron 6. Therefore, this polymorphism could be considered as a non-pathogenic nucleotide change. However, we tested here only this polymorphism because it is the common point of characterized 16 patients. In the family presented, this polymorphism is always associated with c. 2562T> G and c.4389 G>A and we have no data concerning the effect of this complex allele on the CFTR splicing.

Nowadays, thousands of mutations are identified yearly. Although many directly affect protein expression, an increasing proportion of mutations is now believed to influence mRNA splicing. They mostly affect existing splice sites, but synonymous, non-synonymous or nonsense mutations can also create or disrupt splice sites or auxiliary *cis*-splicing sequences [19]. Furthermore, there are many mutations which identified as a putative splicing mutation not fully examined and confirmed its impact. Thus the use of an *in vitro* minigene assay could be extended to other mutations and polymorphisms believed to affect splicing.

## 5. Conclusions

This study concluded that the c.743+40A>G intronic variant has no clinical consequences on CFTR protein and could be classified as non-pathogenic polymorphism due to its effect on mRNA splicing. However, our conclusions have only been drawn from cell-culture experiments and transfection studies using *in vitro* minigene assay but *in vivo* assessment can validate the splicing outcome and provide justification for further experimental examination of patient samples, when available. These data provide a better characterization of this variant in CFTR-RD patients in France. In addition, the search for other associations with this polymorphism should be examined, especially with the complex alleles containing c.2562T>G and c.4389G>A, or TG12-7T. Further experiments are needed to determine the role of these complex alleles in the severity of CF disease.

**Acknowledgments:** This work was supported by Poitiers University and Hospital of Poitiers, France. We would like to thank James Habrioux for his assistance in preparation of the manuscript figures.

## References

- [1] <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>.
- [2] Wang, D. and Sadée, W. (2006) Searching for Polymorphisms That Affect Gene Expression and mRNA Processing: Example ABCB1 (MDR1). *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*, 8, 515-520.
- [3] Nielsen, K.B., Sørensen, S., Cartegni, L., Corydon, T.J., Doktor, T.K., Schroeder, L.D., Reinert, L.S., Elpeleg, O., Krainer, A.R., Gregersen, N., Kjems, J. and Andresen, B.S. (2007)

Seemingly Neutral Polymorphic Variants May Confer Immunity to Splicing-Inactivating Mutations: A Synonymous SNP in Exon 5 of *MCAD* Protects from Deleterious Mutations in a Flanking Exonic Splicing Enhancer. *American Journal of Human Genetics*, 80, 416-432.

- [4] Cuppens, H., Lin, W., Jaspers, M., Costes, B., Teng, H., Vankeerberghen, A., Jorissen, M., Droogmans, G., Reynaert, I., Goossens, M., Nilius, B. and Cassiman, JJ. (1998) Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (TG)<sub>m</sub> locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *Journal of Clinical Investigation*, 101, 487-496.
- [5] Steiner, B., Truninger, K., Sanz J., Schaller, A. and Gallati, S. (2004) The role of common single-nucleotide polymorphisms on exon 9 and exon 12 skipping in nonmutated CFTR alleles. *Human Mutation*, 24, 120-129.
- [6] Chu, C.S., Trapnell, B.C., Curristin, S., Cutting, G.R. and Crystal, R.G. (1993) Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nature Genetics*, 3, 151-156.
- [7] Bombieri, C., Giorgi, S., Carles, S., De Cid, R., Belpinati, F., Tandoi, C., Pallares-Ruiz C., Lazaro C., Ciminelli B.M., Romey M.C., Casals T., Pompei F., Gandini G., Claustres M., Estivill X., Pignatti PF. and Modiano G. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Claustres>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gandini> [G%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=10746558](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gandini)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gandini> [G%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=10746558](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Gandini)  
(2000) A new approach for identifying non-pathogenic mutations: an analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in normal individuals. *Human Genetics*, 106, 172-178.
- [8] Luzardo, G., Aznarez, I., Crispino, B., Mimbacas, A., Martínez, L., Poggio, R., Zielenski, J., Tsui, L.C. and Cardoso, H. (2002) Cystic fibrosis in Uruguay. *Genetics and Molecular Research*. 1, 32-38
- [9] Kolesar, P., Minarik, G., Baldovic, M., Ficek, A., Kovacs, L. and Kadasi, L. (2008) Mutation analysis of the CFTR gene in Slovak cystic fibrosis patients by DHPLC and sequencing: identification of four novel mutations. *General Physiology and Biophysics*, 27, 299-305

- [10] Loumia, O., Ferec, C., Mercier, B., Creff, J., Fercot, B., Denine, R. and Grangaud, J.P. (2008) CFTR mutations in the Algerian population. *Journal of Cystic Fibrosis*, 7, 54-59
- [11] Casals, T., Bassas, L., Egozcue, S., Ramos, M.D., Giménez, J., Segura, A., Garcia, F., Carrera, M., Larriba, A., Sarquella, J. and Estivill, X. (2000) Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Human Reproduction*, 15, 1476-1483
- [12] Fanen, P., Ghanem, N., Vidaud, M., Besmond, C., Martin, J., Costes, B., Plassa, F. and Goossens, M. (1992). Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics*, 13, 770-776.
- [13] Le Marechal, C., Audrezet, MP., Quere, I., Raquenes, O., Langonne, S. and Ferec, C. (2001) Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counselling. *Human Genetics*, 108, 290- 298.
- [14] Pagani, F., Buratti, E., Stuani, C., Romano, M., Zuccato, E., Niksic, M., Giglio, L., Faraguna, D., and Baralle, F.E. (2000) Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a non evolutionary conserved intronic element. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 21041-21047
- [15] Faa, V., Incani, F., Meloni, C.D., Masala, M., Baffico, A.M., Seia, M., Cao, A. and Rosatelli, M.C. (2009) Characterization of a Disease-associated Mutation Affecting a Putative Splicing Regulatory Element in Intron 6b of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 30024-30031
- [16] Janssen, R., Kruit, A., Grutters, J. C., Ruven, H. J. T., van Moorsel, C. M. H. and van den Bosch, J.M.M. (2005) TIMP-3 promoter gene polymorphisms in BFL. *Thorax*, 60, 974-975
- [17] Davies, J., Alton, E. and Griesenbach, U. (2005) Cystic fibrosis modifier genes. *Journal of the royal society of medicine*; 45, 47-54
- [18] Pagani, F., Stuani, C., Tzetis, M., Kanavakis, E., Efthymiadou, A., Doudounakis, S., Casals, T. and Baralle, F.E. (2003) New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Human Molecular Genetics*, 12, 1111-1120.

- [19] Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., and Bérout, C. (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Research*, 37, 215-220.

### **Abbreviations**

CF: Cystic Fibrosis

CFTR-RDs: CFTR-Related Disorders

DHPLC: Denaturing High Pressure Liquid phase Chromatography

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

CBAVD: congenital bilateral absence of vas deferens;

DB: disseminated bronchiectasis

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

Name	Sequence
<b>pTB2160Dir</b>	5'-TATTCAGATATTTATGTCTAGG-3'
<b>pTB2270Rev</b>	5'-CCCATGTGAGATATCTAGG-3
<b>2,3<math>\alpha</math>*</b>	5'-CAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTGC-3'
<b>BraRev*</b>	5'-AGGGTCACCAGGAAGTTGGTTAAATCA-3'

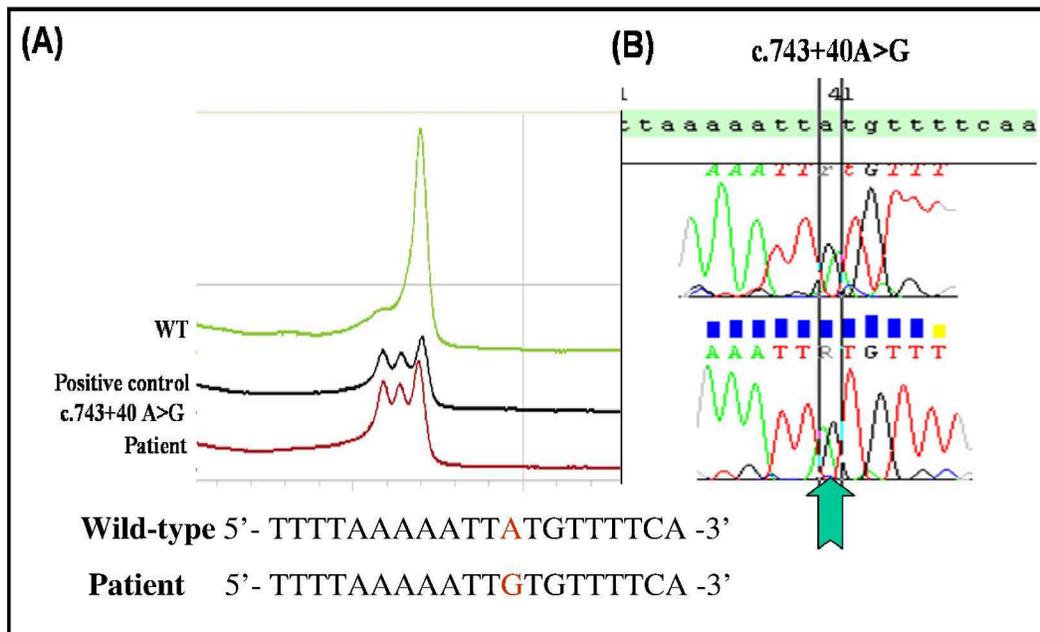
\*indicate the sequence of RT-PCR oligonucleotides

**Table 2. Characterization of *CFTR* mutations in 16 patients carried the c.743+40A>G polymorphism.**

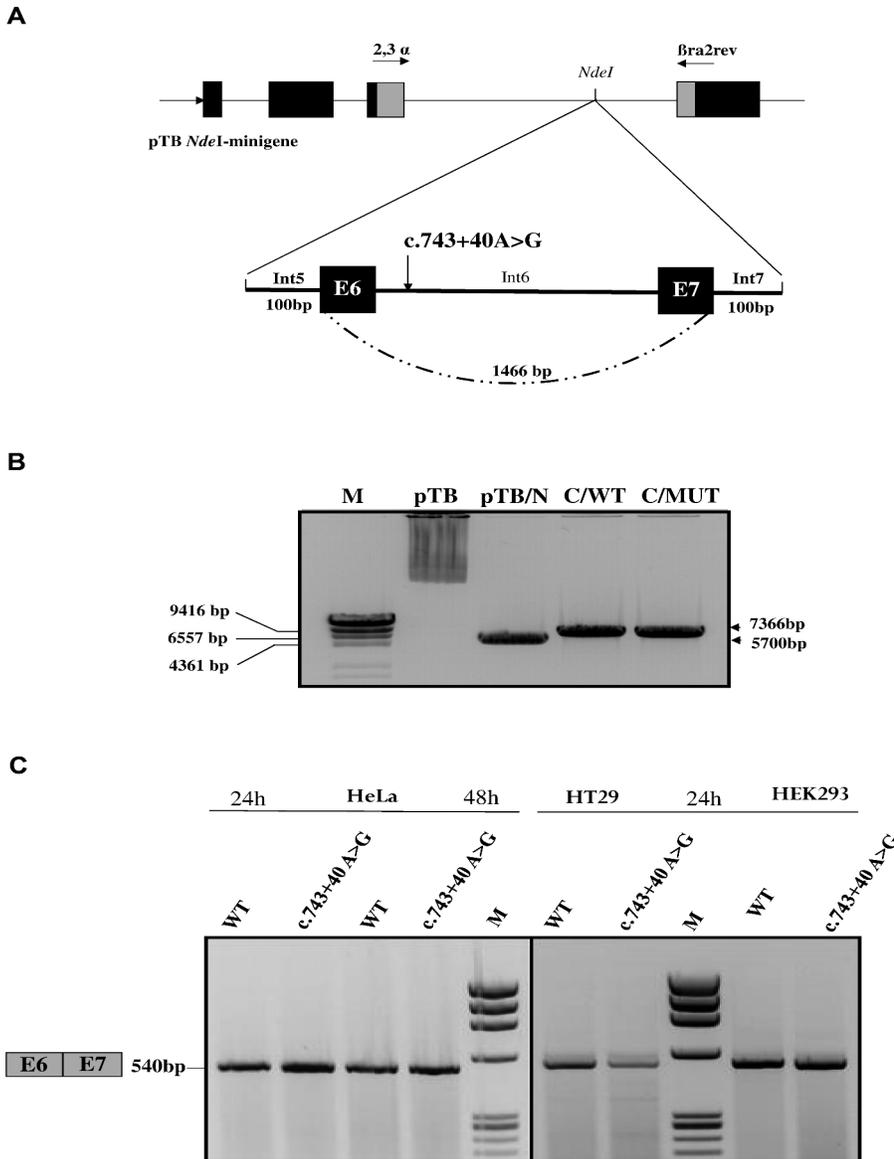
Patients	Identified Mutations	Other variations	Tn, TGm,	Clinical symptoms
1	c.2875delG	c.2562>G, c.4272C>T	7/7T, 10/12TG	Positive sweat test (Suspicion of CF?)
2	-	c.2562>G, c.4272C>T, c.4389G>A	7/7T, 10/11TG	Chronic diarrhea, asthma, pancreatitis
3	-	c.2562>G, c.4272C>T, c.1408A>G	7/9T, 10/10TG	DB
4	-	c.2562>G, c.4272C>T, c.4389G>A	7/9T, 10/11TG	Hyperrechogenecity
5	-	c.2562>G, c.4389G>A	5/7T, 11/11TG	Infertility
6	S1235R	c.2562>G, c.4389G>A	5/7T, 11/12TG	Infertility
7	L206W	c.2562>G, c.4389G>A	7/7T, 10/11TG	Asthma
8	D1152H, G85E	c.2562>G, c.4389G>A c.1408A>G	5/7T, 11/12TG	CBAVD
9	-	c.2562>G, c.4389G>A	7/7T, 10/12TG	Infertility
10	-	c.2562>G, c.4389G>A	7/7T, 10/12TG	Infertility
11	-	c.2562>G, c.4389G>A	7/7T, 10/12TG	Infertility
12	-	c.2562>G, c.4389G>A	7/7T, 10/12TG	Infertility
13	-	c.2562>G, c.4389G>A	7/7T,	Infertility

			10/12TG	
14	-	c.2562>G, c.4389G>A , 1408A>G	7/7T, 10/12TG	Positive sweat test (Suspicion of CF?)
15	-	c.2562>G, c.4389G>A, c.1408A>G	7/7T, 10/12TG	Hyperchogenicity
16	-	c.869+11C>T,c.1408A>G, 2694T>G	7/7T, 10/12TG	DB

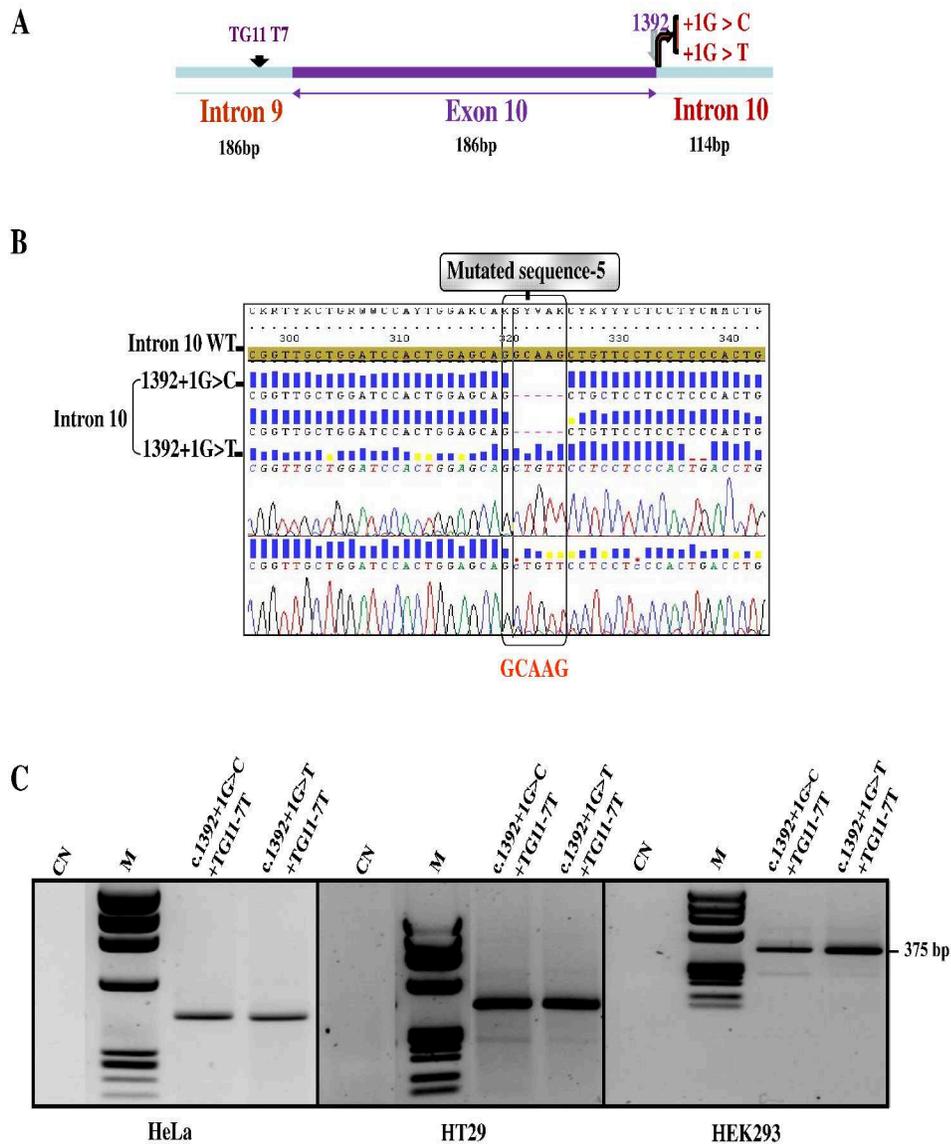
---



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



**Figure 2.** Effect of c.743+40A>G polymorphism on pre-mRNA splicing. (A) Schematic presentation of hybride minigene splicing construct used in transient transfection assay. Primers used in RT-PCR analysis are shown as black arrows (B) Linearization of different plasmids with *NdeI* shows the wild-type (pTB) minigene without *NdeI* cutting (lane2), with *NdeI* cutting (pTB/N, lane 3), the wild-type (C/WT) minigene harboring the c.743+40A (lane 4), and the construct harboring the c.743+40 A>G variant (C/MUT, lane 5). The used Marker is Lambda DNA/*HindIII*. (C) RT-PCR analysis of minigenes carrying the wild type sequence, WT, and c.743+40A>G polymorphism, MUT, in intron 6a separated in a 1.5% agarose gel.



**Figure 3.** Analysis of CFTR mRNA by RT-PCR and direct sequence analysis of products generated with the positive control (A) Schematic diagram of a linear CFTR covering intron9-exon10-intron10 which use to bind to pTB minigene demonstrating the position of c.1392+1G>T (or G>C) mutations and the TG11-T7 polymorphism (B) DNA sequence of RT-PCR product showing deletion 5 bp of exon10 (C) RT-PCR analysis. Lane 1. Negative control (CN) in which no reverse transcriptase was added .Lane 2. M, DNA marker 4x174 cut with *HaeIII* .Lane 3. Amplification product from c.1392+1G>C CFTR cDNA, Lane 4. Amplification product from c.1392+1G>T CFTR cDNA.

## RESUME

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies rares chez la population caucasienne. Cette maladie héréditaire récessive est causée par des mutations du gène *Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)* qui code pour une protéine localisée au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. La sévérité du phénotype est déterminée par les classes des mutations et leurs combinaisons en trans, ainsi que par la présence d'allèles complexes. La détermination des effets d'une mutation est essentielle pour avoir une corrélation génotype/phénotype correcte, donner un diagnostic prénatal adapté et permettre aux cliniciens de prescrire le traitement approprié à chaque mutation quand celui-ci sera disponible. Pour cela, nous avons étudié aux niveaux cellulaire et moléculaire les effets de plusieurs mutations qui intéressent le laboratoire : c.1392G>T (p.Lys464Asn), c.3909C>G (p.Asn1303Lys) et c.965T>C (p.Val322Ala). L'effet de ces mutations sur la protéine a été évalué. De plus, l'impact sur l'épissage aberrant des deux premières mutations, seules et dans le cadre de leurs allèles complexes, a été déterminé. Nous avons montré que : 1) la mutation c.1392G>T est de classe V et II et son allèle complexe aggrave l'épissage aberrant, 2) la mutation c.3909C>G appartient à la classe II et l'effet sur l'épissage résulte de son allèle complexe et 3) la mutation familiale c.965T>C est un simple polymorphisme. Ces travaux montrent l'importance de l'étude d'une mutation à différents niveaux cellulaires par l'intermédiaire des analyses *in silico*, *in cellulo* et *in vivo* et soulignent l'effet des allèles complexes qui peuvent moduler l'impact de la mutation seule.

Mots clés: Mutations CFTR, Allèles Complexes, Analyses Fonctionnelles, Minigène Hybride. Epissage, CF au Liban

## ABSTRACT

Cystic Fibrosis is the most frequent rare disease in the Caucasian population. This hereditary recessive disease is caused by mutations in the *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator gene (CFTR)* that encodes for a protein expressed on the apical membrane of epithelial cells. The mutations classes, their associations in trans and the presence of complex alleles define the phenotype severity. The determination of mutations effects is essential to have a correct genotype/phenotype correlation to give an adapted prenatal diagnosis and to help the clinicians in providing an appropriate treatment when available. In this respect, we have studied on the cellular and molecular levels the effects of several mutations of interest for the laboratory: c.1392G>T (p.Lys464Asn), c.3909C>G (p.Asn1303Lys) et c.965T>C (p.Val322Ala). The effects of these mutations were evaluated on the protein level. Moreover, the impact on aberrant splicing of these first two mutations solely and in the context of their complex alleles was determined. We have demonstrated that: 1) the c.1392G>T mutations belongs to class V and II and its complex allele aggravates the aberrant splicing, 2) the c.3909C>G is a class II mutation and the effect on splicing is due to its complex allele, and 3) the familial c.965T>C mutation is a simple polymorphism. This work highlights the importance to study the *CFTR* mutation at different cellular levels using *in silico*, *in cellulo* and *in vivo* analyses and emphasizes on the effect of complex allele in modulating the basal impact of a single mutation.

Keywords: CFTR mutations, Complex Alleles, Functionality Analysis, Hybrid Minigene, Splicing, CF in Lebanon