



HAL
open science

Contribution à l'amélioration des connaissances sur la relation génotype-phénotype dans la mucoviscidose et caractérisation phénotypique de l'inflammation pulmonaire

Alix De Becdelièvre

► **To cite this version:**

Alix De Becdelièvre. Contribution à l'amélioration des connaissances sur la relation génotype-phénotype dans la mucoviscidose et caractérisation phénotypique de l'inflammation pulmonaire. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2011. Français. NNT: 2011PEST0084 . tel-00733488

HAL Id: tel-00733488

<https://theses.hal.science/tel-00733488>

Submitted on 18 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS – EST
UFR de SCIENCES

Ecole Doctorale 402 - Sciences de la Vie et Santé

Thèse de doctorat de Génétique Humaine
de l'Université Paris-Est - Val de Marne

Soutenue par

Alix de BECDELIEVRE

Le 29 Novembre 2011

**Contribution à l'amélioration des connaissances sur la relation
génotype-phénotype dans la mucoviscidose et
caractérisation phénotypique de l'inflammation pulmonaire**

Directeur de thèse : Docteur Pascale FANEN

JURY

Monsieur Erick DENAMUR

Madame Pascale FANEN

Monsieur Claude FEREC

Monsieur Olivier TABARY

Madame Emmanuelle GIRODON-BOULANDET

Président du Jury

Directeur de Thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur Erick Denamur

Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance. J'espère que ce travail vous aura rappelé d'agréables souvenirs dans la thématique de la mucoviscidose.

Monsieur Claude Férec

Je suis honorée que vous ayez accepté d'être rapporteur de ce travail. Votre renommée dans le diagnostic moléculaire de nombreuses maladies génétiques et votre expertise dans le monde de la mucoviscidose permettra des discussions enrichissantes.

Olivier Tabary

Je te remercie d'avoir examiné et lu d'un œil critique mon manuscrit, me permettant ainsi de l'améliorer. Bien que la partie « inflammation » de ce mémoire ne soit pas majoritaire, j'espère que l'expert du domaine que tu es a néanmoins trouvé d'autres centres d'intérêt dans l'ensemble de ce travail. Merci aussi pour ta gentillesse à l'égard des « petits jeunes » que j'ai pu percevoir lors des nombreux congrès muco.

Emmanuelle Girodon

J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi durant ces quatre années (et ce n'est pas encore fini !). Tu m'as guidée dans mes débuts en diagnostic moléculaire, et je te remercie vivement de ta confiance et de tes encouragements. Cette expérience à tes côtés aura été pour moi très enrichissante, tant sur le plan humain que professionnel.

Pascale Fanen

Je tiens à te remercier chaleureusement de m'avoir confié ce travail et de la confiance que tu m'as témoignée tout au long de cette thèse. Tu as su partager et me transmettre ton savoir tant dans le domaine de la recherche que de l'enseignement et je t'en suis sincèrement reconnaissante. Je te remercie également pour ton écoute bienveillante qui m'a été précieuse, particulièrement en fin de thèse !

Ce travail de thèse a été une expérience particulièrement enrichissante tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je tiens à remercier ici toutes les personnes croisées au cours de ces années et qui m'ont aidée.

En particulier,

Monsieur Michel Goossens

Ancienne interne venue de Lille et alors inconnue du milieu de la génétique moléculaire parisienne, je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire il y a quatre ans et de m'avoir fait confiance tout au long de mon assistantat. Merci aussi de votre implication dans mon avenir professionnel qui me touche et m'honore.

Merci à **toute l'équipe 11 de l'U955**, et plus particulièrement les membres du groupe « muco », anciens et nouveaux :

Agathe (*elle a le pouvoir, surtout en Q-PCR*), Jeremy (*demi de mêlée sur le terrain de la luciférase*), Alexandre (*une grande culture au service de l'humour*), Loic (*qui m'a transmis le flambeau pour COMMD1*), Abdel (*grand compagnon de voyage, attendez-vous à des rebondissements*), Bruno (*expert technologique et sportif*), Gaëlle (*Miss CSN5, et tellement plus*) et bien sûr Nicole qui, constamment sur les routes, « se repose » maintenant de toutes ses transfections et de ses western-blots passés.

Merci également à mes deux camarades de bureau, Yuli (*au goût infallible, tant sur le plan des biscuits que de la déco*) et à l'intègre Asma (*le maître sera bientôt dépassé*).

Merci à l'ensemble de l'équipe de **diagnostic moléculaire** du laboratoire de Génétique AP-HP, et plus particulièrement au « **groupe Muco** » :

Catherine Costa et la dream team : Annick, Brigitte, Christine, Rachel et Josiane l'ancienne.

Merci aussi à Stéphane Moutereau grâce à qui les dosages d'IL-8 ont été possibles, à André Pawlak (équipe 21), à Xavier Decrouy de la plate-forme « microscope » de l'IMRB, et bien sûr à toute l'équipe de la plate-forme « micro-array », et à Natacha Martin (*merci pour ta grande implication dans nos projets*) de la plate-forme « séquençage ».

Contribution à l'amélioration des connaissances sur la relation génotype-phénotype dans la mucoviscidose et caractérisation phénotypique de l'inflammation pulmonaire

La mucoviscidose est la maladie autosomique récessive grave la plus fréquente dans la population d'origine caucasienne. Elle est due à des anomalies du gène *CFTR*, dont les multiples mutations décrites rendent compte en partie de la grande variabilité phénotypique. A l'heure du développement de thérapies ciblées selon les mutations portées par les patients, mieux comprendre les mécanismes sous-jacents des relations génotype-phénotype semble de première importance.

La première partie de ce travail est focalisée sur la relation génotype-phénotype. Par une étude rétrospective de 694 demandes de diagnostic prénatal de la mucoviscidose sur signes d'appel échographique, nous définissons les profils d'anomalies digestives les plus discriminants, et proposons en conséquence une révision de la stratégie d'analyse moléculaire du gène *CFTR*.

La deuxième partie concerne la mise en place d'outils nécessaires à l'exploration fonctionnelle du promoteur *CFTR*. En effet, dans les formes atypiques de la maladie, la fonction résiduelle de *CFTR* peut expliquer le phénotype. Des anomalies de régulation de la transcription peuvent parfois être à l'origine de telles formes modérées. La mise en place des outils d'analyse des variants du promoteur permettra de mieux interpréter leur pathogénicité et d'ouvrir de nouvelles pistes pour la compréhension de la régulation de ce gène.

La troisième partie s'intéresse à l'inflammation pulmonaire anormalement régulée qui est une caractéristique phénotypique et le premier facteur de morbidité et de mortalité de la mucoviscidose. La protéine *COMMD1* est une protéine pléiotrope participant à de nombreux processus cellulaires, principalement par un mécanisme de stabilisation d'interactions protéiques. Elle est impliquée dans les trois voies thérapeutiques : modulation de *CFTR*, restauration du liquide de surface des voies aériennes et inhibition de l'inflammation. Notre étude a permis d'observer l'activité anti-inflammatoire de *COMMD1* dans le contexte d'inflammation exacerbée décrite chez les patients atteints de mucoviscidose. La réduction de cette réaction exacerbée fait partie des enjeux thérapeutiques actuels et nous montrons ici que la protéine *COMMD1* est un bon candidat comme modérateur de l'inflammation médiée par *NF-κB* dans cette pathologie.

Contribution to the appreciation of the genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis and phenotypic characterization of lung inflammation

Cystic fibrosis (CF) is the most common severe autosomal recessive disorder in the Caucasian population. Apart from classical CF, there is a broad range of phenotypes associated with a huge genotypic variability concerning the mutations in the *CFTR* gene. In order to develop a mutation specific therapeutic approach, a better understanding of the phenotype-genotype correlation and its underlying mechanism is primordial.

In the first part of our work, we focused on genotype-phenotype correlation. With a retrospective study on 694 cases of prenatal diagnosis of CF for fetal bowel anomalies, we report on the most evocative digestive abnormal patterns and propose to revise current strategies for the *CFTR* gene analysis.

The second part concerns the *CFTR* promoter functional analysis. Mutations which conserve a residual CFTR channel function, such as mutations affecting the gene regulation, can be involved in atypical phenotypes. However, knowledge about the *CFTR* promoter remains poor and the clinical significance of new variants identified in this region is difficult to evaluate. Our implementation of functional analysis tools will improve the appreciation of such new variants in the *CFTR* promoter and open new insights for the gene regulation study.

In the third part, we contributed to study the inappropriate pulmonary inflammation which characterizes CF, the respiratory affection being the major factor of morbidity and mortality in the disease. COMMD1 is a pleiotropic protein involved in CFTR trafficking, ionic exchanges in the airways surface liquid and inflammation inhibition. In our study, we show the anti-inflammatory role of COMMD1 in the context of cystic fibrosis. Modulation of the exaggerated inflammation belongs to currently therapeutic challenges, and we show the ability of COMMD1, a protein partner of CFTR, to buffer the NF- κ B pathway activation.

Sommaire

Avant-propos	1
Chapitre 1 La Mucoviscidose	3
I. Circonstances de découverte de la maladie	5
1. Histoire familiale	5
2. Diagnostic symptomatique	6
3. Dépistage néonatal	11
II. Principaux tests biologiques pour la mise en évidence d'un défaut de CFTR.....	12
1. Test de la sueur (iontophorèse à la pilocarpine)	12
2. Différence de potentiel trans-épithéliale nasale	13
3. Analyse moléculaire du gène <i>CFTR</i>	14
III. De la mucoviscidose à la pathologie CFTR : un continuum clinique	16
1. Mucoviscidose classique	17
2. CFTR-RD ou pathologie liée à CFTR.....	18
IV. Caractéristiques moléculaires de CFTR	19
1. CFTR , du gène à la protéine	19
2. La régulation de l'expression génique	21
3. Les anomalies moléculaires de CFTR	31
Chapitre 2 L'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose	40
I. L'inflammation innée, un mécanisme de défense normal	41
1. La voie NF- κ B.....	43
2. La voie AP-1.....	48
II. La réponse inflammatoire dans les poumons CF est anormalement régulée	53
1. L'infection pulmonaire dans la mucoviscidose	53
2. Les marqueurs de l'inflammation sont augmentés dans les poumons CF	54
3. L'inflammation chez les modèles animaux	55
4. L'inflammation dans les modèles cellulaires	56
III. Propriétés pro- ou anti-inflammatoires de CFTR :	54
1. Activité pro-inflammatoire de CFTR-F508del	54
2. Activité anti-inflammatoire de CFTR-wt	57

Chapitre 3 COMMD1 et CSN5, deux régulateurs transcriptionnels	61
I. COMMD1.....	62
1. La famille COMMD, ubiquitaire et conservée.....	62
2. Structure et fonctions générales de COMMD1.....	63
3. COMMD1 et homéostasie du cuivre.....	68
4. COMMD1 et régulation du transport sodique.....	69
5. COMMD1 et signalisation HIF-1.....	71
6. COMMD1 et voie NF-kappaB (NF-κB).....	73
7. COMMD1 dans le contexte de la mucoviscidose.....	75
II. CSN5 et COP9 signalosome	82
1. Généralités.....	82
2. Le signalosome, les subcomplexes et la forme monomérique.....	84
3. Fonctions connues de CSN5.....	86
4. CSN5 et voie AP-1	90
5. CSN5 et voie NF-κB	90
6. CSN5 et HIF-1	92
7. CSN5 dans le contexte de la mucoviscidose	93
But de l'étude	95
Résultats	98
I. Suspicion échographique de mucoviscidose :.....	99
Article 1.....	102
Article 2.....	106
Discussion	117
II. Mise en place des outils d'étude du promoteur CFTR.....	122
1. Mesure de l'activité du promoteur dans différentes lignées	123
2. Analyse <i>in silico</i> des régions d'intérêt.....	126
3. Etude du mutant naturel c.-148A>G.....	132
III. Contributions à l'étude de COMMD1 et de CSN5 en tant que régulateurs de l'inflammation dans le contexte de la mucoviscidose.....	137
1. La voie NF-κB est anormalement activée dans les cellules CF.....	139
2. Etude de l'effet de COMMD1 sur l'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose.....	141
2.1. Article en préparation, étude de l'effet anti-inflammatoire de COMMD1 sous TNFα :	
<i>COMMD1 modulates the noxious inflammation in cystic fibrosis</i>	143

2.2. Etude de l'effet anti-inflammatoire de COMMD1 sous stimulation par l'IL-1 β	167
2.3. Mise en place des outils permettant d'étudier le mécanisme de l'activité anti-NF- κ B de COMMD1 sous stimulation	169
2.4. COMMD1, inflammation et promoteur <i>CFTR</i>	171
2.4. Discussion	174
3. Etude de l'effet anti-inflammatoire de CSN5 dans le contexte de la mucoviscidose	178
Discussion générale et perspectives	184
1. Apport aux corrélations génotype-phénotype	185
2. Effets bénéfiques de COMMD1 dans le contexte de la mucoviscidose.....	187
Bibliographie	191

Table des illustrations

Figure 1. Recommandations européennes pour la stratégie d'étude du gène <i>CFTR</i> en cas de suspicion de mucoviscidose sur signes d'appel échographiques..	7
Figure 2. Signes cliniques de la mucoviscidose.	9
Figure 3. Organigramme du dépistage néonatal de la mucoviscidose	12
Figure 4. Mesures de la différence de potentiel transépithéliale nasale chez un patient CF et un témoin normal (NI)..	14
Figure 5. Stratégie d'analyse moléculaire du gène <i>CFTR</i> .	15
Figure 6. Atteinte des différents tissus en fonction de l'activité résiduelle de <i>CFTR</i> Corrélation génotype-phénotype selon les organes.	18
Figure 7. <i>CFTR</i> , du gène à la protéine..	20
Figure 8. Profil d'expression de <i>CFTR</i> , d'après la base de données UCSC genome browser.	22
Figure 9. Les différents sites de début de transcription de <i>CFTR</i>	23
Figure 10. Les transcrits alternatifs de <i>CFTR</i> chez l'homme..	24
Figure 11. Schéma du promoteur de <i>CFTR</i> et de ses sites de liaison pour des facteurs de transcription	25
Figure 12. Cartographie des DHS	30
Figure 13. Les différentes classes fonctionnelles de mutations de <i>CFTR</i>	33
Figure 14. Schéma récapitulatif des différentes fonctions de <i>CFTR</i> dans la cellule épithéliale.	37
Figure 15. Contribution du génotype <i>CFTR</i> à la variabilité de la maladie dans les différents organes affectés par la mucoviscidose.....	37
Figure 16. Les effets néfastes de l'élastase sur les mécanismes de défense de l'hôte et l'inflammation dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose	42
Figure 17. Les protéines de la famille NF- κ B/Rel et de ses inhibiteurs naturels I κ B chez les mammifères	44
Figure 18. Représentation schématique des protéines du complexe IKK	45
Figure 19. Modèle de dégradation de l'inhibiteur I κ B α de la voie NF- κ B.	46
Figure 20. Les principales voies de signalisation de NF- κ B	47
Figure 21. Représentation de l'hétérodimère AP-1 Fos/Jun.....	49
Figure 22. Les connexions de la voie de signalisation des MAPKs.....	50
Figure 23. Activation de la voie AP-1	51
Figure 24. Prévalence des pathogènes les plus fréquents dans les voies respiratoires des patients CF en fonction de leur âge.	53
Figure 25. Activation de la voie NF- κ B par le stress du RE.....	58
Figure 26. Implication de <i>CFTR</i> -F508del dans le stress du RE.....	59
Figure 27. Les différents membres de la famille COMMD, chez l'homme	63
Figure 28. Représentation schématique de COMMD1.	65
Figure 29. Rôle de COMMD1 dans le métabolisme du cuivre (deBie et al., 2005)..	69
Figure 30. Régulation du canal ENaC par Nedd4-2	70

Figure 31. Régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1	72
Figure 32. Les principaux mécanismes de régulation de la voie classique de NF-κB	74
Figure 33. Mécanisme de régulation de la voie NF-κB par COMMD1.	77
Figure 34. COMMD1 est un régulateur multiple impliqué dans des processus cellulaires variés	78
Figure 35. Modèle proposant le rôle de COMMD1 dans l'endocytose et le recyclage de CFTR-wt,	80
Figure 36. Régulation et cibles de CSN5/Jab1.....	83
Figure 37. Structure du COPS9 signalosome.....	84
Figure 38. Modèle spéculatif pour la façon dont les activités de phosphorylation et de déneddylation associent le signalosome au protéasome <i>via</i> l'ubiquitination de substrat par le SCF.....	87
Figure 39. Les différents complexes contenant CSN5 et leurs fonctions spécifiques.....	89
Figure 40. Implication du signalosome dans la régulation de la voie NF-κB.....	91
Figure 41. Modèle de dégradation de la forme mal repliée de CFTR <i>via</i> le signalosome.....	93
Figure 42. La corrélation génotype-phénotype améliore la prise en charge des patients	96
Figure 43. Evolution du nombre d'analyses sur signe d'appel échographique et du nombre de cas diagnostiqués sur une période de 10 ans (2000-2009) dans notre laboratoire.....	101
Figure 44. Valeur diagnostique des anomalies digestives fœtales évaluée par le « likelihood ratio ».....	120
Figure 45. Proposition de stratégie d'analyse moléculaire du gène CFTR en cas de signe d'appel échographique chez un fœtus.	121
Figure 46. Représentation des constructions tronquées du promoteur <i>CFTR</i> en amont du gène <i>Luciférase</i>	124
Figure 47. Activité transcriptionnelle du promoteur <i>CFTR</i>	124
Figure 48. Activité transcriptionnelle du promoteur <i>CFTR</i> ciblée sur la région de c.-2748 à c.-3918 pb dans les cellules BEAS-2B.....	125
Figure 49. Etude de fonction des promoteurs wt et muté de <i>CFTR</i>	132
Figure 50. Représentation des variations dans les sites potentiels de liaison de facteurs de transcription	133
Figure 51. Influence du TGFβ sur l'activité transcriptionnelle du promoteur wt ou muté (c.-148A>G).....	134
Figure 52. Quantification de l'ARNm issu de cellules épithéliales nasales par PCR en temps réel.....	135
Figure 53. Evaluation de l'activité NF-κB dans différentes lignées bronchiques.	140
Figure 54. Evaluation de l'activité basale NF-κB dans les cellules HeLa exprimant stablement CFTR-wt ou CFTR-F508del.	141
Figure 55. Mesure de l'activité anti-NF-κB de COMMD1 sous IL-1β (0,5ng/mL, 4 heures).	168
Figure 56. Effet de COMMD1 sur la production d'IL-8 dans les cellules IB3-1 et S9.....	169
Figure 57. Cinétique d'activation de la voie NF-κB sous TNFα (10ng/mL).....	169
Figure 58. Mise au point des conditions d'étude de l'effet de COMMD1 sur la transcription médiée par RelA...	170
Figure 59. Localisation cellulaire de COMMD1 dans un contexte pro-inflammatoire, sous IL-1β.....	171
Figure 60. Activation par NF-κB du promoteur normal et du promoteur muté sur le site NF-κB.	172
Figure 61. Effet de COMMD1 sur la régulation transcriptionnelle de <i>CFTR</i>	174
Figure 62. Principal mécanisme d'inhibition de la transcription NF-κB dépendante par COMMD1.....	175
Figure 63. CSN5 inhibe l'activité transcriptionnelle de NF-κB dans les cellules épithéliales bronchiques..	179

Figure 64. CSN5 inhibe l'activité transcriptionnelle de NF-κB dans les HeLa exprimant stablement CFTR.	180
Figure 65. Etude de l'effet de l'extinction de CSN5 sur la sécrétion de l'IL-8 par les HeLa en condition basale. ..	181
Figure 66. Etude de l'effet de l'extinction de CSN5 sur la sécrétion de l'IL-8 sous stimulation par le TNFα.	182
Figure 67. Liste des traitements de la mucoviscidose en cours de développement	187
Figure 68. Schéma récapitulatif du rôle de COMMD1 dans le contexte de la mucoviscidose.....	188
Figure 69. Principales variations de séquence rapportées dans le gène COMMD1	190

Table des Tableaux

Tableau 1. Critères diagnostiques de la mucoviscidose.....	17
Tableau 2. Classification des CFTR-RD proposée par le consortium de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2000.....	19
Tableau 3. Les 4 classes de mutations selon leur signification clinique.....	32
Tableau 4. Principaux gènes modificateurs dans la mucoviscidose.....	38
Tableau 5. Interactions des protéines COMMD avec les protéines NF-κB.....	75
Tableau 6. Les différentes kinases associées au signalosome.	88
Tableau 7. Evolution du nombre de cas de mucoviscidose diagnostiquée sur signes d'appel échographiques à Créteil.....	118
Tableau 8. Liste des sites potentiels de fixation pour des facteurs de transcription entre les positions c.-641 et c.-904 du promoteur <i>CFTR</i>	129
Tableau 9. Sites potentiels de fixation de facteurs <i>trans</i> -régulateurs dans la région activatrice du promoteur <i>CFTR</i> de c.-3625 pb à c.-3066 pb.....	126
Tableau 10. Sites potentiels de fixation de facteurs <i>trans</i> -régulateurs dans la région activatrice du promoteur <i>CFTR</i> de c.-3918 pb à c.-3626 pb.....	130

Liste des Abréviations

ABCD	Absence Bilatérale des Canaux Déférents
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF-DE	Amniotic Fluid-Digestive Enzyme
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-1	Activator Protein 1
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ASL	Airway Surface Liquid
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide
C/EBP	CCAAT-Enhancer-Binding Proteins
CF	Cystic Fibrosis
CFF	Cystic Fibrosis Foundation
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
Cl-	anion chlorure
COMMD	COpper Metabolism Murr1 Domain
COMMD1	Copper Metabolism Murr1 Domain 1
CRCM	Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose
CRE	cAMP Response Element
CREB	cAMP Response Element Binding protein
CRM1	Exportine 1
CSN	Constitutive Photomorphogenesis Signalosome)
CSN5	Constitutive Photomorphogenesis Signalosome subunit 5
ddp	différence de potentiel
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DHS	DNase Hypersensitive Site
ECS	Elongin B/C-Cul2/5-SOCS-box protein (E3 ubiquitine ligase)
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ENaC	Epithelial Sodium (Na ⁺) Channel
EOR	ER-Overload Response
ERAD	ER-Associated Degradation
ERCQ	Endoplamic Reticulum Quality Control
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
GGT	Gamma Glutamyl Transpeptidase
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HGVS	Human Genome Variation Society)
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factor-1 alpha
HNF1 α	Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha
HRE	HIF Responsive Element
HRM	High Resolution Melting
I κ B	κ B Inhibitor
IKK	I κ B Kinases
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin 1bêta
IL-8	Interleukin 8
Jab1	Jun-Activator-domain-Binding-protein 1

JAMM	JAB1 MPN Métalloenzyme domain ou motif MPN+)
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
kb	kilobase
kDa	kilo Dalton
LAP	Leucine Amino-peptidase
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen-Activated Protein kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-Activated Protein 3 Kinases
MEF2	Myocyte-Enhancer Factor 2
MLPA	Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification
mmol	millimole
MPN	Mpr1-Pad1-Nterminal
MURR1	Mouse U2af1-rs1 region 1
Na+	cation sodium
NBD	Nucleotide Binding Domain
NES	Nuclear Export Signal
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NLS	Nuclear Localization Signal
NMD	Nonsense-Mediated mRNA Decay
ORCC	Outwardly Rectifying Chloride Channel
ORL (sphère)	Oto-rhino-Laryngée
PALi	Phosphatase Alaline intestinale
pb	paire de bases
PCI	Proteasome, COP9, Initiation factor 3
PI	Pancreatic Insufficiency
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PNN	Polynucléaire Neutrophile
PS	Pancreatic Sufficiency
pVHL	protéine von Hippel Lindau
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RE	réticulum endoplasmique
RHD	Rel Homology Domain
ROMK	Renal Outer Medullary K ⁺ Channel
SA	Semaine d'Amenorrhée
SCF	Skp1-cullin-F-box
sCLU	secretory Clusterin
Sp1	Specificity Protein 1
SRF	Serum Response Factor
TAD	Transcription Activation Domain
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TIR	Trypsine Immuno-Réactive
TLRs	Toll Like Receptor
TMD	TransMembrane Domain
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
TREs	TPA (12-O-tetradecanoylphorbol) Response Element
UPR	Unfolded Protein Response
USF	Upstream Stimulating Factor 1

Avant-propos

La mucoviscidose est la maladie héréditaire autosomique grave la plus fréquente dans la population d'origine européenne, avec une incidence d'environ 1/3000. Elle est causée par des mutations du gène *CFTR* (MIM*602421) qui code un canal perméable aux ions chlorures exprimé à la membrane apicale des cellules des épithéliums sécrétoires. Ce profil d'expression explique la symptomatologie pluri-organes causée par les troubles de l'homéostasie ionique des sécrétions, incluant une atteinte respiratoire, une atteinte digestive, une atteinte génitale et des anomalies de la réabsorption ionique dans les glandes sudoripares. A ce jour, environ 1900 variations du gène *CFTR* ont été décrites, et cette variabilité génotypique explique en partie la grande variabilité phénotypique, allant des formes sévères multisystémiques aux formes modérées, voire mono-symptomatiques, selon le taux de fonction résiduelle du canal *CFTR*. Le facteur majeur de morbidité et de mortalité dans la mucoviscidose est l'atteinte pulmonaire, caractérisée par un cercle vicieux associant un syndrome obstructif, un syndrome inflammatoire persistant et des infections respiratoires chroniques. L'inflammation exacerbée est péjorative à long terme, puisqu'elle aggrave le syndrome obstructif lié au déséquilibre ionique, entraîne une réponse inappropriée aux agents pathogènes, et cause une destruction progressive du parenchyme pulmonaire. Parmi les pistes en matière de recherche thérapeutique, des efforts sont donc déployés vers l'augmentation de l'expression de la protéine *CFTR* à la membrane cellulaire, et vers la régulation de l'inflammation exacerbée au niveau des voies aériennes.

C'est dans ce contexte scientifique que j'ai pris mes fonctions d'Assistante Hospitalo-Universitaire en Biochimie et Génétique à Créteil, à l'interface entre l'observation des relations génotype-phénotype au sein du laboratoire de diagnostic moléculaire de la mucoviscidose de l'AP-HP et l'étude de mécanismes sous-jacents de la pathologie plus fondamentaux au sein de l'unité de recherche Inserm. Le travail présenté ici traite de trois thématiques centrées sur le patient :

Une meilleure connaissance des corrélations génotype-phénotype permet d'améliorer le conseil génétique, et ceci sera montré par une étude rétrospective portant sur le diagnostic prénatal de la maladie sur signes d'appel échographiques.

Certaines mutations peuvent être localisées dans le promoteur du gène *CFTR* et être à l'origine d'anomalies de régulation transcriptionnelle. Nous avons mis en place les outils nécessaires à l'étude du promoteur de ce gène, ce qui est illustré par un exemple concret.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés au phénotype pulmonaire et présentons le rôle anti-inflammatoire de la protéine candidate *COMMD1* dans les cellules épithéliales bronchiques. Des travaux préliminaires sur l'activité anti-inflammatoire d'une seconde protéine candidate, *CSN5*, sont également présentés.

Afin de placer les travaux présentés dans ce manuscrit dans un contexte général et scientifique, nous aborderons dans l'introduction les connaissances actuelles sur i) la mucoviscidose, les mutations responsables, et la régulation du gène *CFTR*, ii) l'inflammation pulmonaire dans le contexte de cette pathologie et iii) une présentation des protéines régulatrices de la transcription *COMMD1* et *CSN5*. Puis les résultats et les conclusions de ces travaux seront développés.

Chapitre 1

La Mucoviscidose

« Malheur à l'enfant qui laisse un goût salé lorsqu'on l'embrasse, il est maudit et va bientôt mourir ». Issue du folklore germanique (Rochholz, 1857), cette phrase publiée dès le début du XVII^{ème} siècle par Alonzo de Fonteca, médecin espagnol au temps de l'inquisition, prédisait déjà le test qui fait toujours référence, en matière de diagnostic de la mucoviscidose (Fonteca, 1606). La première autopsie rapportée par le Hollandais Pieter Pauw en 1595 imputait la mortalité à l'atteinte pancréatique (Busch, 1990), mais cette maladie, alors considérée comme la conséquence d'un ensorcellement, ne devint une entité clinique médicalement reconnue que dans le deuxième tiers du XX^{ème} siècle, notamment grâce aux travaux de Dorothy Andersen (Andersen, 1938; Fanconi, et al., 1936).

C'est seulement à cette époque que les lésions pancréatiques, qui donnèrent le nom à la maladie de *Cystic Fibrosis* (Fibrose kystique du pancréas ou CF) furent associées à la pathologie pulmonaire (Fanconi, et al., 1936). L'observation d'un épaissement du mucus conduisit en 1943 à l'introduction de la dénomination « mucoviscidose » par Sydney Farber, médecin-chef au Children's Hospital de Boston, afin de corriger la dénomination employée par Dorothy Andersen, centrée sur le pancréas. Cette dénomination est maintenant classiquement utilisée en France. C'est seulement des années plus tard que les anomalies de concentration en sel de la sueur devinrent considérées comme pathognomoniques de la mucoviscidose (Davis, 2006). Au cours de l'été 1949, marqué par une vague de chaleur particulièrement intense à New York, le jeune assistant de Dorothy Andersen, Paul Di Sant' Agnese, observa un important syndrome de déshydratation chez les enfants atteints, dû à une perte sudorale majeure de sels (Darling, et al., 1953; Di Sant' Agnese, et al., 1953), associant enfin un déséquilibre des électrolytes dans la sueur à la maladie.

Les études sur l'hérédité de la mucoviscidose montrèrent sa transmission autosomique récessive (Andersen and Hodges, 1946) et son origine monogénique (Danks, et al., 1965). L'identification du défaut moléculaire à l'origine de la maladie, en 1989, par Lap Chi Tsui, John Riordan et Francis Collins, fut l'une des premières victoires de la génétique inverse (Kerem, et al., 1989; Riordan, et al., 1989; Rommens, et al., 1989a). Il s'agit d'anomalies moléculaires du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), dont on sut plus tard qu'il code le canal CFTR, perméable aux ions chlorures (Bear, et al., 1992).

Aujourd'hui, la mucoviscidose (OMIM 219700) est la maladie autosomique récessive grave la plus fréquente dans la population caucasienne, avec une incidence d'environ 1/3000 naissances en Europe, et 1/4136 naissances en France (Munck, et al., 2008). Alors que 45% des sujets décédaient avant l'âge de 1 an dans les années 1950, l'espérance de vie à la naissance s'est considérablement

améliorée, passant d'une médiane de moins de 5 ans il y a 20 ans, à plus de 42 ans en 2004 (Observatoire National de la Mucoviscidose, bilan de 2004).

Le canal anionique CFTR étant normalement exprimé à la membrane apicale de nombreux épithéliums sécrétoires, la plupart des tissus épithéliaux sont affectés, entraînant des symptômes au niveau des voies aériennes, du pancréas, des voies biliaires, de l'intestin, du tractus génital et des glandes sudoripares. Elle se traduit principalement par un syndrome pulmonaire obstructif accompagné d'une insuffisance pancréatique exocrine et d'une élévation de la teneur en chlorures et en sodium dans la sueur.

I. Circonstances de découverte de la maladie

L'incidence de la mucoviscidose est d'environ 1/4136 en France, avec de grandes variations régionales allant de 1/2913 en Bretagne à 1/7077 en Midi-Pyrénées (Munck and Roussey, 2008; Scotet, et al., 2010) et la fréquence des hétérozygotes est évaluée à 1/32 en moyenne (Munck and Roussey, 2008). De par son caractère héréditaire, le diagnostic de la mucoviscidose peut être évoqué soit devant un contexte familial particulier, soit devant des signes cliniques. Actuellement, le dépistage néonatal permet une prise en charge clinique plus précoce dans les Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM), ce qui améliore le pronostic.

1. Histoire familiale

Pour un couple dont les 2 membres sont hétérozygotes pour une mutation sévère du gène *CFTR*, le risque d'avoir un enfant atteint de mucoviscidose est de $\frac{1}{4}$. Lorsque le diagnostic de la maladie est posé chez un enfant, les autres membres de la fratrie, surtout s'ils sont nés avant la mise en place du dépistage néonatal systématique, peuvent bénéficier d'une évaluation clinique ainsi que d'un test de la sueur. Pour les patients mineurs, le génotypage n'a lieu que s'ils sont symptomatiques. En revanche, lorsqu'une mutation familiale est connue, sa recherche peut être proposée aux apparentés majeurs, surtout dans le cadre d'un projet parental.

La réglementation en France autorise le diagnostic prénatal pour des affections d'une particulière gravité et après une consultation médicale adaptée à l'affection recherchée, dont les modalités sont bien précisées, notamment sur la nature des informations données aux couples et de leur consentement éclairé (Loi du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique). Initialement proposé uniquement aux couples ayant déjà un ou plusieurs enfants atteints de mucoviscidose (Brambati, et

al., 1993; Mennie, et al., 1992) , le diagnostic prénatal est maintenant proposé aux couples à risque $\frac{1}{4}$ identifiés par les études familiales (Super, et al., 1994). La recherche des mutations parentales est alors recherchée sur l'ADN fœtal, extrait de villosités choriales (prélevées dès 12 semaines d'aménorrhée (SA)), ou de liquide amniotique (à partir de 18-19 SA). En 2009, d'après les données de l'Agence de la Biomédecine (Rapport d'Activité 2010), la proportion des interruptions médicales de grossesse en cas de diagnostic prénatal positif était de 85% pour les fœtus issus de couples à risque $\frac{1}{4}$.

2. Diagnostic symptomatique

Période prénatale : anomalies fœtales à l'échographie

Une hyperéchogénicité intestinale fœtale, caractérisée par une densité égale ou supérieure à celle de l'os à l'échographie, est observée dans 0,1 à 1,8 % des grossesses au deuxième ou troisième trimestre, selon les études (Penna and Bower, 2000; Scotet, et al., 2002; Simon-Bouy, et al., 2003). Initialement décrite comme un variant bénin (Fakhry, et al., 1986; Parulekar, 1991), cette hyperéchogénicité peut également révéler une pathologie sous-jacente liée à une anomalie chromosomique (3-25% des cas), une infection virale, une anomalie congénitale, un retard de croissance ou une mort fœtale. Une étude rétrospective réalisée en Bretagne a montré qu'une hyperéchogénicité intestinale était observée chez 11% des fœtus atteints de mucoviscidose, et chez seulement 0,037% des fœtus sains (Scotet, et al., 2002). D'une manière plus générale sur le territoire français, une large étude collaborative a permis d'évaluer à environ 3% la fréquence de la mucoviscidose en cas de signes évocateurs échographiques, c'est-à-dire une hyperéchogénicité intestinale et/ou des dilatations des anses intestinales, associées ou non entre elles ou à d'autres signes (Muller, et al., 2002; Simon-Bouy, et al., 2003).

Dans le cadre de la mucoviscidose, l'hyperéchogénicité intestinale du fœtus peut être associée à d'autres signes évocateurs visibles à l'échographie, notamment des dilatations des anses intestinales et une absence de visualisation de la vésicule biliaire qui est atrophiée. Dans de tels cas, tous signes échographiques confondus, les recommandations françaises et européennes concernant la stratégie diagnostique sont résumées dans la **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** (Dequeker, et al., 2009). Si une mutation fréquente est identifiée chez un des parents et le fœtus, le risque résiduel que celui-ci soit atteint est évalué entre 10 et 13% (Muller, et al., 2002; Simon-Bouy, et al., 2003). Si les parents sont tous deux identifiés comme porteurs hétérozygotes d'une mutation sévère, un diagnostic

prénatal leur est proposé, le risque étant alors proche de 100%. En 2009, une interruption médicale de grossesse a été pratiquée

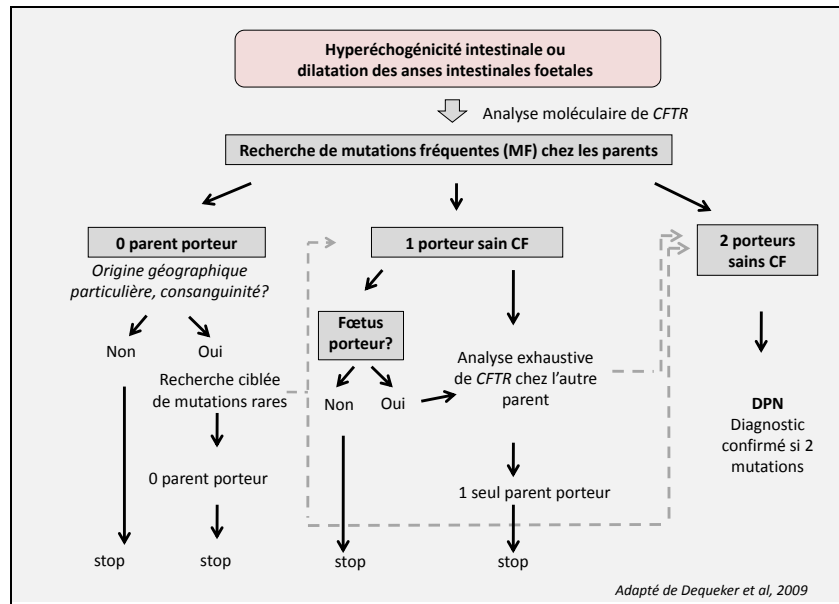


Figure 1. Recommandations européennes pour la stratégie d'étude du gène CFTR en cas de suspicion de mucoviscidose sur signes d'appel échographiques. Si le terme de la grossesse est de moins de 20 SA et qu'une amniocentèse est réalisée, les activités des enzymes digestives fœtales dans le liquide amniotique peuvent être évaluées, une diminution de celles-ci signant un obstacle digestif (adapté de Dequeker et al, 2009).

pour 72% des fœtus identifiés sur anomalies digestives (Agence de la Biomédecine, rapport d'activité 2010).

En l'absence d'identification de mutations responsables de mucoviscidose ou devant la mise en évidence de variants de signification inconnue, l'évaluation de l'activité des enzymes digestives fœtales libérées dans le liquide amniotique (AF-DE pour *Amniotic Fluid Digestive Enzymes*) peut permettre d'orienter le diagnostic. Ce dosage concerne les enzymes GGT (Gamma-glutamyl-transpeptidase), la Leucine aminopeptidase (LAP), et l'isoforme intestinale de la phosphatase alcaline (PALi), dont les profils sont liés au processus de maturation du système digestif (Bardin, et al., 2009; Mulivor, et al., 1987). Vers 13-14 semaines d'aménorrhée (SA), l'ouverture des membranes pharyngée et anale coïncide avec l'arrivée massive des enzymes des microvillosités intestinales dans le liquide amniotique. Après 20 SA, la maturation du sphincter anal diminue ce flux. Chez les fœtus atteints de mucoviscidose, l'hyperviscosité des sécrétions intestinales cause une diminution des activités des AF-DE à 18 semaines (profil d'obstruction). Après 22 semaines, il est impossible de distinguer une valeur physiologique basse d'une obstruction, mais parfois des profils compatibles avec des vomissements biliaires ou une fuite anale peuvent refléter la présence d'un iléus méconial (Oca, et al., 2009).

Cependant, si ces signes prénatals sont en général associés à des formes classiques sévères de la maladie, ils permettent aussi d'identifier des fœtus porteurs de génotypes compatibles avec une forme très modérée de mucoviscidose, voire des formes monosymptomatiques (Abramowicz, et al., 2000; Simon-Bouy, et al., 2003). Il est donc nécessaire de considérer les résultats d'analyse moléculaire et de dosage des enzymes digestives fœtales avec prudence.

L'expertise moléculaire est primordiale dans les cas de suspicion échographique de mucoviscidose : en effet, il est important d'évaluer la sévérité des mutations identifiées afin que la meilleure information possible puisse être dispensée aux parents lors du conseil génétique. D'après les recommandations nationales et européennes, en cas d'étude négative, le généticien moléculaire rend dans la mesure du possible un risque résiduel. Néanmoins, étant donnée la grande variabilité d'incidence de la mucoviscidose en cas d'anomalies digestive fœtale selon les études, ainsi que l'évolution des techniques d'analyses et de leur sensibilité, il nous apparaissait nécessaire de réévaluer les risques dans notre population pour notre pratique courante. Ceci nous a amenés à réaliser une étude rétrospective sur tous les patients adressés pour suspicion échographique de mucoviscidose entre 1992 et 2010, qui est présentée dans la partie « résultats » de ce mémoire.

Période post-natale : mucoviscidose clinique

Dans sa forme classique et sévère, la mucoviscidose associe des signes respiratoires, digestifs, avec une hypotrophie pondérale, et chez les hommes une infertilité par azoospermie excrétoire, à un test de la sueur positif (Figure 2). Il existe néanmoins une grande variabilité phénotypique, en termes d'organes atteints et de sévérité.

L'**atteinte respiratoire** est le principal facteur de morbi-mortalité de la maladie. Elle est actuellement très mal corrélée au génotype, et si sa gravité est bien liée à des mutations sévères, elle semble également largement sous la dépendance de facteurs environnementaux (Collaco and Cutting, 2008; Cutting, 2005). Le mucus, anormalement visqueux, obstrue les voies respiratoires et permet la colonisation et l'infection par des germes spécifiques, variant selon l'âge du patient (le plus souvent des bactéries : *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*). L'infection chronique par le bacille *P. aeruginosa* marque le plus souvent un tournant évolutif défavorable de la maladie et est retrouvée dans les voies aériennes de 70 à 90% des jeunes adultes atteints de mucoviscidose (Pitt, et al., 1986). Les épisodes récurrents d'infection et d'inflammation chez les patients conduisent à la destruction progressive irréversible du

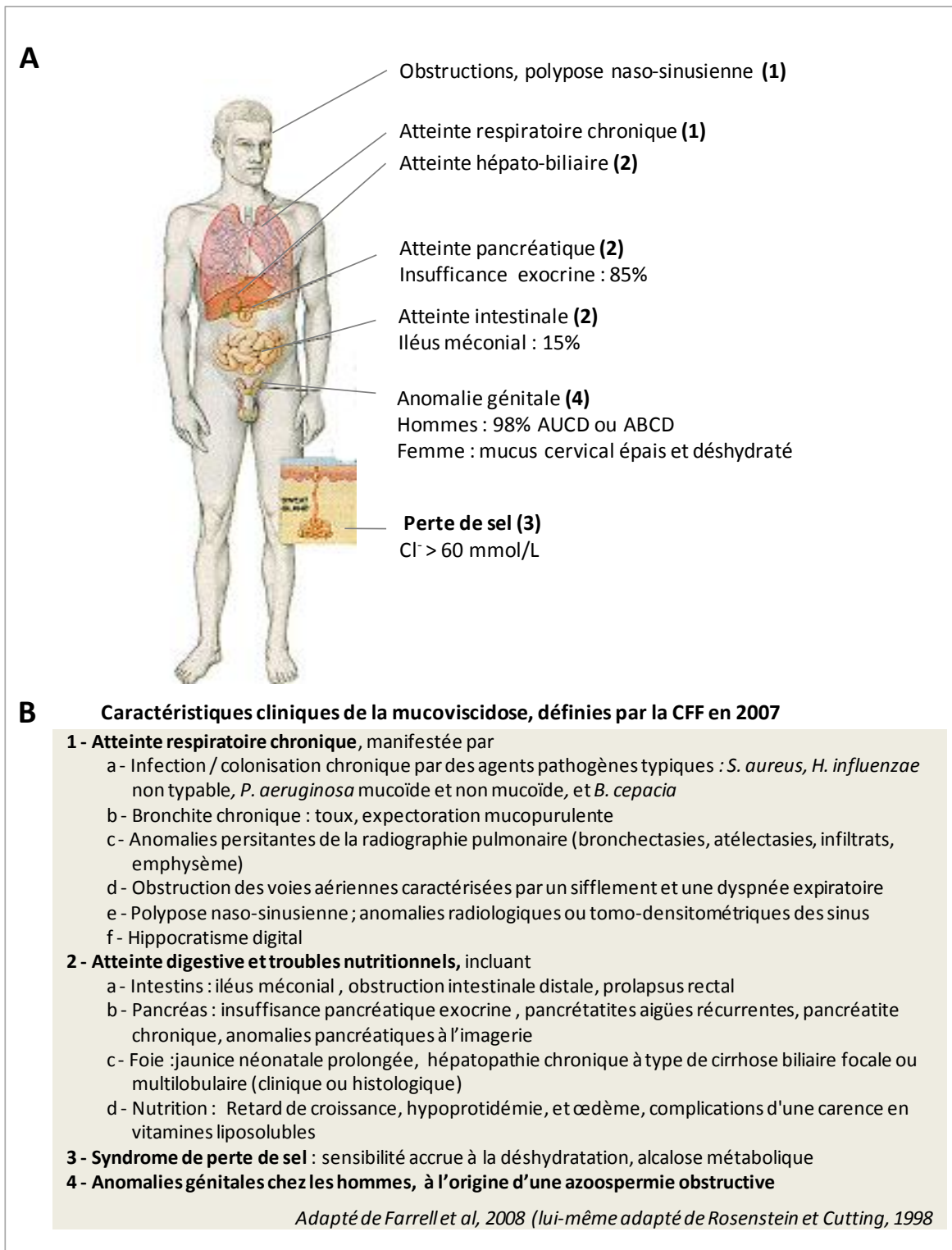


Figure 2. Signes cliniques de la mucoviscidose. (A) Les différents organes classiquement affectés par la mucoviscidose. Les correspondances par rapport aux items du tableau (B) sont indiquées entre parenthèses. (B) Les signes cliniques caractéristiques de la mucoviscidose, tels que retenus par la conférence de consensus de la Cystic Fibrosis Foundation en 2007.

parenchyme et à une fibrose pulmonaire. L'atteinte des voies aériennes due à des anomalies de CFTR peut également prendre la forme de rhinosinusites chroniques, de bronchites à répétition, ou de dilatation des bronches. La perturbation progressive des épreuves fonctionnelles respiratoires et de la gazométrie du sang artériel témoignent de l'évolution des patients vers l'insuffisance respiratoire, (Davis, 2006; Gibson, et al., 2003). Les malades présentent par ailleurs fréquemment des atteintes de la sphère ORL, telles qu'une polypose naso-sinusienne déformante et invalidante, ou une otite séreuse (Robertson, et al., 2008).

Le premier signe de l'**atteinte digestive** est l'iléus méconial, observé chez 10 à 15% des patients à la naissance (Munck and Roussey, 2008; Registre, 2007; Scotet, et al., 2010), qui prédit le plus souvent une insuffisance pancréatique exocrine mais pas la sévérité de la maladie (De Braekeleer, et al., 1998; Munck, et al., 2006). L'atteinte digestive se traduit principalement par une atteinte pancréatique et une atteinte hépatobiliaire. Une insuffisance pancréatique exocrine est observée à la naissance chez 85 à 90% des patients avec une forme sévère de mucoviscidose. Si la fonction pancréatique à la naissance est conservée chez 10 à 15% des malades, leur risque de pancréatite est accru, et une faible proportion d'entre eux (<5%) évolue vers une insuffisance pancréatique (Cutting, 2005). Cette insuffisance pancréatique exocrine se traduit par l'émission de diarrhées graisseuses et d'une élastase fécale diminuée. Par ailleurs, on observe chez 20 à 50% des adolescents et des adultes atteints une destruction progressive des îlots de Langerhans. Ceci entraîne une insuffisance pancréatique endocrine et un diabète, avec une diminution et un retard à la sécrétion d'insuline associé à une insulino-résistance (Moran, et al., 2010; Ratjen and Doring, 2003). Le classement de la fonction pancréatique exocrine en fonction déficiente (PI ou *Pancreatic Insufficiency*) ou conservée (PS ou *Pancreatic Sufficiency*) permet d'apprécier la gravité du phénotype des patients (Kerem, et al., 1990). La fonction pancréatique étant l'élément clinique le mieux corrélé avec le génotype, on peut en général prédire l'insuffisance pancréatique exocrine en fonction des mutations identifiées. L'atteinte hépatobiliaire, en revanche, est d'incidence et de sévérité plus variables, et sa fréquence de diagnostic augmente avec la sensibilité croissante des évaluations biochimiques et radiologiques. Si une hépatomégalie isolée est observée chez 6 à 30% des patients avec une évolution très progressive, la pathologie hépatique clinique se développe chez seulement près de 15% des patients, en général avant l'adolescence (Diwakar, et al., 2001). La vésicule biliaire peut également être atteinte : elle est de petite taille et peu fonctionnelle chez environ 30% des malades (Akata and Akhan, 2007; Herrmann, et al., 2010).

L'ensemble de ces troubles digestifs, à l'origine d'une malabsorption des nutriments (protéines, lipides, vitamines liposolubles), participe à la malnutrition et au retard de croissance staturo-

pondérale généralement observé chez les patients (Ratjen and Doring, 2003). La mise en place du diagnostic néonatal a permis d'améliorer considérablement la prise en charge nutritive précoce des patients.

L'**atteinte génitale** est présente chez 98% des hommes atteints de mucoviscidose, qui sont infertiles par azoospermie secondaire à une atrésie ou une absence des canaux déférents et une absence ou une dilatation des vésicules séminales. On parle d'infertilité par absence uni- ou bilatérale des canaux déférents (AUCD ou ABCD) (Oppenheimer and Esterly, 1969). Le tissu épithélial des canaux déférents semble extrêmement sensible à la diminution de quantité de protéine CFTR fonctionnelle, puisqu'une telle infertilité est fréquemment retrouvée isolée chez des hommes ne présentant par ailleurs pas d'autres signes cliniques et avec un défaut mineur de CFTR (Bombieri, et al., 2011; Cuppens and Cassiman, 2004). Les femmes peuvent présenter une diminution de la fertilité par épaissement du mucus cervical (Oppenheimer, et al., 1970; Radpour, et al., 2008).

Enfin, d'**autres signes** plus rares et moins spécifiques sont parfois observés, comme une myocardite non obstructive, ou une arthropathie et une ostéoporose pouvant survenir dès l'enfance.

Chacun des symptômes cliniques respiratoires, digestifs ou génitaux peut être signe d'appel de la maladie et faire évoquer le diagnostic de mucoviscidose, confirmé par un test de la sueur et une étude génétique. Une évaluation clinique globale dans un CRCM est alors souhaitable.

3. Dépistage néonatal

Devant la fréquence et la gravité de la maladie, le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose, réalisé dans de nombreuses régions (Australie, Europe, Amérique du Nord), a été instauré en France en 2002. Il est réalisé en même temps que le dépistage de l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales, la drépanocytose et la phénylcétonurie, par prélèvement de sang au 3^{ème} jour de vie, et repose sur le dosage de la trypsine immuno-réactive (TIR) sérique.

La trypsine est une enzyme sécrétée par le pancréas et déversée dans l'intestin lors des repas. Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'obstruction des canaux pancréatiques par le mucus trop visqueux mène la trypsine à s'infiltrer dans la circulation sanguine. La TIR est donc augmentée chez 90% des enfants CF en période néo-natale. Les nouveaux-nés identifiés par le dépistage néonatal voient leur diagnostic confirmé par l'identification de deux mutations responsables de mucoviscidose et par le test de la sueur (Figure 3) (Munck and Roussey, 2008). Si le dépistage néonatal permet d'identifier les nouveau-nés porteurs de 2 mutations sévères et de les prendre en charge plus précocement, il permet aussi de repérer des enfants porteurs de mutations à effet modéré, qui ne développeront pas forcément de pathologie liée à *CFTR*, voire des hétérozygotes sains (Parad and Comeau, 2005; Thauvin-Robinet, et al., 2009).

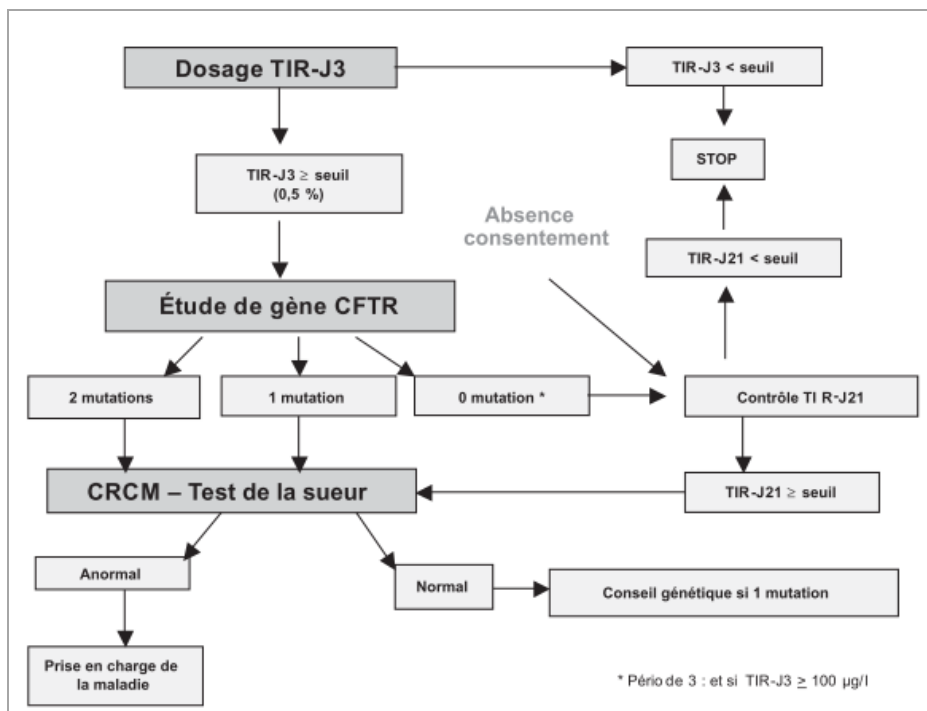


Figure 3. Organigramme du dépistage néonatal de la mucoviscidose (issu de (Munck and Roussey, 2008))

II. Principaux tests biologiques pour la mise en évidence d'un défaut de CFTR

1. Test de la sueur (iontophorèse à la pilocarpine)

Physiologiquement, les ions chlorures présents dans les sécrétions sudorales sont réabsorbés par les cellules épithéliales tapissant le canal glandulaire. Chez les patients CF, le défaut de CFTR ne

permet pas cette réabsorption, et les concentrations en chlorures et en sodium à la surface de la peau sont anormalement élevées (Gibson and Cooke, 1959). La sueur est hypertonique, et les patients présentent une sensibilité accrue à la déshydratation. La mesure des ions chlorures sudoraux par le test décrit en 1956 par Gibson et Cooke est encore aujourd'hui le « gold-standard » pour le diagnostic de la mucoviscidose (Gibson and Cooke, 1959).

Après stimulation de la sudation par iontophorèse à la pilocarpine, molécule aux propriétés cholinergiques, la sueur est recueillie sur un papier-buvard (pour dosage titrimétrique, méthode de référence de Gibson et Cooke) ou dans un dispositif collecteur Macroduct ou Nanoduct (pour dosage coulométrique, basé sur le principe de saturation d'une électrode d'argent par les ions chlorures de la sueur). La concentration normale en ions chlorure est inférieure à 30 mmol/L de sueur, et la valeur pathologique est supérieure à 60 mmol/L. Entre ces deux valeurs, le résultat est considéré comme intermédiaire ou « douteux ». Ce test, qui nécessite un personnel et des installations spécialisés, constitue l'examen clé pour conforter ou récuser le diagnostic de mucoviscidose (Farrell, et al., 2008; Sermet-Gaudelus, et al., 2010c). Il est sensible (83%) et spécifique (98%), et seuls 2 % des patients atteints de mucoviscidose présentent un test de la sueur normal (mucoviscidose atypique, avec des mutations à effet modéré)(LeGrys, 1996; Rota, et al., 2008). Des faux positifs, de cause technique (collection de sueur insuffisante, évaporation, matériel souillé...) ou pathologique (déshydratation, eczéma, malnutrition, pseudo-hypoaldostéronisme...) dépendent du manipulateur et de l'évaluation clinique (Beauchamp and Lands, 2005).

2. Différence de potentiel trans-épithéliale nasale

Le transport d'ions à travers l'épithélium respiratoire génère une différence de potentiel (ddp) trans-épithéliale qui peut être mesurée *in vivo*. Le dysfonctionnement de CFTR à la surface apicale des cellules de la muqueuse nasale augmente la réabsorption de sodium et diminue celle du chlorure, ce qui se traduit par une ddp nasale anormale (Figure 4). Cet examen requiert des installations et un personnel spécialisé. La méthode, réalisable chez les individus de plus de 6 ans, est plus sensible que le test de la sueur, et permet d'identifier certains patients atteints de mucoviscidose et ayant un test de la sueur normal ou intermédiaire (De Boeck, et al., 2006). La mesure de la ddp transépithéliale nasale peut permettre le diagnostic de formes atypiques de mucoviscidose avec test de la sueur intermédiaire (Sermet-Gaudelus, et al., 2010b)

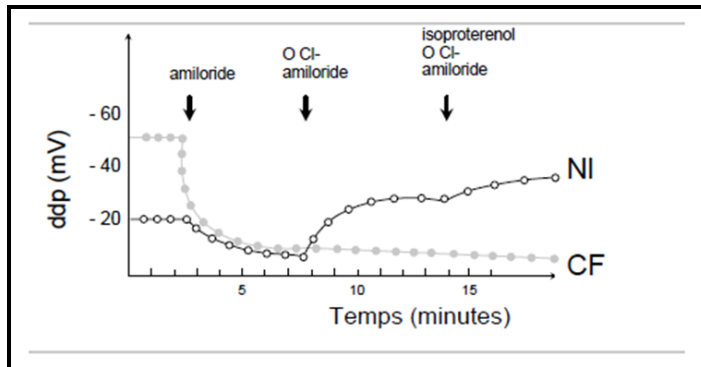


Figure 4. Mesures de la différence de potentiel transépithéliale nasale chez un patient CF et un témoin normal (NI). La réabsorption exagérée de sodium et la diminution d'absorption des chlorures se traduisent chez le patient CF par un abaissement de la ddp nasale basale (inférieure à -40mV) sensible à l'amiloride (agent inhibiteur de la réabsorption de sodium due au canal ENaC). La stimulation de la sécrétion de chlorure par un gradient de concentration (instillation d'une solution sans chlorure) ou un agent pharmacologique (isoprotérénol, agent β -agoniste augmentant la concentration intracellulaire d'AMPC) entraînant normalement un efflux de chlorure (et donc une repolarisation avec des valeurs de ddp plus négatives) est inefficace chez le sujet CF.

3. Analyse moléculaire du gène *CFTR*

Le gène *CFTR* est le seul gène connu comme étant associé à la mucoviscidose. Environ 1900 variations du gène ont été décrites (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app), avec des fréquences très variables selon les régions (Bobadilla, et al., 2002). Étant donnée la taille du gène (190 kb au total, avec 27 exons, soit 6,5 kb de région codante), il n'est pas approprié de réaliser une étude complète du gène pour tous les patients. Parmi les laboratoires du réseau national de génétique moléculaire « mucoviscidose », les 4 laboratoires de référence (Brest, Montpellier, Paris-Cochin et Créteil) ont une expertise et des missions particulières, dont fait partie l'analyse de la totalité des régions codantes du gène *CFTR*. La stratégie d'analyse moléculaire du gène, réalisée en 3 étapes (Figure 5), dépend des indications de l'analyse et de l'origine géographique du patient.

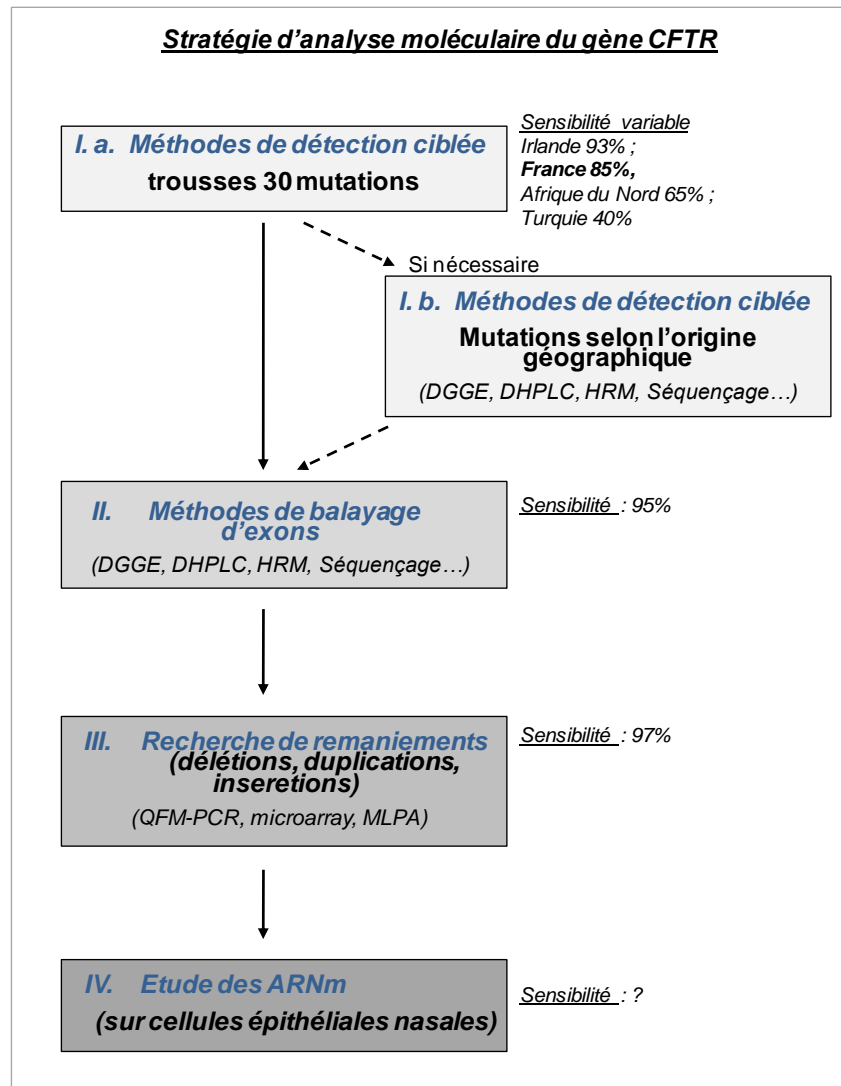


Figure 5. Stratégie d'analyse moléculaire du gène CFTR.

La réalisation de chaque étape (I.a, I.b, II et III) est à discuter en fonction des indications cliniques (diagnostique de mucoviscidose, de pathologie liée à CFTR, étude familiale...)

En premier lieu, les mutations les plus fréquentes observées chez les patients d'origine caucasienne sont recherchées à l'aide de différentes trousses commerciales avec une sensibilité évaluée entre 80 et 85% (kits *Cystic Fibrosis Genotyping Assay*, Abbott ; *ElucigeneTMCF30* ; Gene-Probe ; *INNO-Lipa CFTR*, Innogenetics), et la recherche ciblée des mutations les plus fréquentes hors trousses, selon les origines géographiques des patients, est réalisée par des techniques de balayage. En second lieu, et selon l'indication, une analyse plus poussée peut être réalisée dans les laboratoires de niveau 2. Un balayage de toutes les régions codantes, par diverses techniques de type DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Costes, et al., 1995; Fanen, et al., 1992), DHPLC

(*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) (Le Marechal, et al., 2001), ou plus récemment par la technique HRM (*High-Resolution Melting Analysis*) (Audrezet, et al., 2008; Wittwer, et al., 2003), ainsi que par séquençage, permettent de rechercher des mutations plus rares, détectant près de 95% des anomalies du gène *CFTR*. Enfin, une troisième étape est la recherche de larges remaniements du gène, qui ne sont pas détectés par les techniques précédemment citées. Cette recherche de remaniements repose sur le principe de semi-quantification allélique, en général par PCR multiplex avec amorces fluorescentes (Audrezet, et al., 2004; Niel, et al., 2004; Taulan, et al., 2007a). Autrefois réalisée uniquement dans quelques laboratoires, par des techniques « maisons » de mise au point difficile, la recherche de remaniements se généralise actuellement avec l'arrivée sur le marché de kits « clef en main » comme le kit MLPA SALSA (MRC-Holland) reposant sur le principe d'amplification dépendante de la ligation de sondes (*Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification*) (Schouten, et al., 2002). Les grands réarrangements, de type large délétion, insertion ou duplication, représentent environ 1,5-2% des allèles chez les patients CF (Audrezet, et al., 2004; Niel, et al., 2004).

Un dernier niveau d'étude peut être réalisé, mais n'a pas encore toute sa place en routine de diagnostic. Il s'agit de la recherche de transcrits anormaux par étude de l'ARN messager (ARNm) *CFTR* à partir de prélèvements de cellules épithéliales nasales qui expriment ce gène. Ce type d'analyse permet de détecter des mutations associées à des anomalies d'épissage (Costa, et al., 2011), ou des anomalies de quantité globale d'ARNm (défaut de transcription ou instabilité de l'ARNm).

III. De la mucoviscidose à la pathologie CFTR : un continuum clinique

Le diagnostic de mucoviscidose ou de pathologie CFTR repose à la fois sur des arguments cliniques et biologiques. Si la plupart des patients présentent une forme sévère de la maladie, avec atteinte multisystémique, il existe des cas de formes plus modérées ou atypiques. Ces formes modérées, voire monosymptomatiques n'ayant pas le même pronostic que les formes classiques de la maladie, il a été décidé de les distinguer de la pathologie « mucoviscidose », pour des raisons psychologiques, sociales (assurances, services sociaux) et médicales (suivi moins complexe). C'est pourquoi un consortium réuni par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), avec la participation de l'European CF Thematic Network (ECFTN), avait établi en 2000 des critères diagnostiques permettant de différencier la mucoviscidose classique, la mucoviscidose atypique, et les pathologies monosymptomatiques liées à *CFTR* ou CFTR-RD (*CFTR-Related Disorder*) (WHO, 2000). Plus

récemment, cette classification a été remise à jour lors de « workshops » organisés par EuroCareCF en 2007 et 2008, réunissant 35 experts européens et Nord-américains (Bombieri, et al., 2011), classant les différentes formes de la maladie en deux entités : la maladie mucoviscidose CF et les pathologies CFTR ou CFTR-RD.

1. Mucoviscidose classique

Les critères cliniques, reconnus au plan international et validés par la conférence de consensus de la CFF (*Cystic Fibrosis Foundation*), sont ceux rapportés par Rosenstein et Cutting en 1998 et revus par la conférence de consensus de la CFF (*Cystic Fibrosis Foundation*) en 2007 (Figure 2, page 9) (Farrell, et al., 2008; Rosenstein and Cutting, 1998). Dans la mucoviscidose classique, le taux de CFTR fonctionnel est proche de 0%, et pour la majorité des patients qui remplit les critères indiqués dans le Tableau 1, l'établissement du diagnostic ne pose pas de difficulté particulière, de par leur présentation clinique et leur test de la sueur supérieur à 60 mmol/L. Parmi eux, environ 85% nécessitent une supplémentation en enzyme pancréatique (PI).

Une ou plusieurs caractéristiques phénotypiques (cf Figure 2) ou un antécédent familial de mucoviscidose dans la fratrie ou un dépistage néonatal positif,
associée à
1 test de la sueur positif ou 2 mutations identifiées du gène <i>CFTR</i> ou une ddp nasale pathologique.

Tableau 1 Critères diagnostiques de la mucoviscidose
Ce diagnostic repose sur l'association de paramètres cliniques et biologiques

Une minorité de patients ne remplit pas les critères de mucoviscidose classique, et leur diagnostic ne peut être sûrement affirmé sur leurs signes cliniques, mais repose sur des tests fonctionnels de la protéine CFTR ou l'analyse moléculaire du gène. Ils développent en général une pathologie tardive, avec une fonction pancréatique conservée et une symptomatologie respiratoire modérée. Le test de la sueur est « intermédiaire » (entre 30 et 60 mmol/L) (De Boeck, et al., 2006; Southern, 2007). Le choix a été fait de classer ces formes, dites « atypiques » ou « non classiques » parmi les CFTR-RD ou pathologies liées à CFTR (Bombieri, et al., 2011).

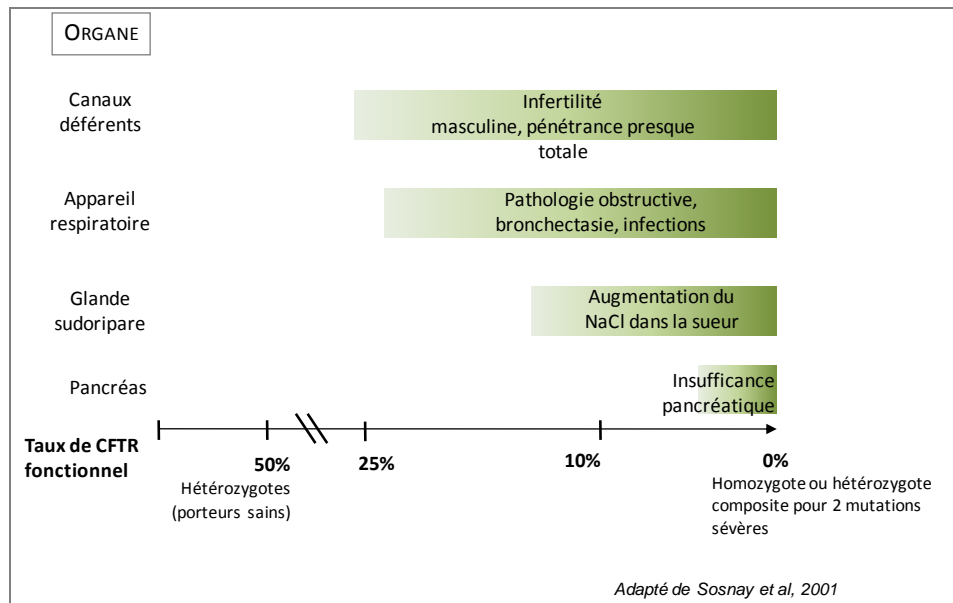


Figure 6. Atteinte des différents tissus en fonction de l'activité résiduelle de CFTR Corrélation génotype-phénotype selon les organes. La pénétrance relative dans les différents organes est indiquée en fonction du taux de CFTR fonctionnel. L'organe le plus sensible à une diminution de l'activité de CFTR est l'appareil reproducteur masculin (canaux déférents). L'insuffisance pancréatique exocrine est observée lorsque le taux de CFTR fonctionnel résiduel est inférieur à 10%. Adapté de (Sosnay, et al., 2011)

2. CFTR-RD ou pathologie liée à CFTR

Le terme de CFTR-RD (*CFTR Related Disorder*) ou pathologie liée à CFTR, parfois encore appelée CFTR-opathie, désigne des formes atypiques, modérées de la maladie, parmi lesquelles des atteintes mono-symptomatiques. Ce sont des entités cliniques associées à une dysfonction de CFTR mise en évidence par l'identification de variants moléculaires ou les anomalies des tests fonctionnels (test de la sueur, ddp nasale) mais ne remplissant pas les critères diagnostiques de la mucoviscidose. Ce terme est associé à un large spectre de maladie, en relation avec le gradient de dysfonction de CFTR (Figure 6). Les principales entités cliniques mono-symptomatiques sont : l'infertilité masculine par absence bilatérale des canaux déférents (ou ABCD, dont la fréquence est évaluée à 1/1000 hommes), les pancréatites chroniques ou les pancréatites aiguës récurrentes, les dilatations des bronches, les polyposes nasosinusiennes, des bronchites chroniques, des sinusites à répétitions (Tableau 2). Le génotype chez ces patients associe en général *en trans* une mutation sévère et une mutation à effet modéré, voire 2 mutations modérées ensemble. A part pour le variant d'épissage T5 de l'intron 8 fréquemment associé à des infertilités, on retrouve plutôt dans ces formes monosymptomatiques des mutations rares (Bombieri, et al., 2011). Le génotype est à l'origine d'une diminution partielle du taux de CFTR fonctionnel, ce qui explique l'atteinte modérée organe spécifique (Figure 6).

Liste des CFTR-RD proposée par l'OMS
Azoospermie obstructive (ABCD ou AUCD)
Pancréatite chronique
Aspergillose allergique broncho-pulmonaire
Dilatation des bronches
Cholangite sclérosante

Tableau 2. Classification des CFTR-RD proposée par le consortium de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2000 (WHO, 2000). L'hypertrypsiniémie néonatale qui rentrait dans la première classification, concernant les enfants avec un dépistage néonatal positif et une seule mutation identifiée, a été supprimée, ces enfants étant soit simple hétérozygotes asymptomatiques, soit porteur d'une mutation rare non identifiée.

Le plus souvent, établir le diagnostic de mucoviscidose ou de forme monosymptomatique ne pose pas de difficulté majeure. Cependant, dans un certain nombre de formes CFTR-RD, le diagnostic n'est pas clair, et il existe une « zone grise » entre CFTR-RD et CF. L'atteinte de chaque organe dépend du taux résiduel de CFTR fonctionnel dans le tissu concerné (Figure 6), ce taux pouvant subir des variations selon l'âge, des facteurs génétiques ou environnementaux. Ainsi, une atteinte monosymptomatique peut évoluer en atteinte pluri-organes, et une forme CFTR-RD peut progresser en une forme CF (Bombieri, et al., 2011; De Boeck, et al., 2006).

IV. Caractéristiques moléculaires de CFTR

1. CFTR , du gène à la protéine

Le gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*, également appelé ABCC7, MIM*602421) est un des premiers gènes identifiés par clonage positionnel en pathologie humaine en 1989 (Riordan, et al., 1989; Rommens, et al., 1989b). Localisé en 7q31, il s'étend sur 190kb et est constitué de 27 exons classiquement numérotés de 1 à 24 (avec des exons 6a et 6b, 14a et 14b, 17a et 17b). Deux nomenclatures sont aujourd'hui utilisées concernant le gène *CFTR* : la nomenclature traditionnelle (anciennement utilisée, exons numérotés de 1 à 24) et la nomenclature HGVS (*Human Genome Variation Society*) qui suit les recommandations internationales. A ce jour, si environ 1900 variations de séquence du gène *CFTR* ont été décrites, c'est une trentaine de mutations qui représente 85% des allèles retrouvés chez les patients (www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app). La plus

fréquente, la mutation F508del (c.1521_1523delCTT, p.Phe508del selon la nomenclature HGVS), anciennement appelée deltaF508, et qui entraîne la délétion d'un codon phénylalanine, représente à elle seule 70% des allèles (Castellani, et al., 2008).

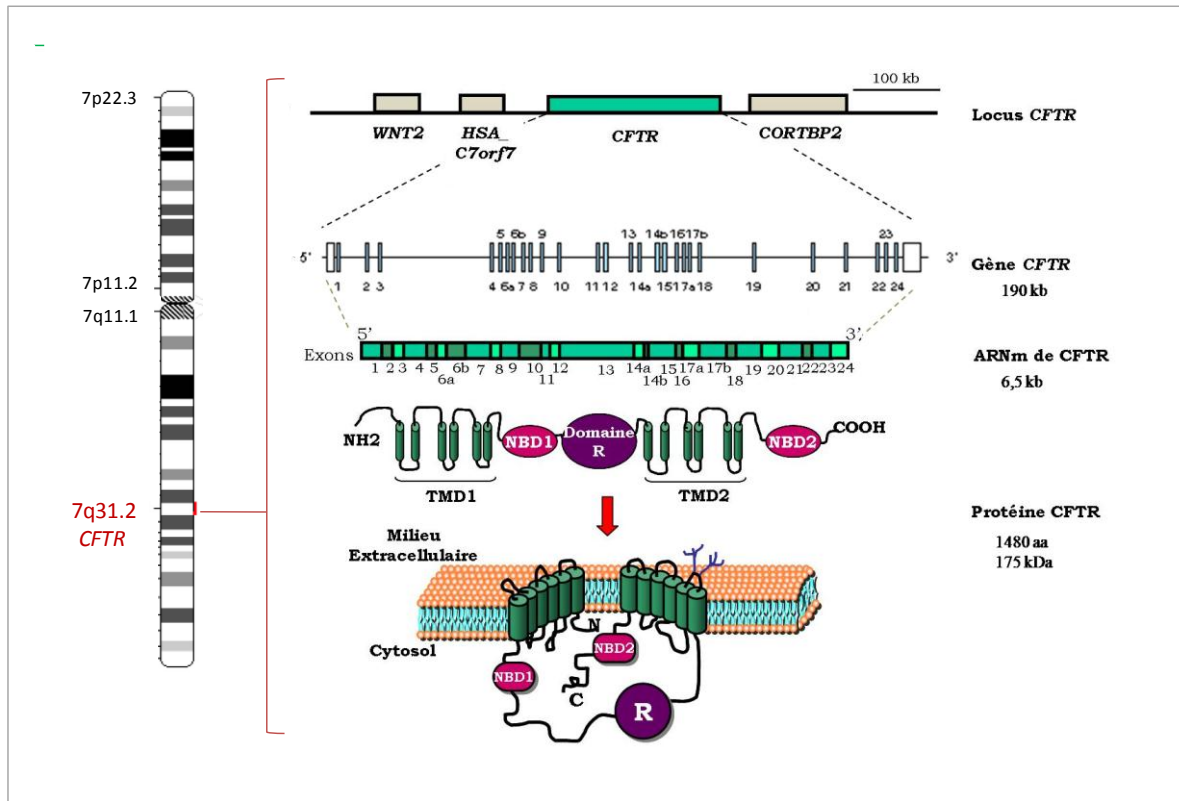


Figure 7. CFTR, du gène à la protéine. Localisé en 7q31, le gène *CFTR* s'étend sur 190 kb. Il est constitué de 27 exons (numérotés de 1 à 24 selon la nomenclature traditionnelle) et code un ARN messager de 6,5kb. Cet ARN est traduit en une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés (175 kDa) glycosylée sur la 4^{ème} boucle extra-cellulaire.

Structure de la protéine CFTR

Le gène *CFTR* code un ARN messager (ARNm) de 6,5 kb, qui est traduit en une protéine de 1480 acides aminés (Figure 7). Après différents processus de modifications post-traductionnelles, la glycoprotéine mature CFTR, de 175 kDa, gagne la membrane apicale des cellules épithéliales où elle exerce son activité de canal anionique. Comme d'autres membres de la superfamille des ABC transporteurs (*ATP Binding Cassette*) dont elle fait partie, CFTR est une protéine monomérique relativement symétrique. Les 2 moitiés, constituées chacune d'un domaine hydrophobe transmembranaire (TMD pour *TransMembrane Domain*) et d'une importante région hydrophile intracytoplasmique capable de lier l'ATP (NBD pour *Nucleotide Binding Domain*) (Aleksandrov, et al.,

2007; Gadsby, et al., 2006), sont reliées entre elles par le domaine régulateur R intra-cytoplasmique. Les TMD, constitués chacun de 6 segments transmembranaires (TM1-12), sont impliqués dans la formation du pore anionique (Riordan, et al., 1989).

Mécanisme d'ouverture du canal

A l'état basal, aucun courant chlorure n'est mesuré au travers du canal CFTR. L'augmentation intracellulaire de l'AMPc permet d'activer la kinase PKA (protéine kinase AMPc dépendante) capable alors de phosphoryler le domaine R. La phosphorylation du domaine R par les kinases PKA et PKC induit un changement conformationnel augmentant l'accessibilité des domaines de liaison des nucléotides NBD1 et NBD2 à l'ATP (Cotten and Welsh, 1997; Riordan, et al., 1989), sur les sites consensus de liaison à l'ATP nommés Walker A et B (Walker, et al., 1982). La liaison de deux molécules d'ATP au niveau des deux NBDs permet un rapprochement de ces deux domaines, enfermant les molécules d'ATP dans une poche. Un signal est alors transmis à la région transmembranaire, permettant l'ouverture du canal qui est maintenue jusqu'à l'hydrolyse de l'ATP au niveau du NBD2. L'hydrolyse de cette 2^{ème} molécule d'ATP affaiblit la liaison NBD1-NBD2, ce qui déclenche la fermeture du canal (Aleksandrov, et al., 2007; Gadsby, et al., 2006; Zhou, et al., 2006)

2. La régulation de l'expression génique

Le profil d'expression de CFTR varie selon les tissus et le stade du développement. Une régulation si fine ne peut être encore expliquée par la seule présence des éléments régulateurs identifiés dans son promoteur. Cependant, cette séquence est clairement nécessaire pour l'expression génique, et mérite donc de plus amples investigations pour déterminer son mécanisme d'action. Des études ont montré les similarités de entre le promoteur *CFTR* et les promoteurs des gènes de ménage. D'autres éléments pouvant contribuer à la régulation spatio-temporelle de l'expression du gène sont l'utilisation de multiples sites de début de transcription et le recrutement d'exons 1 alternatifs.

2.1. Profil d'expression spatio-temporel de *CFTR*

Le gène *CFTR* montre un profil d'expression spatio-temporel très finement régulé selon les tissus et au cours du développement.

Notamment, chez le fœtus au 2^{ème} trimestre, l'expression de *CFTR* est très importante dans les poumons, les canaux pancréatiques et les cryptes de l'intestin grêle, et plus faible dans l'épithélium épидidymaire fœtal. Ce profil est maintenu après la naissance, à l'exception du système respiratoire

(Harris, et al., 1991; Trezise, et al., 1993). En effet, l'expression de *CFTR* est fortement diminuée dans le poumon adulte par rapport au poumon fœtal (Figure 8) (Crawford, et al., 1991; Engelhardt, et al., 1994; Foulkes and Harris, 1993; Harris, et al., 1991). L'âge de transition pour le changement de taux d'expression pulmonaire du gène n'est pas connu, mais pourrait correspondre à un stade de développement particulier du tissu (White, et al., 1998). Dans le poumon adulte, l'expression de *CFTR* est détectable dans les cellules séreuses et dans les canaux des glandes sous muqueuses, et dans les cellules épithéliales des structures distales des bronches (bronchioles et alvéoles) (Engelhardt, et al., 1994).

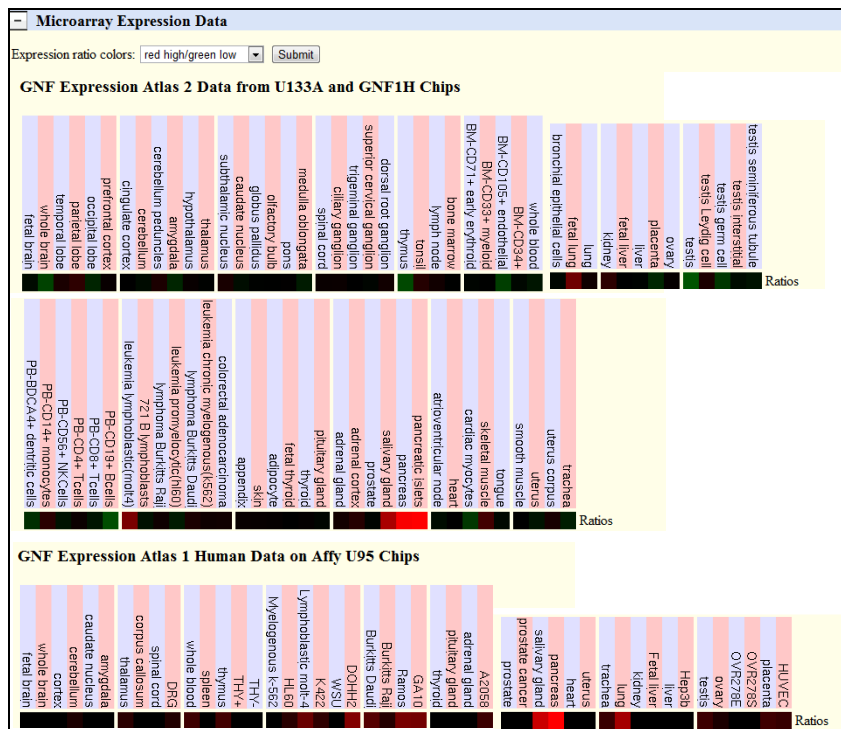


Figure 8. Profil d'expression de *CFTR*, d'après la base de données UCSC genome browser.

2.2. Différents sites d'initiation de la transcription et transcrits alternatifs

1. Les sites alternatifs d'initiation de la transcription

Dans les cellules d'origine humaine, le site d'initiation de la transcription semble varier selon le niveau d'expression de la protéine CFTR. Ainsi, dans les cellules l'exprimant fortement, comme les cellules d'adénocarcinome de colon HT-29, T84 et Caco-2, le site majeur est en position c.-72 pb par

rapport au codon initiateur ATG de l'exon 1, mais d'autres sites mineurs sont également utilisés (Koh, et al., 1993; Yoshimura, et al., 1991). Dans les cellules exprimant faiblement le canal, comme les cellules HeLa et PANC-1 (adénocarcinome épithélial pancréatique), c'est le site d'initiation en c.-153 pb qui est le plus utilisé (Koh, et al., 1993).

Dans le poumon humain, un changement de site d'initiation s'opère au cours du développement : le site majoritaire dans le poumon fœtal est positionné en c.-132 pb, tandis que le site utilisé dans le poumon adulte est en c.-69 pb (Figure 9). Ce changement de site d'initiation de la transcription pourrait participer à la régulation de la transcription et expliquer la diminution d'expression de CFTR dans le poumon adulte par rapport au poumon fœtal (White, et al., 1998).

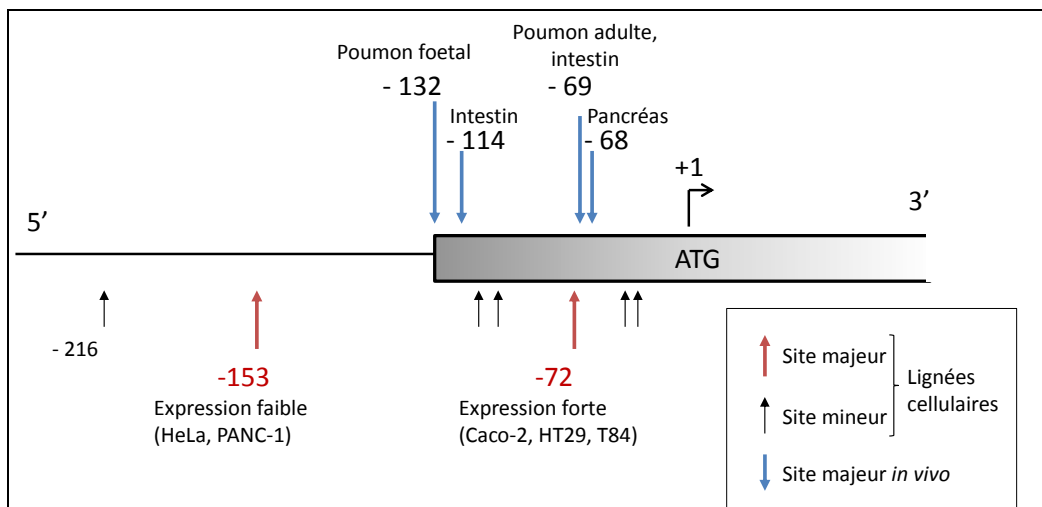


Figure 9. Les différents sites de début de transcription de CFTR

2. les exons alternatifs à l'exon 1

Des exons alternatifs à l'exon 1 ont été décrits chez la souris (exon -1) (White, et al., 1998), le mouton (exons ov1aS et ov1aL) (Mouchel, et al., 2003; White, et al., 1998) et le lapin (exons -1A, -1B, -1C) (Davies, et al., 2004). Chez la souris, la production du transcrit contenant l'exon -1, qui utilise un site d'initiation de la traduction en position c.-549 pb, est régulée lors de la spermatogénèse (White, et al., 1998). Au cours du développement pulmonaire, le maximum d'expression du transcrit ov1aS chez le mouton correspond au moment où l'expression de CFTR commence à décliner (Mouchel, et al., 2003), tandis que les différents isoformes d'ARNm sont régulés au cours du développement cardiaque chez le lapin (Davies, et al., 2004).

Des isoformes d'ARNm CFTR contenant un exon 1 alternatif ont également été identifiés chez l'homme à partir d'une banque d'ADNc d'origine pancréatique (Rommens, et al., 1989a), puis

confirmés dans les lignées d'adénocarcinome pancréatique CFPAC et coliqueT84, et dans des extraits de poumon fœtal humain (Koh, et al., 1993; Mouchel, et al., 2003). L'usage de ces exons alternatifs -1a et 1a exclut l'exon 1 habituel (Koh, et al., 1993). L'exon -1a ne contient pas d'AUG, mais contient un codon d'initiation alternatif potentiel CUG. L'exon 1a contient des codons de terminaison quelle que soit la phase de lecture. Dans le poumon fœtal humain, on retrouve de manière transitoire les isoformes contenant les exons -1a/1a/2 et -1a/2 (Figure 10). Si le transcrit -1a/1a/2, contenant dans l'exon 1a un codon de terminaison, ne permet pas de produire de protéine, le transcrit -1a/2 pourrait utiliser un codon d'initiation alternatif CUG (exon -1a) et utilise *in vitro* des codons AUG de l'exon 4 (M150, M152 or M156) (Lewandowska, et al., 2009). Ces transcrits alternatifs apparaissent juste avant le début de la diminution globale de CFTR dans la phase canaliculaire du développement pulmonaire, et leur quantité diminue au cours de la grossesse, entre 14 et 26 semaines, alors que la quantité globale d'ARN *CFTR* ne semble pas varier (Mouchel, et al., 2003). Le rôle de cette transcription alternative est mal connu. Il est possible que ces ARNm, ne menant pas à une protéine fonctionnelle, aient un effet régulateur important lors du développement pulmonaire, par exemple en diminuant la traduction de CFTR (diminution de l'accrochage de la sous unité ribosomale 40S) (Mouchel, et al., 2003).

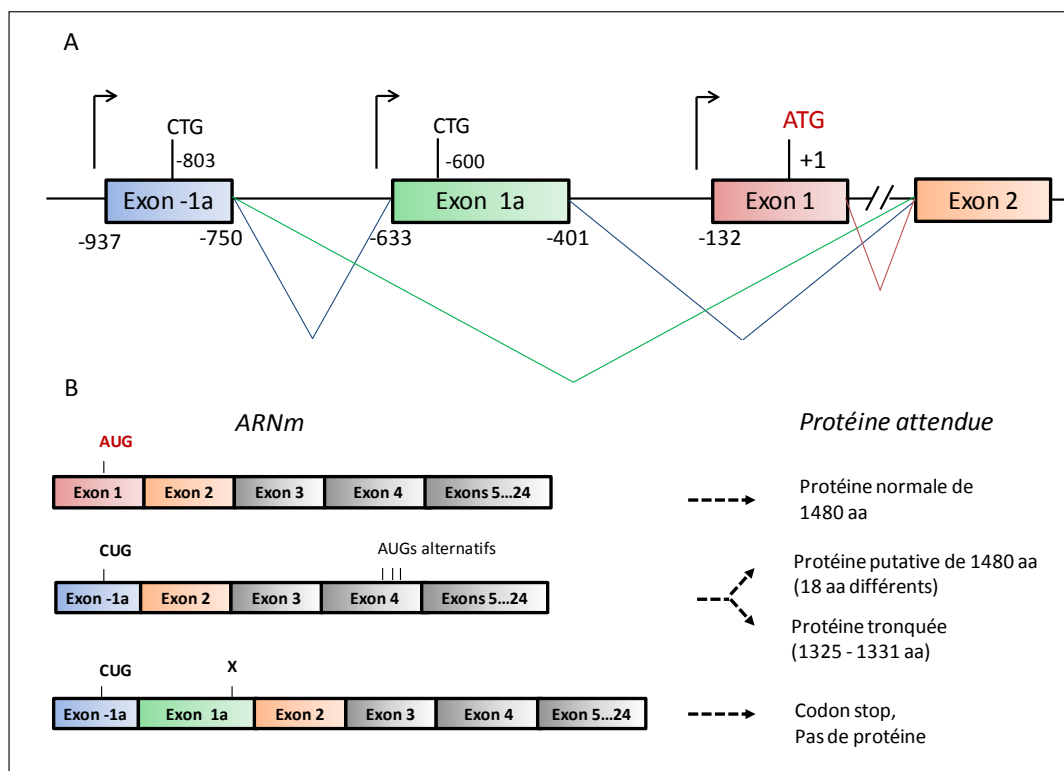


Figure 10. Les transcrits alternatifs de *CFTR* chez l'homme. (A) Position des exons -1a et 1a chez l'homme. Les positions sont données en pb, par rapport au A du codon d'initiation de la traduction. **(B)** Les différents isoformes d'ARNm de *CFTR* au dans le poumon fœtal humain.

2.3. Structure du promoteur

Malgré son profil d'expression, le promoteur de *CFTR* a une structure de type « gène de ménage » ou « housekeeping gene » et ne semble pas contenir les éléments nécessaires à une expression cellule/ tissu spécifique.

Dépourvu de boîte « TATA », il contient une région riche en GC (65%) entre les positions -132 et -724 pb (Chou, et al., 1991). Dès 1991, l'équipe de Chou a défini le promoteur minimal dans la lignée de cellules intestinales Caco-2 à une région de -358pb à -34pb, et a montré la présence d'une séquence inhibitrice en 5' (de -477 à -409 pb) (Figure 11) (Chou, et al., 1991). Ce promoteur à activité transcriptionnelle faible, encore mal connu, contient néanmoins un certain nombre de sites de fixation pour des facteurs protéiques. Toutes les positions des sites décrits ici sont données par rapport au +1 d'initiation de la traduction, selon les recommandations internationales.

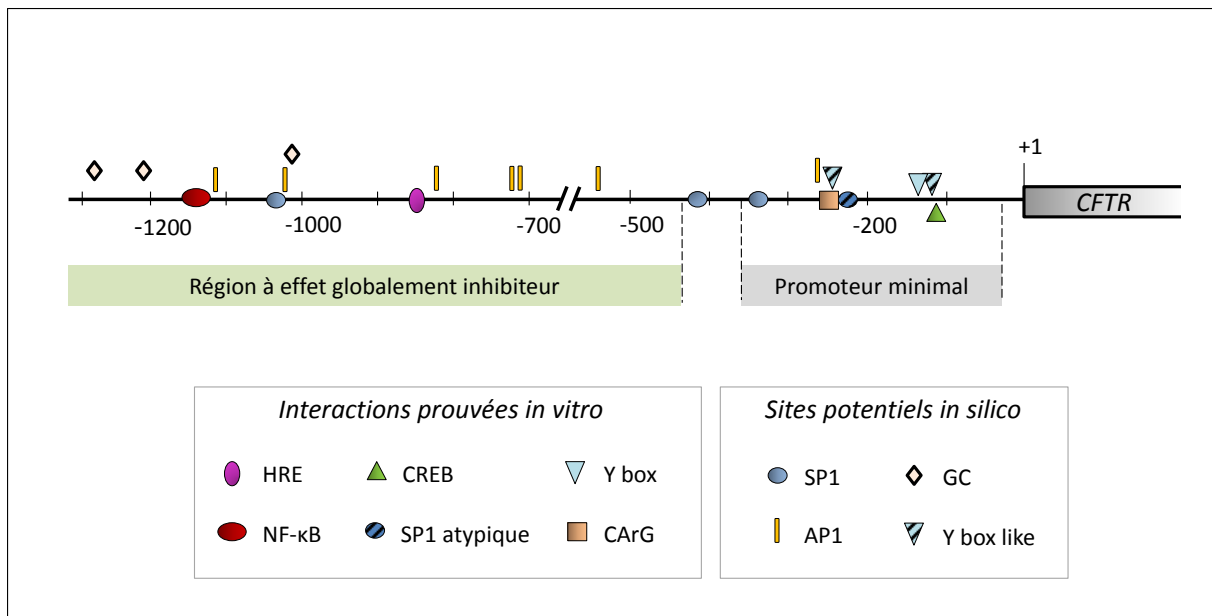


Figure 11. Schéma du promoteur de *CFTR* et de ses sites de liaison pour des facteurs de transcription

1. Les sites Sp1

Le facteur de transcription à doigts de zinc Sp1 (*Specificity Protein 1*), impliqué dans la régulation de la transcription des gènes sans boîte TATA, est exprimé constitutivement dans toutes les cellules (Macleod, et al., 1994). Sp1 contrôle finement l'expression de gènes, en tant qu'activateur ou répresseur, en réponse à des *stimuli* et/ou de façon tissu-spécifique (Tan and Khachigian, 2009). Sa

capacité à recruter constitutivement la machinerie de transcription basale peut aussi permettre la stimulation rapide d'un promoteur en réponse à un *stimulus* comme c'est le cas pour le promoteur du gène *A20*, régulateur de NF- κ B, en réponse au TNF α (Ainbinder, et al., 2002).

Le promoteur *CFTR* contient 3 sites riche en GC, 5'-GGGCGG-3' (-326 pb, -405 pb, -1021 pb) qui sont de potentiels sites de fixation pour Sp1 (Chou, et al., 1991; Yoshimura, et al., 1991). La suppression des sites en -326 pb et -405 pb par mutagenèse sur un fragment de promoteur *CFTR* inactive la transcription d'un gène rapporteur, ce qui témoigne de leur importance pour la régulation du gène (Chou, et al., 1991). Un site non consensus de fixation de Sp1 a également été identifié plus récemment, en position -226 pb, ce site étant muté chez une patiente atteinte de mucoviscidose (mutation c.-226G>T en nomenclature HGVS ou -94G>T en nomenclature traditionnelle). Les études *in vitro* ont montré que ce site était capable de lier Sp1 et USF, et que sa mutation entraînait une diminution de l'activité transcriptionnelle de *CFTR* (Taulan, et al., 2007b).

2. Les sites AP-1

Le complexe AP-1 (*Activator Protein 1*) est un facteur transcriptionnel dimérique composé d'une combinaison de protéines des familles multigéniques Fos et Jun et intervenant dans de nombreux processus cellulaires. Les sites de liaison AP-1 (également appelés TREs pour *T*PA (*12-O-tetra-decanoylphorbol*) *R*esponse *E*lements ou éléments répondant au PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)) sont retrouvés dans de très nombreux promoteurs, et notamment ceux des gènes de ménage.

Les études *in silico* indiquent que le promoteur *CFTR* contient au moins 6 sites de liaison potentiels AP-1, 5'-TGAC/GTCA-3' (positions -354, -557 et -744, -816, -1047, et -1129 pb) (Chou, et al., 1991; Yoshimura, et al., 1991). Le traitement par le PMA (phorbol myristate acetate), une molécule capable d'inhiber la transcription AP-1 dépendante de certains gènes, induit une diminution de la transcription de l'ARNm *CFTR* dans les cellules T84 (McDonald, et al., 1995; Trapnell, et al., 1991). Néanmoins, des essais de gène rapporteur *CAT* (chloramphénicol acétyltransférase d'origine bactérienne) en amont d'un fragment du promoteur *CFTR* dans les cellules Caco-2 ont échoué à confirmer ces résultats, laissant supposer soit que les sites répondant à AP-1 sont plus distaux, soit que le modèle utilisé était imparfait (Chou, et al., 1991).

Par ailleurs, la liaison du facteur AP-1 n'a pas été contrôlée *in vitro*, sauf pour le site localisé en -816, pour lequel les auteurs ont montré l'absence de liaison de ce facteur sur la séquence normale, et sa fixation induite par le mutant naturel -812 T>G (Bienvenu, et al., 1995). Ainsi, si les analyses

bioinformatiques prédisent de nombreux sites répondant à AP-1, l'interaction directe entre ce facteur de transcription et le promoteur *CFTR* n'a pas encore été prouvée.

3. Le site CRE (régulation par l'AMPc)

Le facteur de transcription CREB (CAMP Response Element Binding protein) interagit avec l'ADN au niveau des séquences CRE (CAMP Response Element). Le CRE, un palindrome de 8 paires de bases 5'-TGACGTCA-3', est un élément de réponse crucial dans les cascades moléculaires impliquant l'AMPc.

L'importance de maintenir une transcription basale de *CFTR* via la réponse à l'AMPc grâce au site CREB-like en -119 pb a été démontrée dans des cellules T84 et les cellules JEG-3 de choriocarcinome. En effet, l'inhibition de la protéine kinase A (PKA) dépendant de l'AMPc entraîne une suppression totale de l'expression de *CFTR*. La diminution de l'activité transcriptionnelle a été reproduite par mutagénèse du promoteur *CFTR* sur le site CRE en test luciférase, et l'affinité du facteur CREB avec ce site a été montrée en EMSA (McDonald, et al., 1995). Cet élément CRE est très conservé chez les mammifères (McCarthy and Harris, 2005).

4. L'élément CCAAT inversé (Ybox)

Les protéines C/EBP (CCAAT-Enhancer-Binding Proteins) constituent une famille de facteurs de transcription à fermeture éclair à leucine (bZIP : basic leu^cin zipper) interagissant avec le motif 5'-CCAAT-3'.

Le promoteur *CFTR* contient un élément inversé CCAAT (Y box) entre c.-132 et c.-119 pb, très conservé parmi les mammifères (McCarthy and Harris, 2005), dont la suppression entraîne une diminution de la transcription (Pittman, et al., 1995). Ce site, capable de former des complexes avec C/EBP, et ATF/cAMP (Activating Transcription Factor/cyclic-AMP), est nécessaire à l'activation par l'AMPc de la transcription de *CFTR*. Ce site peut également permettre l'inhibition transcriptionnelle de *CFTR* par fixation de la protéine CDP/cut qui empêche la fixation des activateurs transcriptionnels hCGN5 et ATF-1 (Li, et al., 1999). La protéine CDP/cut recrute également des histones désacétylases qui dirigent la chromatine vers un état transcriptionnellement inactif (Li, et al., 2000).

Par ailleurs, l'analyse *in silico* a mis en évidence deux séquences CCAAT-like, en c.-240 pb et c.-124 pb, dont la plus distale est située dans l'élément CARG-like (Romey, et al., 2000; Yoshimura, et al., 1991).

5. L'élément CARG box

SRF (*Serum Response Factor*) est un facteur de transcription de la famille des protéines MADS box capable de lier la boîte CARG, 5'-CC(A/T)₆GG-3', retrouvée dans le promoteur de gènes de réponse précoce immédiate (« *immediate early response genes* ») tels que *c-fos*, et qui intervient dans la régulation du cycle cellulaire et la différenciation. SRF est notamment exprimé dans les cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B et A549 qui expriment naturellement CFTR (Rene, et al., 2005). Le gène *CFTR* contient un motif CARG-like en position -240 pb qui fut d'abord identifié par des algorithmes bioinformatiques (Romey, et al., 2000) avant que l'interaction entre SRF et le promoteur CFTR ne soit objectivée par des techniques d'EMSA. La surexpression de SRF entraîne une augmentation modérée de l'activité transcriptionnelle du promoteur *CFTR* (Rene, et al., 2005).

6. Le site NF-kappaB

Le facteur de transcription NF-kappaB (NF-κB) est un dimère capable de lier l'élément consensus 5'-GGGNNTYCC-3' et impliqué dans de nombreuses fonctions comme la division cellulaire et l'inflammation. La voie de l'inflammation NF-κB sera développée ultérieurement (chapitre 2, page 43)

Les cytokines pro-inflammatoires sont connues pour moduler le taux d'ARNm de *CFTR*. Ainsi, l'IL1-β stimule la production de l'ARNm *CFTR* d'une manière temps et dose-dépendante dans les cellules Calu-3 et HT-29 (Brouillard, et al., 2001; Cafferata, et al., 2001). Dans les cellules Calu-3, l'IL-1β entraîne une augmentation de la liaison de NF-κB (dimère p65/p50) à un élément du promoteur *CFTR*, entre les positions c.-1173 et c.-1163pb, corrélée à une augmentation transcriptionnelle (Brouillard, et al., 2001). Le rôle de NF-κB a été confirmé par l'abolition de cette augmentation transcriptionnelle par des traitements inhibiteurs de cette voie de transduction (pyrrolidine dithiocarbamate PDTC, N-acétylcystéine NAC) dans les cellules Calu-3 et T84 (Brouillard, et al., 2001; Cafferata, et al., 2001).

De manière surprenante, le TNFα, une autre cytokine pro-inflammatoire, n'a pas la même action sur l'ARNm de *CFTR* que l'IL1-β. En effet, si l'IL1-β entraîne une augmentation de la quantité d'ARNm *CFTR* dans les cellules Calu-3 et les HT-29, le TNFα a un effet dissocié et provoque une augmentation de l'ARNm *CFTR* dans les Calu-3 et une diminution dans les HT-29. Il est probable que les différents signaux activés par ces deux cytokines leur confèrent des propriétés différentes dans certaines conditions (Brouillard, et al., 2001).

7. Le site HRE

HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor-1*) est un facteur répondant à l'hypoxie ubiquitaire impliqué dans de nombreuses voies de signalisation, capable de fixer dans les promoteurs des gènes des éléments HRE (*HIF Responsive Element*) 5'-NCGTG-3'. Des travaux avaient déjà montré que l'oxygénation permet d'augmenter la maturation et l'expression de CFTR à la membrane dans des cultures cellulaires MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*) mais n'avait pas réussi à mettre en évidence de variation de l'ARNm *CFTR* (Bebok, et al., 2001).

Une variation fine de l'ARNm en relation avec l'hypoxie a cependant été observée plus récemment (Zheng, et al., 2009). Dans le contexte intestinal de la diarrhée, l'hypoxie est connue pour altérer les flux d'eau et de chlorures. Zheng *et al.* ont montré que l'hypoxie entraîne une diminution de l'ARNm de *CFTR* *in vitro* dans les cellules Caco-2 et T84, et *in vivo* dans les intestins de souris. L'analyse *in silico* a identifié en position c.-850pb du promoteur *CFTR* un site HRE 5'-ACGTG-3' qui n'avait pas été repéré lors des études précédentes (White, et al., 1998; Yoshimura, et al., 1991). La fixation de HIF-1 sur ce site HRE a été confirmée en ChIP, et des tests luciférase ont montré que l'hypoxie était à l'origine d'une diminution de l'activité transcriptionnelle du promoteur *CFTR* (Zheng, et al., 2009).

8. La régulation hormonale

Le gène *CFTR* semble subir une régulation hormonale, tant chez les mâles que les femelles. La régulation tissu-spécifique de l'expression de *CFTR* par les œstrogènes a été démontrée dans l'utérus et les oviductes de rattes, ces hormones entraînant une augmentation de l'ARNm *CFTR* (Rochwerger and Buchwald, 1993). D'autres auteurs ont montré que dans les cellules épithéliales glandulaires endométriales de porc, l'ARNm *CFTR* diminue dans les cellules traitées par l'association œstradiol/progestérone, par rapport aux cellules traitées uniquement à l'œstradiol. Cet effet régulateur de l'expression de *CFTR* par les hormones sexuelles semble être tissu-spécifique, car le taux d'ARNm dans les autres organes (intestin, poumon) ne change pas durant le cycle menstruel (Rochwerger, et al., 1994).

Malgré les observations en faveur d'une influence hormonale sur *CFTR*, les éléments régulateurs responsables n'ont pas encore été identifiés. Notons cependant la présence d'éléments répondant aux glucocorticoïdes dans le promoteur *CFTR*, en positions c.-1537, -1297, -1211, et -1012 pb (Harris, et al., 1991; Yoshimura, et al., 1991).

9. Les régions hypersensibles à la DNase I

Les éléments régulateurs peuvent également être disséminés assez loin en amont ou en aval du gène, ou dans des régions introniques. Des régions de chromatine ouverte et active avec une sensibilité accrue à la DNase I sont retrouvées dans de nombreux éléments *cis* et sont souvent associées à la liaison de facteurs de transcription avec l'ADN. L'équipe d'A. Harris, par screening sur 400 kb d'ADN génomique dans la région du gène *CFTR*, a cartographié 19 sites DHS (*DNase Hypersensitive Site*), dont certains sont tissu-spécifiques (Figure 12) (Phylactides, et al., 2002; Smith, et al., 1996; Smith, et al., 1995; Smith, et al., 2000). Dans la région 5' de *CFTR*, les DHS en -79,5kb et -20,9kb sont également retrouvés dans les cellules n'exprimant pas *CFTR* et ne sont pas tissu-spécifiques. La région 3'UTR de *CFTR* contient 5 DHS (en 4574+ 5.4kb, +6.8kb, +7.0kb, +7.4kb, et +15.6 kb) dont la présence est restreinte aux cellules épithéliales (Nuthall, et al., 1999). Plus particulièrement, le DHS en position 4574+15.6 kb n'a été retrouvé que dans les cellules exprimant *CFTR*, et peut fixer in vivo les facteurs CREB/ATF, AP-1 et C/EBP. Dans les régions introniques du gène, 12 clusters de DHS ont été identifiés (introns 1, 2, 3, 10, 16, 17a, 18, 20, 21) dont certains sont tissu-spécifiques. Cinq DHS (introns 1, 10, 17a, 20) notamment sont capable de lier le facteur de transcription HNF1 α (*Hepatocyte Nuclear Factor 1 α*) qui peut entraîner l'augmentation de l'expression de *CFTR* dans certaines conditions (Mouchel, et al., 2004; Paul, et al., 2007; Rowntree, et al., 2001)

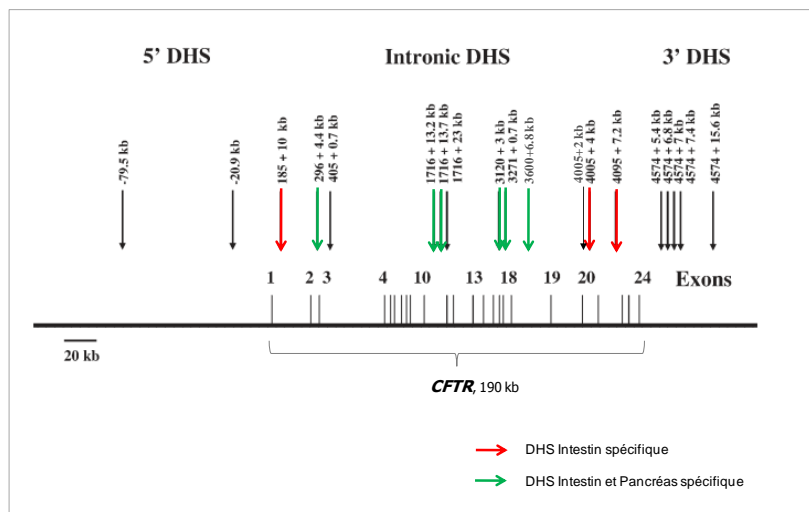


Figure 12. Cartographie des DHS, d'après (Phylactides, et al., 2002)

10. La régulation épigénétique

Le gène *CFTR* a une régulation tissulaire spatio-temporelle spécifique. En dépit de nombreux travaux, aucun élément responsable de la spécificité tissulaire n'a été identifié. Un certain nombre d'éléments suggèrent que des modifications épigénétiques pourraient jouer un rôle dans sa régulation. Son promoteur est hyperméthylé dans des lignées cellulaires tumorales de cancers digestifs divers (Koh, et al., 1993). De plus, des modifications de la chromatine ont été décrites en réponse à des *stimuli* environnementaux dans le gène *CFTR* (Bartoszewski, et al., 2008). Enfin, une réduction de l'histone désacétylase HDAC 2 a été observée dans les cellules épithéliales des voies aériennes de patients atteints de mucoviscidose (Bartling and Drumm, 2009).

Les éléments de régulation actuellement connus de *CFTR* ne permettent pas de comprendre les mécanismes régissant le profil d'expression du gène, tant au cours du développement qu'en réponse à différents *stimuli*. Mieux comprendre cette régulation transcriptionnelle pourrait permettre de s'orienter vers de nouvelles cibles thérapeutiques.

Par ailleurs, lors de l'analyse moléculaire de *CFTR* chez les patients, à la recherche des mutations causales, le promoteur n'est classiquement pas analysé. En effet, les connaissances très limitées sur cette région permettraient difficilement de pouvoir interpréter les résultats. Néanmoins, quelques mutations du promoteur ont déjà été décrites. Une substitution T>G activant un site de liaison d'AP-1 en c.-812 pb a été décrite chez un patient présentant une forme classique de mucoviscidose. Parmi 3 autres variations identifiées dans le promoteur minimal, le polymorphisme c.-234T>A (-102T>A) crée un site de liaison pour le facteur de transcription YY1 (Ying Yang 1), augmentant l'expression de *CFTR* (Romey, et al., 1999; Romey, et al., 2000). Parmi les mutations encore non identifiées, particulièrement chez les patients avec des formes modérées ou atypiques de mucoviscidose, certaines pourraient se trouver dans les éléments de régulation.

Dans un contexte de mise en place de l'analyse des transcrits anormaux du gène *CFTR* au laboratoire de diagnostic, nous avons développé au laboratoire de recherche des outils pour l'analyse *in vitro* de variants du promoteur *CFTR*, ce qui sera exposé dans la deuxième partie des résultats de ce mémoire.

3. Les anomalies moléculaires de CFTR

Les variations de *CFTR* peuvent être répertoriées selon deux classifications : la plus récente, particulièrement pertinente en termes de conseil génétique, est basée sur la corrélation génotype-

phénotype, tandis que la plus ancienne se place au niveau de la biologie cellulaire et présente un intérêt pour l'approche thérapeutique. C'est cette classification, établie d'après les anomalies de la conductance aux ions chlorures, qui sera principalement développée ici.

3.1. Classification en fonction de la relation génotype-phénotype.

Les mutations sont regroupées en 4 classes, de A à D, en fonction de leur pathogénicité (Castellani, et al., 2008; Dequeker, et al., 2009). (Tableau 3)

Classification en fonction du caractère pathogène
<p>A. Mutations causant la mucoviscidose <i>ex : F508del (c.1521_1523delCTT ou p.Phe508del), G551D (c.1652G>A ou p.Gly551Asp)</i></p>
<p>B. Mutations associées à une pathologie CFTR <i>ex : D1152H (c.3454G>C ou p.Asp1152His), (TG)12(T)5 (c.1210-34TG[12]t[5])</i></p>
<p>C. Mutations sans conséquence clinique <i>ex : M470V (c.1408A>G ou p.Met470Val), F508C (c.1523T>G ou p.Phe508Cys)</i></p>
<p>D. Mutations de conséquence clinique incertaine ou non prouvée. <i>ex : G622D (c.1865G>A ou p.Gly622Asp), 3601-17T>C (c.3469-17T>C)</i></p>

Tableau 3. Les 4 classes de mutations selon leur signification clinique, d'après (Dequeker, et al., 2009). Les exemples sont donnés en nomenclature traditionnelle, la nomenclature HGVS est indiquée entre parenthèses.

Cette classification est particulièrement utile en termes de conseil génétique : seules les mutations causant la mucoviscidose sont à considérer pour les études familiales et le diagnostic prénatal. Il peut cependant y avoir un recouvrement entre les groupes A et B, puisque certaines mutations peuvent être détectées chez des patients atteints de mucoviscidose avec fonction pancréatique conservée ou chez des patients CFTR-RD. Ces mutations sont dites « de large spectre », comme c'est le cas par exemple pour la mutation D1152H qui, en association en *trans* avec une mutation sévère comme F508del, peut être retrouvée dans des formes plutôt modérées de mucoviscidose ou des infertilités par ABCD isolées. Dans de tels cas, le caractère modéré de la mutation doit être considéré pour le conseil génétique. D'autres mutations peuvent appartenir soit au groupe B soit au groupe C, comme par exemple la mutation S1235R (c.3705T>G, p.Ser1235Arg).

3.2. Classification en fonction de l'origine de l'anomalie de conductance aux ions chlorure

Le type de mutation génétique n'étant pas forcément prédictif quant aux conséquences sur la protéine CFTR et sa fonction, les différents mutants ont été regroupés en 4 classes fonctionnelles (numérotées de I à IV), selon les propriétés du produit final par rapport à la fonction canal Cl⁻ (Figure 13) (Welsh and Smith, 1993). A partir de la classe I, 2 autres classes ont été proposées plus tard, afin de disséquer les défauts biochimiques associés (Wilschanski 1995, Haardt 1999). Les mutations les plus sévères sont comprises dans les classes I, II et III. A l'intérieur d'une même classe, les mutants peuvent être corrigés par la même stratégie de restauration –une approche appelée « thérapie mutation-spécifique » (Kerem, 2005; Rowntree and Harris, 2003).

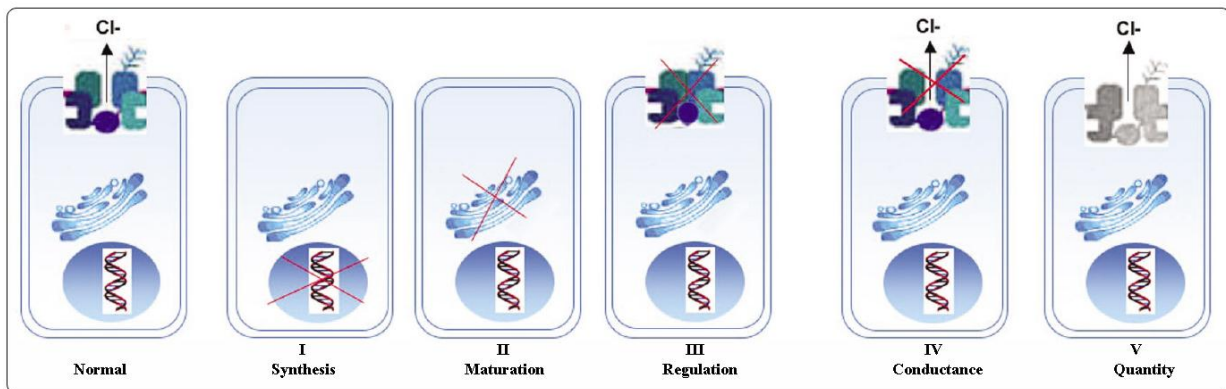


Figure 13. Les différentes classes fonctionnelles de mutations de CFTR, adapté de Welsh and Smith (1993) et modifié par Claustres (RBM online, 2005)

Classe I : Mutations altérant la production de la protéine.

Ces mutations résultent en une absence totale ou partielle de la protéine. Cette classe inclue les mutations non-sens, comme la mutation G542X (c.1624G>T) qui est la 2^{ème} mutation la plus fréquente en France (3,1% des allèles), et les mutations produisant un codon-stop prématuré, soit par des anomalies d'épissage (1717-1G>A ou c.1585-1G>A), soit par des mutations décalant la phase de lecture (1078delT ou c.948delT). Dans certains cas, l'ARNm muté, instable, est rapidement dégradé par un mécanisme de NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*) et ne produit pas de protéine (Hentze and Kulozik, 1999), tandis que dans d'autres cas, c'est la protéine anormale qui est instable et rapidement dégradée (Hentze and Kulozik, 1999; Rowntree and Harris, 2003). Certains

antibiotiques de la famille des aminoglycosides, comme la gentamycine, en plus de leur activité antimicrobienne, sont capable de réaliser une translecture des codons prématurés de terminaison, et de produire une protéine avec une fonction résiduelle (Du, et al., 2002). Le PTC124 (Ataluren) est actuellement en essai clinique international de phase 3, il remplace la gentamycine en permettant également une translecture mais en évitant la néphro- et oto-toxicité lié à l'usage de cet antibiotique (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00803205>) (Du, et al., 2008; Sermet-Gaudelus, et al., 2010a).

Classe II : Mutations perturbant le processus de maturation de la protéine.

Les mutations de classe II résultent de mutations faux-sens ou de micro-délétions en phase, ne modifiant ni le cadre de lecture ni la liaison de l'ATP (Qu, et al., 1997). Elles perturbent le repliement post-traductionnel de la protéine CFTR, qui, au lieu de poursuivre sa maturation vers l'appareil de Golgi puis la membrane plasmique, s'accumule dans le réticulum endoplasmique avant d'être dégradée par la voie ubiquitine-protéasome. Il en résulte une diminution, voire une absence, de la protéine à la membrane apicale. Dans cette classe, on retrouve la plus fréquente des mutations de CFTR, la mutation F508del (p.Phe508del, c.1521_1523delCTT), qui représente 90% des allèles mutés dans la population caucasienne, et qui correspond à la délétion d'une phénylalanine dans le domaine NBD1. Les mutations de classe II sont connues pour induire un stress du réticulum endoplasmique participant à un état proinflammatoire d'origine endogène.

L'approche thérapeutique pour les mutants de maturation est d'améliorer le trafic de CFTR vers la membrane, par des molécules appelées « correcteurs ». Par exemple, le Vertex 809 (VX-809) est en cours d'essai clinique de phase 2, en association avec VX-770.

Classe III : Mutations perturbant la régulation du canal Cl.

Ces mutations permettent la production d'une protéine localisée à la membrane apicale des cellules mais présentant une altération de la régulation de l'ouverture du canal. Les mutants de classe III peuvent affecter la phosphorylation du domaine R ou la liaison et/ou l'hydrolyse de l'ATP au niveau des domaines NBD. Parmi elles, on retrouve les mutations G551D (c.1652G>A) et G1349D (c.4046G>A) qui conservent très peu de fonction résiduelle. L'approche thérapeutique pour ces mutants est d'améliorer l'activité de CFTR par des molécules appelées « potentiateurs ». Ainsi, la molécule Vertex 770 (VX-770, Ivacaftor) est en cours d'essai clinique de phase 3 et donne des résultats très encourageants exposés lors du dernier congrès européen à Hamburg (Juin 2011). Non seulement la fonction pulmonaire s'améliore mais les patients traités sont également moins

susceptibles de présenter une exacerbation pulmonaire (55%) et présentent un gain de poids similaire à ce qui est généralement observé après un gavage gastrique. Ces résultats sont donc beaucoup plus impressionnants qu'avec aucun autre médicament (antibiotique ou solution hypersaline) jamais testé dans le contexte de la mucoviscidose (Opar, 2011).

Classe IV : Mutations altérant la conduction du canal Cl⁻.

Les mutations de cette classe perturbent la sélectivité ionique et la durée d'ouverture du canal CFTR. Essentiellement situées dans les domaines transmembranaires, il s'agit de mutations faux-sens qui produisent une protéine correctement positionnée et ayant une activité canal Cl⁻-AMPC dépendante. Les caractéristiques de ces canaux sont cependant différentes de celles du canal CFTR sauvage, avec une diminution du flux d'ions et une sélectivité modifiée. Il s'agit en général de mutations à effet modéré, dont la plus fréquente est la mutation R117H (c.350G>A), qui conserve une activité de canal chlorure résiduelle.

D'autres classes de mutations ont été rajoutées à la classification de Welsh et Smith afin de différencier certains défauts biochimiques. Les mutations de classe I ont ainsi été subdivisées en deux sous-classes.

La **classe V** comprend les mutations qui altèrent la stabilité de l'ARNm *CFTR* en diminuant partiellement la synthèse ou en altérant le trafic de la protéine (Kerem and Kerem, 1995). Les protéines mutées de cette classe résultent d'un épissage aberrant (3849 + 10kb C>T (c.3717+12191C>T), variant d'épissage T5 de l'intron 8 (c.1210-12T[5])), de mutations du promoteur diminuant le taux de transcription, de mutations faux-sens altérant le routage (A455E (c.1364C>A)) ou encore de mutations non-sens (codon stop) entraînant une diminution de l'ARNm full-length par épissage alternatif de l'exon la contenant (Hinzpeter, et al., 2010; Hull, et al., 1993). Ceci entraîne une réduction de l'expression membranaire de la protéine CFTR normalement fonctionnelle.

La **classe VI** regroupe les mutations qui altèrent la stabilité de la protéine mature et diminuent les propriétés de régulation des autres canaux, comme certaines mutations situées dans le domaine C-terminal de CFTR (Haardt, et al., 1999). Cette région n'intervient ni dans la conductance, ni dans la régulation, mais peut interagir avec des protéines stabilisant CFTR à la membrane plasmique comme

la protéine d'échafaudage NHERF (*Na⁺/H⁺ Exchanger Regulatory Factor*) (Haardt, et al., 1999) Il s'agit en général de mutations à effet modéré.

Cette classification fonctionnelle ne prend en compte que les anomalies de CFTR par rapport au transport des ions chlorures, sans tenir compte des nombreuses autres fonctions de cette protéine : en effet, la perte de l'activité de transport des ions Cl⁻ du canal CFTR muté n'explique pas à elle seule l'importance des dysfonctionnements observés dans les épithéliums de phénotypes CF.

Le canal CFTR est également perméable à d'autres molécules, et notamment aux ions bicarbonate HCO₃⁻ (Choi, et al., 2001). Ceci se manifeste par un défaut de sécrétion pancréatique de HCO₃⁻ chez les patients, ainsi qu'une diminution du pH dans les épithélia des autres tissus, contribuant ainsi à l'hyperviscosité des mucines (De Lisle, 2009; Riordan, 2008). CFTR est également perméable au tripeptide glutathion (GSH), l'antioxydant extracellulaire le plus abondant dans les poumons et dont la concentration dans les épithéliums de phénotype CF est fortement réduite (Linsdell and Hanrahan, 1998).

De plus, CFTR agit comme un régulateur d'autres canaux ioniques (Figure 14) : il permet l'activation par phosphorylation des canaux Cl⁻ rectifiant sortant ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*) (Gabriel, et al., 1993; Schwiebert, et al., 1998), il module la sensibilité des canaux potassiques ROMK (*Renal Outer Medullary K⁺ Channel*) sensibles à l'ATP présents à la membrane basolatérale des cellules épithéliales respiratoires vis-à-vis des sulfonylurées et de l'ATP (Loussouarn, et al., 1996; McNicholas, et al., 1997; Yoo, et al., 2004). Enfin, CFTR régule négativement le canal sodique épithélial amiloride sensible ENaC (*Epithelial Sodium (Na⁺) Channel*), le défaut de cette inhibition rendant l'absorption sodique plus élevée chez les patients atteints de mucoviscidose (Boucher, et al., 1986) (Kunzelmann, et al., 1997) (Ji, et al., 2000) (Suaud, et al., 2007).

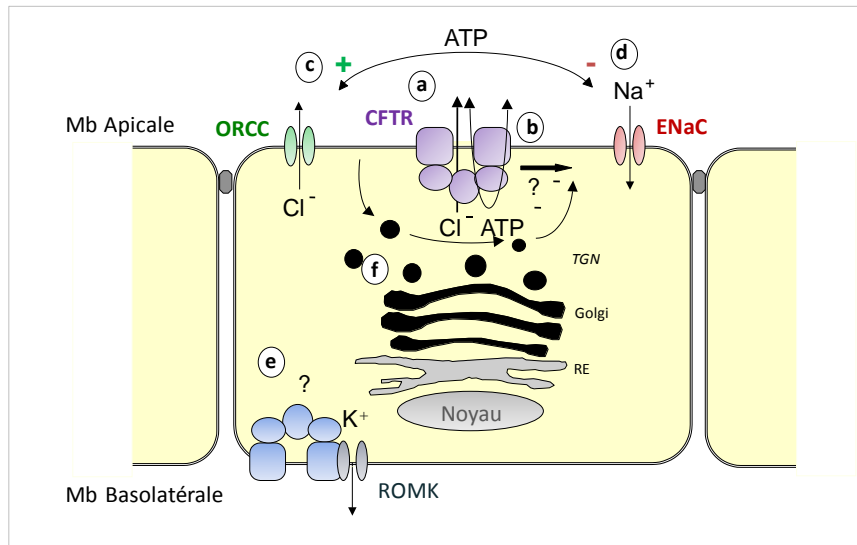


Figure 14. Schéma récapitulatif des différentes fonctions de CFTR dans la cellule épithéliale. CFTR est une protéine multifonctionnelle, avec (a) une activité de canal à ions chlorures, (b) une fonction d'aide à l'efflux d'ATP, Cette protéine participe également à l'homéostasie ionique en régulant d'autres canaux : (c) régulation positive de l'ORCC, (d) régulation négative de l'ENaC, (e) et module ROMK. (f) CFTR participe aussi à la régulation de l'acidification du compartiment intracellulaire et du *processing* des protéines

3.3. Influence des gènes modificateurs

Si la sévérité des atteintes génitales et pancréatiques semble bien corrélée aux mutations du gène *CFTR* identifiées chez les patients, l'atteinte respiratoire apparaît plus variable, et semble être sous l'influence d'autres facteurs. Erreur ! Source du renvoi introuvable. (Cutting, 2005). Ces données suggèrent fortement l'intervention de variants génétiques, en dehors du locus *CFTR*, dans l'expression phénotypique de la maladie et orientent vers la recherche de gènes modificateurs (Figure 15).

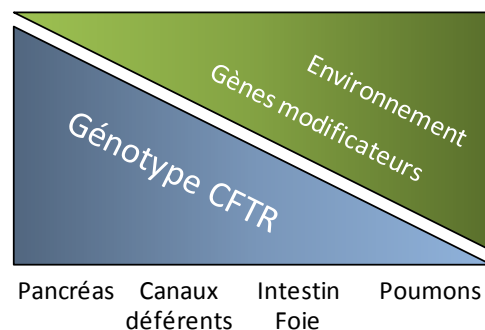


Figure 15. Représentation schématique de la contribution du génotype CFTR à la variabilité de la maladie dans les différents organes affectés par la mucoviscidose (d'après Cutting et al., 2005)

Ces vingt dernières années, plusieurs études ont été menées afin d'identifier à l'aide de grandes cohortes de patients homozygotes pour la mutation F508del des polymorphismes en dehors du gène *CFTR* associés à la sévérité de la maladie (Tableau 4) (pour revue (Cutting, 2010)). Parmi eux, certains variants moléculaires dans les gènes codant le TNF α , le TGF β , l'IL-8 pourraient être impliqués dans la sévérité de l'atteinte pulmonaire (Corvol, et al., 2011; Drumm, et al., 2005; Witt, 2011). De la même manière un allèle du gène *SERPINA1*, codant l'alpha-1 antitrypsine est associé à la pathologie hépatique sévère observée chez 3 à 5% des patients CF, caractérisée par une hypertension portale et une cirrhose (Bartlett, et al., 2009; de Haan, 2010). Iléus méconial (Dorfman, et al., 2009).

Gène	Fonction pulmonaire (FEV ₁)	Colonisation/infection à <i>P. aeruginosa</i>	Obstruction intestinale	Diabète	Pathologie hépatique
<i>ADIPOR2</i>			Effet possible		
<i>TNFA</i>	Effet possible				
<i>EDNRA</i>	Effet probable				
<i>IFRD1</i>	Effet possible				
<i>IL8</i>	Effet possible				
<i>MBL2</i>	Effet probable	Effet probable			
<i>MSRA</i>			Effet probable		Effet possible
<i>SERPINA1</i>	Pas d'effet			Effet probable	
<i>TCF7L2</i>					
<i>TGFB1</i>	Effet probable	Pas d'effet			

Tableau 4. Principaux gènes modificateurs dans la mucoviscidose, modifié de (Cutting, 2010). Effet probable : association observée dans au moins 3 populations indépendantes avec plus de 1000 participants. Effet possible : association observée dans au moins 2 populations indépendantes.

De telles études nécessitent de larges cohortes de patients extrêmement bien documentées au plan clinique. L'hétérogénéité des populations testées pourrait expliquer les différences observées dans les gènes modificateurs identifiés selon les études. Leur éventuel caractère délétère n'est pas du à des mutations de ces gènes modificateurs, mais des polymorphismes entraînant probablement de subtiles variations des protéines résultantes sont probablement à l'origine de faibles variations de l'homéostasie. L'ensemble de variations fines de cette homéostasie, résultant à la fois de facteurs environnementaux et de gènes modificateurs, peut avoir un effet protecteur ou au contraire péjoratif sur l'atteinte clinique, selon les organes.

La mucoviscidose est une pathologie due à des anomalies de la protéine CFTR, qualitatives ou quantitatives. L'expression physiologique de cette protéine est très finement régulée au niveau spatio-temporel, grâce à des éléments *cis*-régulateurs dont la connaissance est encore largement incomplète. L'expression différentielle de *CFTR* entre le poumon fœtal et le poumon adulte suggère que les transcrits ou la protéine CFTR elle-même pourraient jouer un rôle dans le développement des voies respiratoires. Au niveau post-natal, les mutations délétères résultent en une diminution ou une dérégulation de l'activité de CFTR. La diminution de l'activité de canal anionique et le défaut de régulation des autres canaux ioniques au niveau des membranes apicales des cellules causent un dérèglement de l'homéostasie ionique dans la lumière des épithéliums sécrétoires. Au niveau pulmonaire, le défaut de sécrétion des ions chlorures et l'absorption excessive d'ions sodium et d'eau sont à l'origine d'une déshydratation et d'une augmentation de la concentration en électrolytes du liquide de surface des voies aériennes (*Airway Surface Liquid* ou ASL). Ces phénomènes sont à l'origine d'une diminution d'épaisseur de la couche de liquide périciliaire, qui permet normalement l'élimination du mucus par battement des cils vibratiles des cellules épithéliales, et d'une augmentation de la viscosité du mucus. La diminution de la clairance mucociliaire résultante entraîne une rétention des bactéries dans les voies aériennes, et favorise l'infection. Les cellules immunitaires recrutées, en lysant les bactéries et en libérant notamment de l'ADN, contribuent à l'augmentation de la viscosité du mucus. Les voies pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose sont donc caractérisées par un syndrome obstructif accompagné d'infections récurrentes et d'une inflammation chronique. Cette atteinte respiratoire constitue le premier facteur de morbidité dans la mucoviscidose.

Chapitre 2

L'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose

L'atteinte pulmonaire est la première cause de morbidité et de mortalité dans la mucoviscidose. Les marqueurs de la pathologie pulmonaire sont la colonisation et l'infection bactérienne des voies aériennes, mais aussi une inflammation exagérée, persistante et chronique. La colonisation de l'appareil respiratoire par les bactéries a longtemps été considérée comme l'évènement initiateur déterminant de l'inflammation pulmonaire exacerbée de la mucoviscidose. Cependant, certains éléments sont en faveur d'un état pro-inflammatoire intrinsèque dans les voies respiratoires des malades, aggravé par les infections.

I. L'inflammation innée, un mécanisme de défense normal

Le phénomène d'inflammation est un processus physiologique de réaction de l'organisme face à une agression, ayant pour but d'éliminer l'agent pathogène et/ou de réparer la lésion tissulaire. Ce processus fait intervenir de nombreux acteurs, tels que les cellules du système immunitaire, des molécules plasmatiques, des modifications de la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques pro- et anti-inflammatoires pouvant modifier ou entretenir la réponse inflammatoire. Dans le système respiratoire normal, les voies aériennes supérieures sont le siège de colonisations par de nombreux micro-organismes (dont la flore normale) tandis que les voies aériennes inférieures sont maintenues stériles par les défenses naturelles de l'hôte. Ces défenses sont constituées par des barrières physiques (mucus, barrière épithéliale) et des agents de l'immunité (défensines, lysozyme, oxyde nitrique NO, cytokines, IgA, cellules phagocytaires, polynucléaires).

Lorsque cette barrière est franchie, les antigènes des micro-organismes peuvent activer des récepteurs de reconnaissance comme les TLRs (*Toll Like Receptor*), et initient ainsi une cascade de signalisation pouvant aboutir à l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1, STAT3 et la famille du facteur régulant la voie de l'interféron IRF (*Interferon Regulatory transcription Factor*) (Basu and Fenton, 2004). Ces facteurs de transcription activent alors l'expression de médiateurs pro-inflammatoires, parmi lesquels des cytokines/chemokines et des molécules d'adhésion, qui induisent l'infiltration de polynucléaires neutrophiles. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont des cellules phagocytaires permettant habituellement de contrôler l'infection, grâce à la libération d'un arsenal d'oxydases, de protéases (élastase, métalloprotéases) et de chemokines/cytokines. Ces médiateurs attirent sur le site lésé les monocytes/macrophages, qui libèrent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β (*Interleukine 1 β*), l'IL-6 (*Interleukine 6*) et le TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*). Ces trois cytokines induisent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules

endothéliales, permettant aux neutrophiles, aux monocytes et aux lymphocytes circulants d'adhérer à la paroi des vaisseaux sanguins et de migrer dans les tissus. Elles contribuent à la réponse inflammatoire locale en favorisant le recrutement des PNN et leur dégranulation. L'IL-1 β et le TNF- α agissent également sur les macrophages et les cellules endothéliales pour induire la production de chimiokines. L'une d'elles, l'interleukine 8 (IL-8) est alors largement produite par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires. L'IL-8 est l'agent chimiotactique le plus puissant au niveau pulmonaire pour attirer les PNN. Ces différents phénomènes participent normalement à l'élimination des agents infectieux et à la réparation tissulaire (Balamayooran, et al., 2009).

Néanmoins, lorsque l'inflammation est chronique, ce processus d'inflammation peut devenir délétère. En effet, la libération excessive par les cellules immunitaires, et notamment par les PNN, d'enzymes telles que les protéases (dont l'élastase), les oxydases, et d'espèces réactives de l'oxygène aboutissent à la lésion du tissu (Figure 16). Par ailleurs, les PNN libèrent également de l'ADN, qui augmente la viscosité du mucus, et participe donc à la diminution de la clairance mucociliaire et à l'installation des pathogènes (Chmiel and Davis, 2003; Doring, et al., 2010; Stockley, 1999).

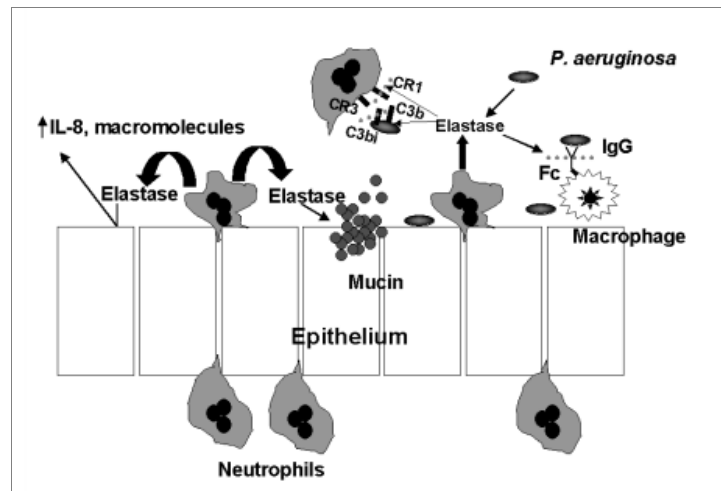


Figure 16. Les effets néfastes de l'élastase sur les mécanismes de défense de l'hôte et l'inflammation dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (Chmiel and Davis, 2003). Le taux d'élastase, majoritairement sécrétée par les polynucléaires neutrophiles (PNN), mais également par les bactéries, excède très largement la concentration en inhibiteurs d'élastase naturellement présents dans les voies respiratoires. Outre ses dommages tissulaires directs, l'élastase stimule la production de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-8 qui induit elle-même le recrutement de PNN supplémentaires. L'élastase diminue aussi la clairance mucociliaire par un effet direct sur les fonctions ciliaires et en stimulant la sécrétion de mucus. Enfin, elle inhibe la phagocytose en clivant les immunoglobulines (Fc) et les récepteurs du complément (CR)

1. La voie NF- κ B

Depuis son identification en tant que régulateur clé des gènes d'expression inductibles du système immunitaire en 1986 (Singh, et al., 1986), le rôle du facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor kappa B*) a été établi dans de nombreuses fonctions cellulaires essentielles, incluant l'immunité innée et adaptative, le développement embryonnaire et l'oncogenèse (pour revue (Basseres and Baldwin, 2006; Hayden and Ghosh, 2011)). Ce facteur dimérique régule la transcription de ses gènes cibles en se fixant sur la séquence consensus κ B décamérique 5'-GGGAATTTCC-3' dans leurs promoteurs.

1.1. Les protéines NF- κ B

Le terme NF- κ B est un terme générique désignant un homo- ou hétérodimère de protéines de la famille **Rel**, famille très conservée au cours de l'évolution. Chez les mammifères, cette famille comprend 5 protéines (p50, p52, p65 (ou RelA), c-Rel, et RelB) qui partagent en N-terminal le domaine d'homologie Rel caractéristique, d'environ 300 acides aminés (Figure 17). Ce domaine d'homologie ou RHD (*Rel Homology Domain*) est responsable de la dimérisation de ces protéines, de leur interaction avec leurs inhibiteurs naturels de la famille I κ B, et de leur liaison à l'ADN.

Les protéines **RelA** (p65, NF- κ B3), **Rel** (c-Rel) et **RelB** comprennent, en plus de leur domaine RHD, un ou plusieurs domaines d'activation transcriptionnelle TAD (*Transcription Activation Domain*) en C-terminal. Elles sont capables de former des homo- ou hétérodimères.

Les protéines **p50** (NF- κ B1) et **p52** (NF- κ B2) sont produites sous forme de précurseurs, p105 et p100 respectivement, qui contiennent dans leur domaine C-terminal 5 à 7 répétitions d'un motif ankyrine inhibiteur. Ces protéines actives sont produites soit par arrêt de la traduction, soit par protéolyse limitée. Les protéines p50 et p52 ne contiennent pas de domaine TAD d'activation transcriptionnelle et doivent former des dimères avec p65, Rel ou Rel-B pour avoir une activité facteur de transcription (Li and Stark, 2002).

L'expression des sous-unités p65 et p50 est ubiquitaire, alors que celle des autres protéines Rel est en général restreinte à des types cellulaires différenciés (Edwards, et al., 2009). Ainsi, la combinaison dimérique la plus fréquemment rencontrée, et qui est usuellement nommée NF- κ B, est la combinaison p65/p50. Cependant, la grande variété de combinaisons possibles des protéines Rel détermine la cellule/stimulus spécificité et intervient dans la régulation de la voie NF- κ B (pour revue (Chen, et al., 2000; Hayden and Ghosh, 2011; Hayden, et al., 2006)).

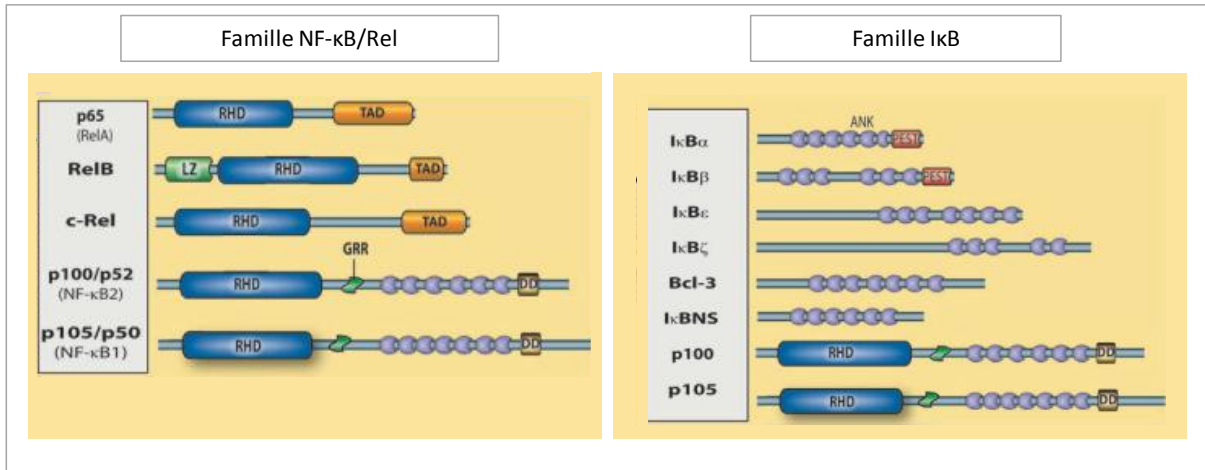


Figure 17. Les protéines de la famille NF-κB/Rel et de ses inhibiteurs naturels IκB chez les mammifères, d'après (Hayden et Ghosh, 2011). La famille NF-κB/Rel : Toutes contiennent un domaine RHD permettant la dimérisation et la liaison à l'ADN. p65, RelB et c-Rel sont directement actives et contiennent le domaine TAD de transactivation de la transcription, tandis que p52 et p50 sont synthétisées sous forme de précurseurs (p100 et p105) et ne sont activées qu'après clivage de leur partie C-terminale, contenant des motifs « ankyrine » répétés. La famille IκB : Les protéines IκB sont caractérisées par la présence de répétitions de motifs ankyrine (« *ankyrin repeats* ») essentiels à l'interaction avec les protéines Rel. Avant activation de p52 et p50 par clivage, leurs précurseurs respectifs p100 et p105 font partie de la famille IκB. RHD : Rel Homology Domain ; TAD : TransActivation Domain ; LZ : Leucine Zipper ; NBD : NEMO Binding Domain ; ANK : Ankyrin Repeat Domain ; GRR : Glycine Rich Region.

1.2. Localisation constitutive des protéines NF-κB

Dans la majorité des cellules, à l'état basal, les dimères NF-κB sont retenus dans le cytoplasme sous une forme inactive par interaction avec les molécules de la famille d'inhibiteurs IκB (Baeuerle and Baltimore, 1988) (Figure 17). La famille IκB comprend 7 membres, IκBα, IκBβ, BCL3, IκBε, IκBγ ainsi que les précurseurs p105 et p100, qui se lient spécifiquement aux domaines RHD des différents dimères de NF-κB (Hatada, et al., 1993). Par exemple, IκBα s'associe aux dimères p65/p50 and cRel/p50 et IκBβ au dimère p65/cRel (Kamata, et al., 2010).

Chacune de ces protéines IκB agit comme un inhibiteur de la voie de signalisation par liaison au dimère NF-κB, en masquant la séquence de localisation nucléaire NLS (*Nuclear Localization Signal*) de la sous-unité RelA (p65). Ainsi le complexe NF-κB est en majeure partie séquestré dans le cytoplasme (Jacobs and Harrison, 1998; Malek, et al., 1998; Yamamoto and Gaynor, 2004). Cependant, une faible proportion de trimères inactifs de NF-κB(p65/p50)/IκBα peut être retrouvée dans le noyau. En effet, les protéines IκBα ne masquent pas la séquence NLS de p50, et ce NLS couplé aux NES (*Nuclear Export Signal*) d'IκBα et de p65 entraîne une circulation constante du complexe IκBα/NF-κB entre le noyau et le cytoplasme. IκBβ quant à lui, sous sa forme phosphorylée basale, retient les complexes NF-κB dans le cytoplasme en masquant le NLS de la protéine p50 (Huang, et al., 2000).

Si les protéines de la famille IκB sont globalement dites inhibitrices, certaines peuvent néanmoins, après certaines modifications post-traductionnelles, réguler positivement les gènes cibles de leurs dimères : Bcl-3 et IκBβ peuvent ne pas empêcher la translocation nucléaire des dimères p50/p50 ou p52/p52 et p65/c-Rel respectivement, et en être des co-activateurs transcriptionnels (Bours, et al., 1993; Fujita, et al., 1993; Kamata, et al., 2010; Suyang, et al., 1996).

1.3. Activation de la voie NF-κB

La stimulation de l'inflammation de diverses origines entraîne la dégradation de l'inhibiteur IκB en quelques minutes, *via* l'activation par phosphorylation du complexe kinase IKK (IκB Kinases) par des MAPKKK (*Mitogen-Activated Protein 3 Kinases*) (pour revue (Karin and Ben-Neriah, 2000). Ce complexe IKK est constitué d'au moins 3 sous-unités : les unités catalytiques IKKα et IKKβ, à activité sérine/thréonine kinase, et la sous unité de régulation NEMO/IKKγ (Hatada, et al., 2000) (Figure 18).

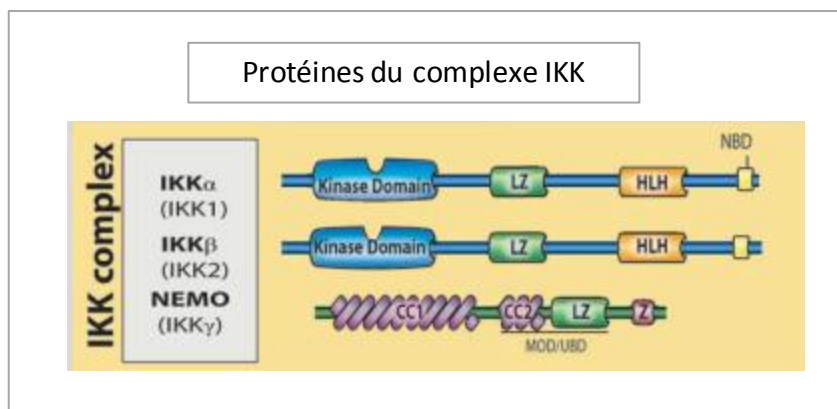


Figure 18. Représentation schématique des protéines du complexe IKK (I Kappa B Kinase), d'après (Hayden et Ghosh, 2011). Dans la voie classique, le complexe IKK mis en jeu est un trimère composé des deux kinases IKKα, IKKβ et de NEMO. Dans la voie alterne, seule IKKα, phosphorylée par la kinase NIK, est mise en jeu. LZ : Leucine Zipper, HLH : Helix-Loop-Helix ; NBD : NEMO Binding Domain; CC : coil-coil domain; Z : Zinc Finger

La phosphorylation de deux sérines dans le domaine kinase (IKKα : Ser176, Ser180 ; IKKβ : Ser177, Ser181) permet à phospho-IKK à son tour de phosphoryler les molécules IκB (IκBα : Ser32 et Ser36 ; IκBβ : Ser19, Ser23). Après phosphorylation par les IKKs, les protéines phospho-IκB sont reconnues et ubiquitinées par des E3 ubiquitine ligases membres de la famille SCF (Skp1-Culin-Roc1/Rbx1/Hrt-1-F-box) sur deux lysines adjacentes conservées (Lys21 et Lys22 pour IκBα) et dégradées par le protéasome 26S (Figure 19) (Cardozo and Pagano, 2004).

La phosphorylation d'IκB est *stimulus* spécifique. Ainsi, la phosphorylation d'IκBα est médiée par la plupart des activateurs de NF-κB, tandis qu'IκBβ est uniquement phosphorylée suite à des *stimuli*

comme le LPS et l'IL1- β . Ce niveau de contrôle a probablement un impact sur la spécificité et la cinétique de la réponse.

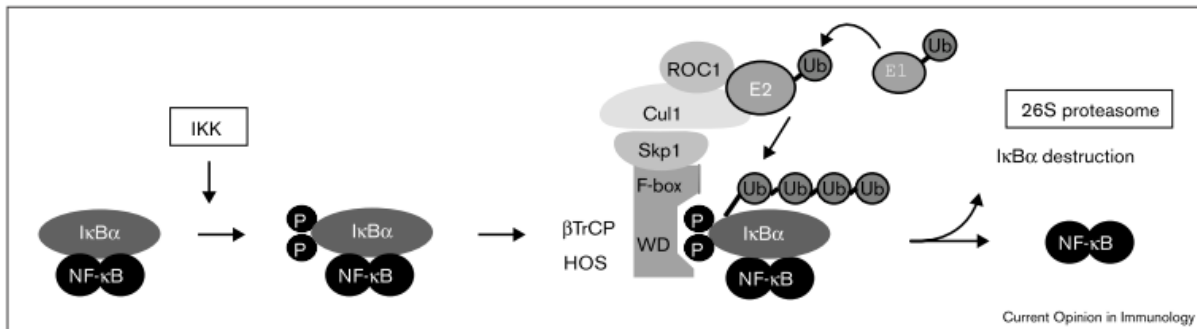


Figure 19. Modèle de dégradation de l'inhibiteur IκBα de la voie NF-κB. (d'après Hatada et al, 2000) Un *stimulus* induit l'activation cytoplasmique du complexe IKK qui phosphoryle IκBα, ce qui provoque sa reconnaissance par l'E3 ubiquitine ligase SCF^{β-TrCP} H, son ubiquitination et sa dégradation. L'exposition de la séquence NLS de p65 permet alors la translocation nucléaire du dimère NF-κB

Cette phosphorylation d'IκB et l'activation des protéines Rel peuvent se faire soit par la voie canonique ou classique, soit par la voie alternative (Figure 20). Ces deux voies se distinguent par les trimères d'IKK mis en jeu, et par conséquent par les dimères de NF-κB activés.

- **La voie classique (voie canonique) :**

Cette voie est induite par une multitude de médiateurs de la réponse innée et adaptative comme les cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β), les TLRs, les récepteurs d'antigènes (TCR, BCR), et les LPS (lipopolysaccharides). La phosphorylation critique de IκB est réalisée par le complexe IKK (IKK α /IKK β /NEMO), ce qui conduit à sa dégradation complète (Gilmore, 2006; Karin, 1999). Le complexe NF-κB (majoritairement p65/p50) est alors libéré de son inhibiteur IκB puis transloqué dans le noyau où il active ses gènes cibles. Un des gènes cibles de NF-κB est IκBα qui permet la terminaison du processus : IκBα néo-synthétisé migre dans le noyau et se lie à NF-κB, et ce complexe IκBα /NF-κB est redirigé vers le cytoplasme grâce au signal d'export nucléaire de IκBα (Hayden and Ghosh, 2011). Dans la voie classique, IKK β est nécessaire et suffisant pour phosphoryler IκBα (Ser32 et Ser36) et IκB β (Ser19, Ser23) (Hatada, et al., 2000).

- **la voie alternative (voie non canonique)**

La voie alternative, indépendante de NEMO, est importante notamment dans le développement et l'homéostasie des organes lymphoïdes secondaires et l'immunité adaptative. A la suite de *stimuli*

particuliers, comme le ligand de CD40, BAFF (*B-cell Activating Factor*), ou la lymphotoxine β , la protéine kinase NIK (*Nck Interacting Kinase*) est activée et phosphoryle l'homodimère IKK α . IKK α phosphoryle alors le précurseur p100 qui est ensuite ubiquitiné par le complexe SCF et partiellement dégradé par le protéasome libérant ainsi des complexes fonctionnels de type p52/RelB et p52/RelA. Enfin, ces complexes sont transloqués dans le noyau pour activer la transcription des gènes de la réponse κ B (Weil and Israel, 2006).

En dehors de ces deux voies, il peut exister d'autres systèmes activant NF- κ B et indépendants des IKK. Ces systèmes peuvent notamment faire intervenir la p38 MAP kinase (Ben-Neriah and Schmitz, 2004; Gilmore, 2006).

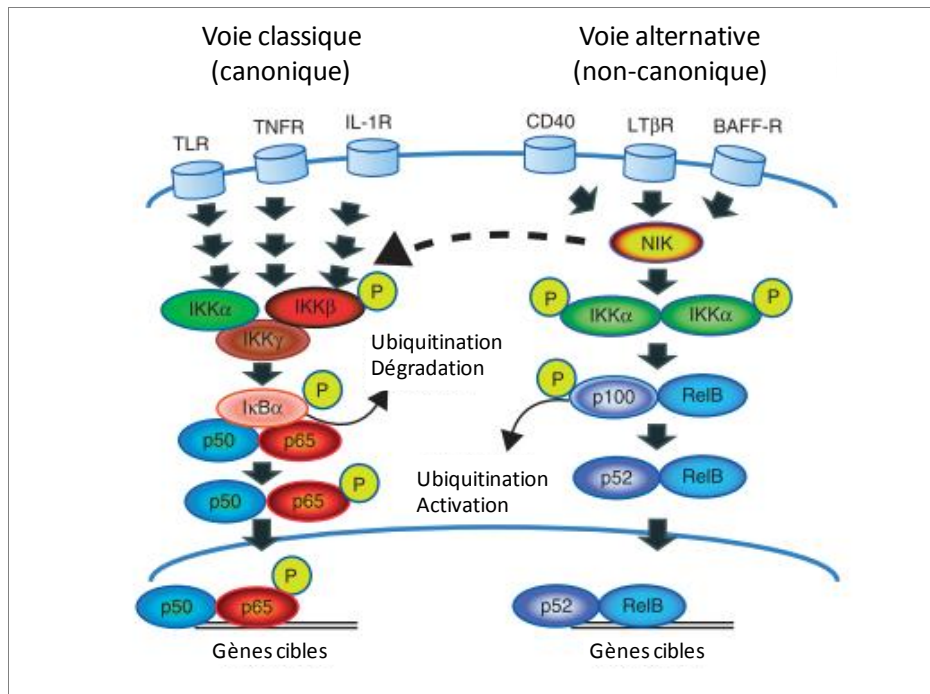


Figure 20. Les principales voies de signalisation de NF- κ B, d'après (Sakamoto and Maeda, 2010). La voie classique, activée par des signaux tels que le TNF- α ou l'IL-1, résulte en l'expression de nombreux gènes de l'inflammation, de l'immunité innée et des gènes anti-apoptotiques. Elle met principalement en jeu le complexe IKK (IKK α /IKK β /NEMO), I κ B α et le dimère NF- κ B p65(ReIA)/p50. La voie non canonique dépend des homodimères IKK α /IKK α et est activée par d'autres *stimuli* comme la lymphotoxine β . Cette voie joue un rôle important pour l'expression des gènes impliqués dans le développement et le maintien des organes lymphoïdes secondaires

1.4. Les gènes cibles de NF- κ B

La voie NF- κ B joue un rôle majeur et très complexe dans l'homéostasie cellulaire. Ceci peut être illustré par la longue liste pourtant non exhaustive de gènes régulés par le facteur de transcription,

donnée sur le site (<http://www.NF-kB.org>). Parmi eux, on peut citer des gènes codant de nombreuses cytokines (TNF α et β , IL-1, IL-2, IL-6...), des chemokines (IL-8, RANTES,...), des facteurs de croissance (VEGF, PDGF, PLGF,...), des molécules d'adhésion (ICAM-1), des enzymes impliquées dans la réponse au stress (NO synthase inductible, phospholipase A2, COX-2...), des facteurs de transcription et des modulateurs de transcription (HIF-1 α , A20, JunB, NF- κ B p100, NF- κ B p105, I κ B α , p53).

Par ailleurs, certains auteurs ont montré que des signaux pro-inflammatoires entraînent une augmentation de la protéine CFTR, et la capacité de liaison du facteur NF- κ B sur un site consensus du promoteur de *CFTR* en fait un gène cible (Brouillard, et al., 2001; Cafferata, et al., 2001).

2. La voie AP-1

Le facteur AP-1 (Activator Protein-1) est un des premiers facteurs de transcription à avoir été identifié chez les mammifères (Angel, et al., 1987; Lee, et al., 1987). Il est impliqué dans de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, la différenciation, la migration, la transformation cellulaire lors du développement aussi bien que dans les tissus adultes, et la régulation de l'inflammation (Eferl and Wagner, 2003). AP-1 régule la transcription basale et/ou inductible de gènes contenant des sites consensus (5'-TGAG/CTCA-3') appelés TREs (TPA (12-O-tetradecanoylphorbol) Response Element) ou éléments répondant au PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (Angel, et al., 1987; Angel and Karin, 1991).

2.1. Les protéines AP-1

AP-1 est un facteur de transcription dimérique. Ses sous-unités sont des protéines avec un haut degré d'homologie, appartenant aux familles **Jun** (Jun ou c-Jun, JunB et JunD) et **Fos** (c-Fos ou Fos, FosB, Fra-1 et Fra-2) (Figure 21). A ces protéines, on peut ajouter quelques membres des sous-familles Activating Transcription Factors ATF (ATF α , ATF-2 et ATF-3), Jun-Dimerizing Partner JDP (JDP-1 et JDP-2), qui partagent des similitudes structurales avec les protéines Fos et Jun, et qui, sous forme d'hétérodimères avec les protéines AP-1 (majoritairement les protéines Jun), peuvent lier les séquences TRE-like (Hess, et al., 2004).

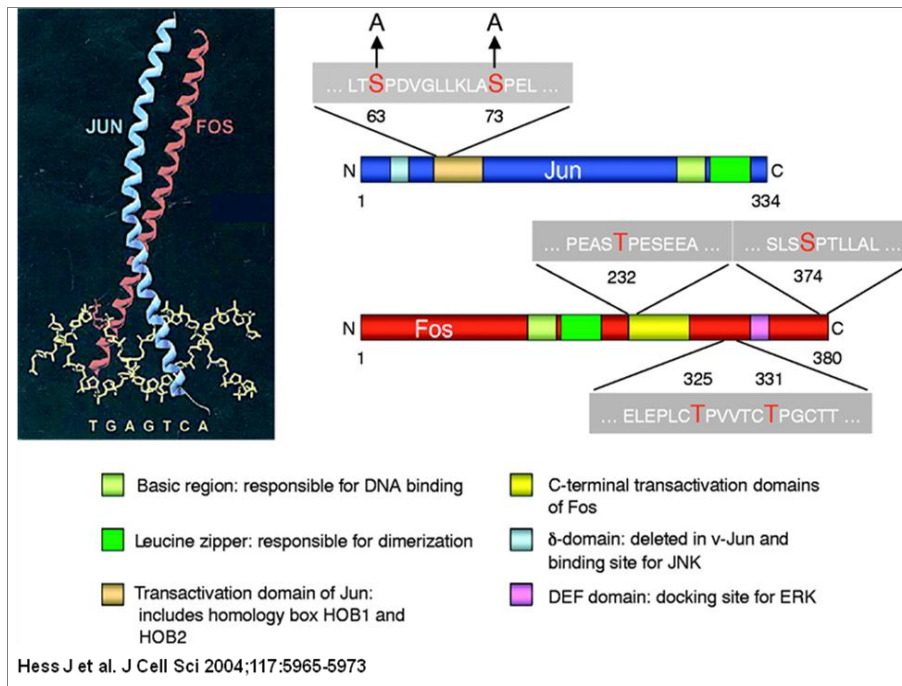


Figure 21. Représentation de l'hétérodimère AP-1 Fos/Jun, d'après (Hess, et al., 2004). Les bZIP domaines de Jun et Fos forment une structure capable de lier le site palindromique AP-1 (TGAGTCA). Jun et Fos possèdent plusieurs domaines, parmi lesquels le domaine bZIP, le domaine de transactivation, et des sites d'interaction avec différentes kinases comme JNK et ERK. JNK régule spécifiquement l'activation de Jun par phosphorylation des sérines S63 et S73. ERK phosphoryle Fos sur les thréonines T325 et T331 et la sérine S374. De plus, Fos peut être phosphorylée en T232 par une Fos-related Kinase.

Toutes ces protéines contiennent un domaine bZIP (fermeture éclair à Leucines et zone riche en résidus basiques) responsable de la dimérisation et de la liaison à l'ADN. La stabilité et la spécificité des homo- et hétérodimères dépend de la composition du motif « *leucin zipper* ». Ainsi, les protéines Jun peuvent former des homo ou hétérodimères, tandis que les protéines Fos ne créent que des hétérodimères. Les hétérodimères Fos/Jun sont beaucoup plus stables que les homodimères Jun/Jun (Hess, et al., 2004; van Dam and Castellazzi, 2001). Les protéines Jun et Fos ont des potentiels de transactivation assez différents. Alors que Jun, Fos et FosB sont considérés comme des activateurs forts, JunB, JunD, Fra-1 et Fra-2 ont seulement un faible potentiel de transactivation. Dans certaines circonstances, ces derniers peuvent même agir comme des répresseurs de l'activité AP-1 par compétition de la liaison à l'ADN ou en formant des hétérodimères « inactifs » avec Jun, Fos ou FosB (Hess, et al., 2004).

Par ailleurs, Jun peut aussi former des dimères avec des protéines bZIP n'appartenant pas à la famille AP-1, dont quelques membres de la famille CREB/ATF et le facteur de transcription oncogénique Maf (*Musculoaponeurotic Fibrosarcoma*). Les dimères peuvent se lier sur l'ADN à d'autres séquences consensus que les éléments TREs, comme par exemple la séquence consensus

des éléments de réponse à l'AMP cyclique CRE des protéines CREB/ATF. (Hai and Curran, 1991; Kataoka, et al., 1994).

Chacune des sous-unité AP-1 étant exprimée et régulée différemment, chaque type cellulaire contient un pool de dimères avec des fonctions différentes subtiles, permettant une régulation très fine de cette voie de signalisation (Angel, et al., 2001).

2.2. Activation de la voie AP-1 : la cascade des MAP kinases

Les *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs) composent une famille de sérines-thréonines kinases conservées au cours de l'évolution. Elles font partie d'un système de phosphorylation en cascade, composé de trois activités kinases séquentielles : dans le cytoplasme, sous certains *stimuli*, les MAPK kinase kinases (MAPKKK ou MKKK) phosphorylent et activent des MAPK kinases (MAPKK ou MKK) spécifiques, qui elles-mêmes phosphorylent les MAPKs.

Les quatre sous-familles bien caractérisées de MAPKs incluent : les kinases régulées par signal extra-cellulaire *Extracellular signal-Regulated Kinases* (ERK1/2), les *c-Jun N-terminal Kinases* (JNK1/2/3), p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) et ERK5 (Figure 22). Parmi elles, les JNK et p38 sont connues pour être activées par le stress cellulaire (Hess, et al., 2004; Junttila, et al., 2008).

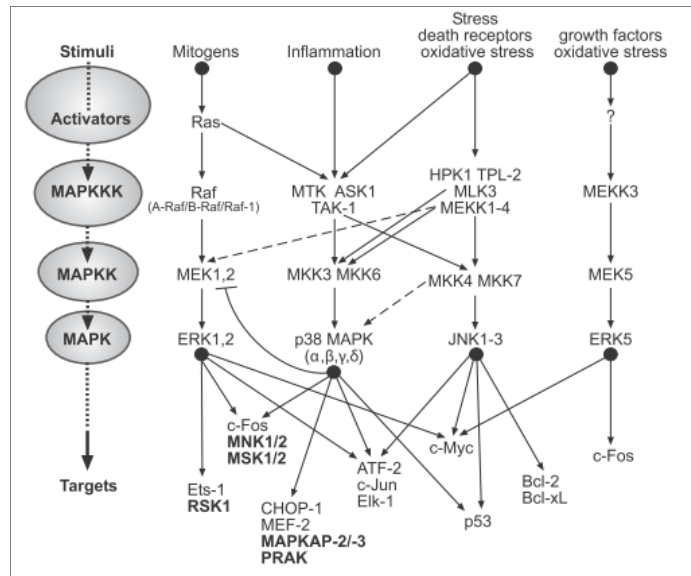


Figure 22. Les connexions de la voie de signalisation des MAPKs, d'après (Junttila, et al., 2008)

La cascade de signalisation des MAP kinases est organisée en modules. L'activation de kinases en amont par des récepteurs de surface entraîne l'activation séquentielle d'un module spécifique (MAPKKK/MAPKK/MAPK). Ici sont présentés les composants majeurs de la voie des MAPK, avec des exemples de protéines cibles. Les pointillés indiquent des connexions entre les modules MAPK possibles dans certains contextes.

Lors d'un *stimulus* approprié, incluant des cytokines (IL-1 β , TNF α), des facteurs de croissance, des signaux de stress et des infections, ou des *stimuli* oncogéniques, les MAPKs transloquent dans le noyau, où elles phosphorylent les sous-unités AP-1, majoritairement c-Jun et c-Fos, dans leur domaine de transactivation (motifs Ser/Pro) permettant la dimérisation du facteur et l'activation transcriptionnelle des gènes cibles (Figure 23) (Hess, et al., 2004; Huang, et al., 2009; Junttila, et al., 2008; Turjanski, et al., 2007).

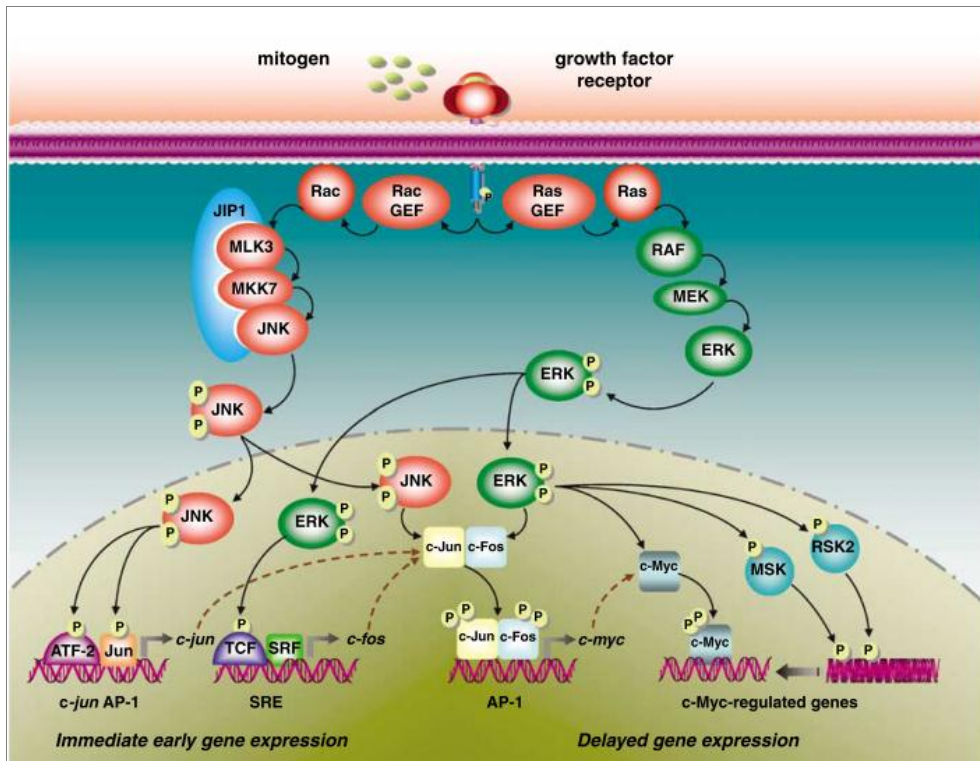


Figure 23. Activation de la voie AP-1, d'après (Turjanski, et al., 2007)

2.3. Régulation de la voie AP-1

La régulation de l'activité AP-1 est très complexe et peut se faire au niveau transcriptionnel, au niveau de la stabilité de l'ARNm, par des processus post-traductionnels, ou par des interactions spécifiques entre les protéines AP-1 et d'autres facteurs de transcriptions ou cofacteurs (Shaulian and Karin, 2002).

Les gènes codant c-Jun et c-Fos sont tous deux des gènes d'activation précoce immédiate. c-Jun est exprimé dans la plupart des cellules en faible quantité en absence de stimulation, tandis que c-Fos est très faiblement exprimé et très instable au niveau basal. Sous stimulation, c-Jun phosphorylé est activé, et dans une boucle d'auto-régulation, stimule sa propre transcription. L'activation des

ERKs, permet l'induction de l'expression de c-Fos qui en association avec le facteur de transcription MEF2 (*Myocyte-Enhancer Factor 2*) augmente l'expression de c-Jun, augmentant ainsi le taux d'AP-1 dans le noyau et l'activation des gènes cibles d'AP1 (Angel, et al., 1988; Lamph, et al., 1988; Shaulian and Karin, 2002).

Une régulation post-transcriptionnelle existe également. Certains *stimuli* tels que les UV permettent la stabilisation des ARNs messagers de c-Jun et de c-Fos, ce qui permet d'accroître l'activité AP-1 (Blattner, et al., 2000).

Au niveau post-traductionnel, un certain nombre de kinases/phosphatases régulent le potentiel de transactivation et la capacité de liaison à l'ADN d'AP-1. Ainsi, les phosphorylations de c-Jun (Ser63 et Ser73) et de c-Fos (Thr232) permettent d'augmenter leurs activités transcriptionnelles (Pulverer, et al., 1991; Smeal, et al., 1991) (pour revue (Hess, et al., 2004)).

D'autres processus dépendant des JNKs pourraient intervenir : ces kinases pourraient réguler l'activité histone acétylase intrinsèque de ATF2 (Kawasaki, et al., 2000) et pourrait réguler la dégradation d'AP-1 médiée par l'ubiquitine (Fuchs, et al., 1998).

Enfin, les interactions protéine/protéine peuvent aussi réguler l'activité AP-1. Par exemple, les récepteurs nucléaires NR, sont capables d'interagir directement avec les sous-unités de AP-1 et empêcher leur liaison aux promoteurs de leurs gènes cibles (Pascual and Glass, 2006).

2.4. Gènes cibles d'AP-1

Les sous-unités c-Jun et c-Fos ont été identifiées chez les mammifères par homologie avec les oncoprotéines virale v-Jun et v-Fos. Pour cette raison, ces deux sous-unités ont rapidement été reliées aux processus de tumorigenèse. AP-1 régule notamment de nombreux gènes de prolifération et de survie cellulaire (Cyclin D1, p21, p53, FasL, Bcl3,...) (Shaulian and Karin, 2002). Il est également impliqué dans la régulation transcriptionnelle de nombreux acteurs de l'inflammation, parmi lesquels des cytokines (IL-1, IL-6, TNF- α ,...) et chimiokines (IL-8, RANTES,...) (Kida, et al., 2005; Sebkova, et al., 2004; Yoshimura, et al., 2006), des métalloprotéases (Chinenov and Kerppola, 2001), des molécules d'adhésion (ICAM-1, intégrines,...) (Berrou and Bryckaert, 2001).

II. La réponse inflammatoire dans les poumons CF est anormalement régulée

1. L'infection pulmonaire dans la mucoviscidose

Le portage pulmonaire de germes particuliers est une des caractéristiques cliniques de la mucoviscidose, détectable dès quelques mois de vie (Dakin, et al., 2002; Rosenfeld, et al., 2001), et les exacerbations infectieuses et inflammatoires sont responsables de la destruction progressive du tissu pulmonaire. La colonisation est réalisée par des pathogènes spécifiques et de manière séquentielle selon l'âge du patient (Figure 24). Dans le courant de la première année, c'est surtout *Staphylococcus aureus* qui est observé, et en moindre proportion *Pseudomonas aeruginosa* et *Haemophilus influenzae*. *Pseudomonas aeruginosa*, présent chez 18,7 % des patients âgés de 0 à 4 ans, atteint sa fréquence la plus élevée (71,2 %) chez les malades de 30-34 ans. L'infection à *Pseudomonas aeruginosa*, qui est extrêmement difficile, voire impossible, à éradiquer, signe un tournant dans l'évolution de la maladie et est associé à une diminution des fonctions respiratoires (Hauser, et al., 2011). D'autres germes bactériens plus rares comme *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, ou des mycobactéries atypiques peuvent également être observées, ainsi que des germes fongiques comme certaines espèces d'*Aspergillus*. Ces infections, qui sont bénignes chez les individus normaux, sont sévères chez les patients atteints de mucoviscidose, qui présentent notamment une moins bonne clairance des germes que les sujets non atteints (Doring, et al., 2010).

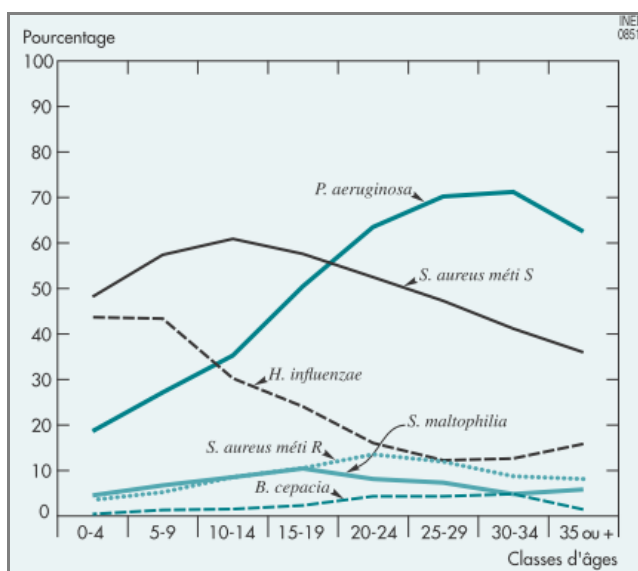


Figure 24. Prévalence des pathogènes les plus fréquents dans les voies respiratoires des patients CF en fonction de leur âge, d'après le bilan 2008 du Registre français de la mucoviscidose.

2. Les marqueurs de l'inflammation sont augmentés dans les poumons CF

Les poumons de patients CF apparaissent structurellement normaux *in utero* et durant les premiers mois de vie, à l'exception d'une dilatation modérée des glandes sous muqueuses de la trachée (Sturgess and Imrie, 1982). Néanmoins, en l'absence d'infection et de tout signe histologique d'inflammation, une augmentation de l'activité de RelA (NF- κ B) peut déjà être observée dans les cellules épithéliales des poumons de fœtus atteints de mucoviscidose (CF) (homozygote F508del) (Verhaeghe, et al., 2007a), tandis que des greffons de trachée fœtale humaine CF chez les souris SCID accumulent plus de polynucléaires neutrophiles que les contrôles non CF (Tirouvanziam, et al., 2002). Différentes études portant sur l'analyse du lavage broncho-alvéolaire (LBA) montrent chez des enfants CF asymptomatiques identifiés par le dépistage néonatal des signes d'une inflammation endo-bronchique avec une augmentation du nombre de polynucléaires neutrophiles (PNN) et de leur principal chemo-attractant, l'interleukine 8 (IL-8), parfois dès l'âge de 4 semaines, et parfois même sans infection détectable (Armstrong, et al., 2005; Khan, et al., 1995; Kirchner, et al., 1996). Cet état inflammatoire a également été décrit dans de nombreuses études chez les patients plus âgés, qui présentaient dans leur LBA une augmentation des PNN et des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et du TGF β (Dakin, et al., 2002; Harris, et al., 2009; Jacquot, et al., 2008; Muhlebach, et al., 2004). Les études sur explants ont montré que les cellules épithéliales des glandes sous muqueuses du tissu bronchique humain avant transplantation présentent une augmentation de l'ARNm et de la protéine IL-8 et une diminution de I κ B- α (Tabary, et al., 1999). Bien que cette inflammation puisse être en partie expliquée par l'infection chronique, l'inflammation chez les patients CF semble exagérée par rapport aux mécanismes de défense normaux de l'épithélium respiratoire. En effet, l'équipe de Muhlebach a rapporté que le LBA d'enfants CF infectés contient plus de PNN et d'IL-8 que les enfants infectés et non CF, par rapport au nombre de bactéries (Muhlebach, et al., 1999). Par ailleurs, quelques études ont mis en évidence une diminution de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans le LBA et les cellules bronchiques d'enfants CF, ce qui contribue à la production excessive de ces cytokines, prévenant la résolution de l'inflammation respiratoire (Bonfield, et al., 1999; Osika, et al., 1999).

L'ensemble de ces observations, c'est à dire l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires, est en faveur d'une activation anormale de la voie pro-inflammatoire NF- κ B et de la voie AP-1, conduisant à la sécrétion d'agents chimiotactiques, attirant les cellules immunitaires, principalement les polynucléaires neutrophiles, dans les voies respiratoires (Boncoeur, et al., 2008; Jacquot, et al., 2008).

3. L'inflammation chez les modèles animaux

L'origine de l'inflammation exacerbée est inconnue, et certaines équipes ont tenté d'explorer ce phénomène par le biais de modèles animaux, dès les années 1990. Ce paragraphe n'a pas l'ambition d'être exhaustif, mais vise à donner un aperçu des modèles disponibles.

A ce jour, il existe au moins 14 modèles de souris dont le gène *CFTR* est délété ou muté (pour revue (Fisher, et al., 2011)), et dont la sévérité phénotypique varie généralement selon le taux d'ARNm de *CFTR* (Davidson and Dorin, 2001; Fisher, et al., 2011). Si l'étude phénotypique n'a pas toujours été exhaustive, la plupart des modèles présente des anomalies digestives, hépatiques, pancréatiques, un retard de croissance, des troubles de la fertilité (Durie, et al., 2004; Freedman, et al., 2001), une diminution de la clairance mucociliaire (Zahm, et al., 1997) et une réponse inflammatoire exacerbée dans les voies aériennes (Legssyer, et al., 2006). Une augmentation des cellules inflammatoires a été observée dans la sous-muqueuse respiratoire des souris CF élevées en milieu stérile, en comparaison aux souris sauvages (Zahm, et al., 1997). Cependant, ces modèles ne développent pas spontanément de pathologie pulmonaire, contrairement au modèle porcin.

Les porcs *CFTR*^{-/-}, *CFTR*^{-/F508del} et *CFTR*^{F508del/F508del} présentent un iléus méconial sévère, léthal en absence de chirurgie, une atteinte pancréatique, et une ABCD (Ostedgaard, et al., 2011; Pierucci-Alves, et al., 2011; Stoltz, et al., 2010) mais ne présentent pas d'anomalie majeure pulmonaire, ni dans les glandes sous muqueuses, ni dans l'appareil reproducteur. L'examen histopathologique des poumons de porcs nouveaux-nés (6-12heures de vie) ne montre pas de signe inflammatoire à la naissance (Rogers, et al., 2008; Stoltz, et al., 2010; Welsh, et al., 2009). En revanche, l'élimination pulmonaire de bactéries est moins efficace que chez les contrôles, ce qui pourrait participer au développement d'anomalies pulmonaires histologiques observés chez les porcs plus âgés avec notamment des infiltrats neutrophiliques (Ostedgaard, et al., 2011; Stoltz, et al., 2010).

Chez le furet *CFTR*^{-/-}, on retrouve comme chez le porc, un retard de croissance et un iléus méconial, mais dont la pénétrance est variable (Sun, et al., 2010). Les furets présentent une atteinte pancréatique modérée, une vésicule biliaire normale, et une absence de canaux déférents. Dans l'étude de Sun *et al*, 75% des furets étudiés sont décédés peu après la naissance des suites de l'iléus méconial, et les autres sont décédés dans la première semaine de vie, probablement à cause d'un syndrome de malabsorption. Ces furets décédés après quelques jours de vie dans un état nutritionnel péjoratif présentaient une pneumonie broncho-pulmonaire lors de leur mort. L'atteinte digestive est très sévère chez les furets, et ne permet pas d'étudier l'atteinte pulmonaire dans de bonnes conditions. L'étude des furets KO avec une expression de *CFTR* préservée au niveau digestif

permettra peut-être d'apporter des réponses quand à la pathologie pulmonaire dans la mucoviscidose (Sun, et al., 2010).

Actuellement, aucun modèle animal ne reproduit exactement la même pathologie que celle observée chez l'homme. Bien que le porc ne montre pas d'inflammation pulmonaire à la naissance, il serait intéressant d'observer des animaux sur une longue durée.

4. L'inflammation dans les modèles cellulaires

De nombreux acteurs interviennent dans la régulation de l'inflammation, et notamment les cellules du système immunitaire (polynucléaires neutrophiles, monocytes-macrophages, lymphocytes). Nous nous intéresserons ici uniquement aux cellules épithéliales des voies aériennes, qui apparaissent de plus en plus comme des régulateurs de l'inflammation. En effet, elles répondent à de nombreux *stimuli* et génèrent un large panel de médiateurs contribuant au statut inflammatoire et à la régulation de composants structuraux des voies aériennes, incluant des peptides (endothélines), des lipides (prostaglandines), des espèces réactives de l'oxygène ou du nitrogène addition, cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α), chimiokines (IL-8, RANTES), facteurs de croissance (GM-CSF) (pour revue, (Proud and Leigh, 2011))

Il existe de nombreux modèles de cellules épithéliales des voies aériennes pour étudier la physiopathologie de la mucoviscidose, incluant des modèles de culture primaire ou des cultures de lignées, en culture submergée ou en interface air-liquide. Les résultats des nombreuses études menées durant ces 12 dernières années, de par la multiplicité des modèles, des conditions de culture, et des stimulations de l'inflammation possibles sont donc parfois difficiles à interpréter dans un contexte global. Néanmoins, il en ressort que dans certaines conditions, les cellules CF ont une signalisation inflammatoire exagérée par rapport aux cellules non CF (Carrabino, et al., 2006; Eidelman, et al., 2001; Muhlebach, et al., 2004; Tabary, et al., 2001; Tabary, et al., 1998; Wiszniewski, et al., 2006). Cette inflammation intrinsèque est caractérisée surtout par une augmentation des médiateurs inflammatoires, comme l'IL-8 ou l'IL-6 en absence (Eidelman, et al., 2001; Hallows, et al., 2006; Tabary, et al., 1998) ou en présence de stimulation (DiMango, et al., 1998; Kube, et al., 2001; Tabary, et al., 1999; Tabary, et al., 2003), et une diminution de l'IL-10 (Bonfield, et al., 1999). Cette augmentation des cytokines pro-inflammatoire serait due à une activation anormale des voies NF- κ b (Tabary, et al., 2001; Verhaeghe, et al., 2007b) et AP-1 (Boncoeur, et al., 2008; Verhaeghe, et al., 2007b).

III. Propriétés pro- ou anti-inflammatoires de CFTR

L'origine de l'inflammation exacerbée est très débattue. Certains pensent qu'elle est due aux infections chroniques elles-mêmes, d'autres mettent en cause la perte d'homéostasie des sécrétions respiratoires. Ces dernières années, l'implication directe de la protéine CFTR-wt ou mutée a été proposée (Jacquot, et al., 2008). C'est ce dernier point qui sera présenté ici.

1. Activité pro-inflammatoire de CFTR-F508del

La mutation la plus fréquente dans la mucoviscidose est la délétion du codon Phénylalanine F508 (F508del) dans le domaine de liaison à l'ATP NBD1. Différentes études ont montré que cette anomalie pouvait être à l'origine d'un état pro-inflammatoire. Ainsi, la surexpression de CFTR-F508del dans les cellules CHO entraîne une activation de la voie NF- κ B par rapport aux cellules surexprimant un autre mutant CFTR-G551D, ou CFTR-wt (Weber, et al., 2001). Un stress du réticulum endoplasmique pourrait participer à cette inflammation exacerbée (Knorre, et al., 2002; Rottner, et al., 2009).

1.1. Le réticulum endoplasmique, contrôleur de qualité

Le réticulum endoplasmique (RE) est le site de synthèse et de maturation des protéines destinées à la sécrétion ou à l'expression membranaire (membrane plasmique, appareil de Golgi, lysosomes). C'est un lieu de maturation (clivages, glycosylation, formation de ponts disulfures, repliement et assemblage), grâce à une machinerie intraluminale composée notamment de protéines chaperonnes telles que BiP (famille Hsp70), Grp94 (famille Hsp90), la calréticuline, la calnexine et la protéine Disulfide Isomérase (PDI) impliquées dans le système de contrôle qualité ERCQ (*Endoplasmic Reticulum Quality Control*) (Ellgaard and Helenius, 2003; Sitia and Braakman, 2003).

Les perturbations environnementales telles que l'accumulation de protéines mal repliées, les altérations de l'homéostasie calcique, l'inflammation ou l'hypoxie, conduisent à un dysfonctionnement du RE appelé stress réticulaire ou stress du RE. En condition de stress du RE, trois différentes voies sont activées afin de diminuer la synthèse de nouvelles protéines et d'augmenter la dégradation des protéines anormales : 1) la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) a pour but d'augmenter les capacités de repliement, de maturation, en entraînant la réduction de la synthèse protéique et la transcription de protéines chaperonnes (Zhang, et al., 2006) 2) la dégradation ERAD (*ER-Associated Degradation*) vise à éliminer les protéines mal repliées par la voie ubiquitine-

protéasome (Gelman, et al., 2002), et 3) si ces réponses sont insuffisantes, la réponse EOR (*ER-Overload Response*) participe à l'activation de l'expression des gènes de l'inflammation et du système immunitaire et aboutissant à l'apoptose (Lai, et al., 2007). Parmi les voies de signalisations activées, on retrouve la voie NF- κ B (Figure 25) (Kitamura, 2011).

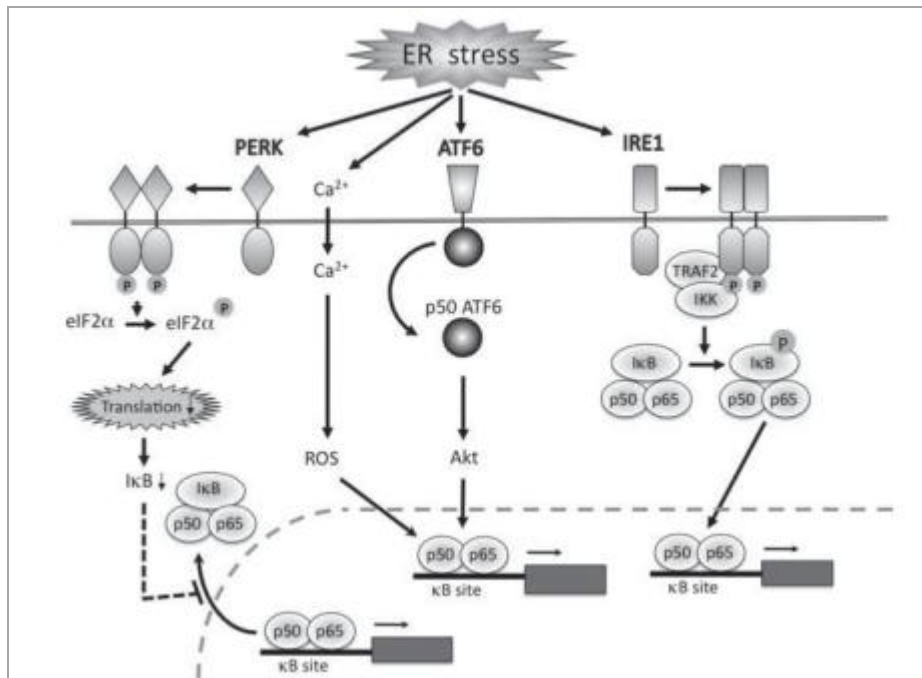


Figure 25. Activation de la voie NF- κ B par le stress du RE. Sous conditions de stress du RE, la voie NF- κ B est activée *via* les signalisations IKK, Akt et eIF2 α qui répriment la traduction d'I κ B α . D'après (Kitamura, 2011)

1.2. CFTR-F508del et stress du réticulum endoplasmique

La réponse UPR dans la mucoviscidose encore été peu étudiée. Quelques études montrent que l'UPR est stimulé dans les cellules exprimant CFTR-F508del à cause de la protéine mutée elle-même ou bien de facteurs exogènes (Bartoszewski, et al., 2008; Kerbirou, et al., 2007; Knorre, et al., 2002). Une étude sur des lignées primaires bronchiques épithéliales de patients homozygotes pour la mutation F508del a montré une augmentation de l'ARNm de certains marqueurs de la réponse UPR (Nanua, et al., 2006). De plus, l'étude de la surexpression de CFTR-F508del dans différentes lignées cellulaires a montré une augmentation de la réponse UPR par rapport à la surexpression de CFTR-wt (Bartoszewski, et al., 2008; Kerbirou, et al., 2007).

Le stress du RE induit par CFTR-F508del est d'autant plus important que, en plus de s'accumuler dans le RE, la protéine interagit avec des protéines chaperonnes calcium-dépendantes, modifiant l'homéostasie calcique et générant un stress supplémentaire (Antigny, et al., 2008; Rab, et al., 2007).

L'activation du système UPR (Kerbiriou, et al., 2007; Rab, et al., 2007) entraîne la diminution de l'expression globale de CFTR, et la dégradation de CFTR anormal par la voie du protéasome (Chen, et al., 2004; Cyr, 2005; Gelman, et al., 2002). Cette accumulation de CFTR mal replié dans le RE contribue à l'activation endogène de la voie de l'inflammation NF- κ B (Figure 26) (Rottner, et al., 2009; Weber, et al., 2001)

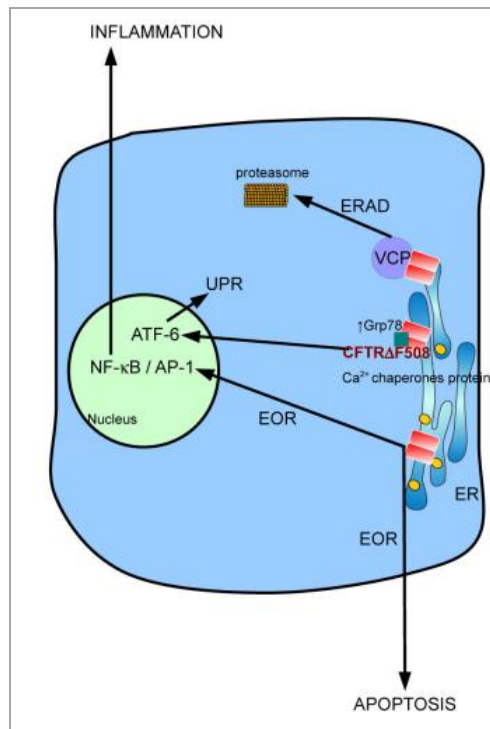


Figure 26. Implication de CFTR-F508del dans le stress du RE. La rétention de CFTR-F508del est associée à une augmentation de la concentration intraluminaire en Ca^{2+} et à une interaction avec des protéines chaperonnes. Ceci induit l'activation de l'ERAD afin de dégrader la protéine CFTR-F508del mal repliée. De plus, la voie UPR est activée *via* ATF-6. Si l'ERAD et l'UPR sont insuffisants à restaurer des paramètres cellulaires normaux, l'EOR est activé et induit l'apoptose. D'après (Rottner, et al., 2009)

2. Activité anti-inflammatoire de CFTR-wt

Depuis 2009, l'hypothèse que CFTR-wt possède une activité anti-inflammatoire intrinsèque a émergé et a été vérifiée par deux équipes (Hunter, et al., 2010; Vij, et al., 2009). Ainsi, l'inflammation exacerbée serait également due à une diminution de CFTR-wt à la membrane (Bodas and Vij, 2010).

Différentes études ont montré que le traitement par l'inhibiteur spécifique de CFTR, CFTRinh172, qui empêche l'ouverture du canal, oriente les cellules non CF vers un phénotype CF-like, avec une

activation de la voie NF- κ B et une augmentation de la sécrétion d'IL-8 (Hunter, et al., 2010; Perez, et al., 2007; Vij, et al., 2009). Ces résultats tendaient à montrer qu'une activité fonctionnelle du canal à la surface cellulaire était nécessaire pour contrôler l'inflammation. D'autres études ont révélé que certains correcteurs (misglustat, MBP07) n'augmentaient pas seulement l'expression de CFTR à la membrane, mais diminuaient aussi la réponse inflammatoire des cellules à *P. aeruginosa* (Dehecchi, et al., 2008). Enfin, il avait été montré que les cellules épithéliales primaires 16HBE transfectées avec un plasmide d'expression de CFTR présentaient une activation de la voie NF- κ B inférieure aux cellules transfectées avec un plasmide CFTR antisens non fonctionnel, avec une diminution du taux d'IL-8 sécrétée (Weber, et al., 2001).

L'équipe de P. Zeitlin a récemment montré que la surexpression de CFTR-wt dans des cellules HEK et CFBE entraînait une diminution d'activation de la voie NF- κ B et de la sécrétion d'IL-8 (Vij, et al., 2009). Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de A. Mehta dans les cellules épithéliales pulmonaires H441 et les cellules H57 dérivées des HeLas, avec un bémol cependant : en effet, dans les cellules H57 qui sont des cellules exprimant stablement un gène luciférase répondant à NF- κ B, l'inhibition de NF- κ B médiée par CFTR-wt était très variable en fonction de la confluence des cultures cellulaires, indiquant que cet effet anti-inflammatoire impliquerait des interactions entre les cellules (Hunter, et al., 2010). Des données récentes suggèrent que CFTR interagit avec TNFR1 (récepteur au TNF- α) dans des rafts lipidiques et module la sécrétion d'IL-8 (Dudez, et al., 2008). La présence de CFTR dans ces rafts pourrait expliquer son activité de modulateur de la voie NF- κ B.

Bien que l'origine de l'inflammation pulmonaire caractéristique de la mucoviscidose soit toujours un sujet de débat, elle est unanimement reconnue comme anormalement régulée, avec notamment une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et de la cellularité dans les sécrétions respiratoires des malades. L'inflammation, qui constitue normalement une des premières lignes de défense de l'organisme contre les agressions extérieures, déborde les systèmes de régulation physiologiques, entraînant la dégradation progressive du parenchyme pulmonaire. De nombreuses études mettent en cause les voies de signalisation NF- κ B et, plus récemment, AP-1. Réguler cette inflammation fait aujourd'hui partie des objectifs thérapeutiques, et de nombreuses molécules sont en essais cliniques (www.cff.org), la difficulté pour une administration à long terme étant d'obtenir une balance « effets bénéfiques/effets indésirables » favorable.

Chapitre 3

COMMD1 et CSN5, deux régulateurs transcriptionnels

I. **COMMD1**

La famille de protéines à domaine COMM ou **COMMD** est une famille hautement conservée au cours de l'évolution qui a été caractérisée en 2005 par une équipe des Pays-Bas, de par la similitude de ses autres membres avec la protéine déjà connue sous le nom de **MURR1** (Burstein, et al., 2005). Considérée depuis lors comme le chef de file de la famille, MURR1, désormais nommée **COMMD1**, a fait l'objet de nombreuses études. Identifiée initialement pour son rôle dans le métabolisme du cuivre (van De Sluis, et al., 2002), COMMD1 est en fait impliquée dans de nombreux processus physiologiques, tels que la régulation du transport sodique, de la signalisation HIF1 α et de la voie NF- κ B.

La protéine COMMD1 a été identifiée en 2003 au sein de notre laboratoire comme partenaire de la protéine CFTR à l'issue d'un criblage double hybride utilisant la boucle intracellulaire ICL3 comme appât, Cette observation a motivé l'étude du rôle cytoplasmique de cette protéine dans la physiopathologie de la mucoviscidose, et a fait l'objet de la Thèse d'Université de L. Drévilon (mai 2009) qui a démontré son rôle dans la régulation du trafic intracellulaire de CFTR par inhibition de son ubiquitination (Drevillon, et al., 2011).

1. La famille COMMD, ubiquitaire et conservée.

La famille des protéines COMMD (*Copper Metabolism Murr1 Domain*) comprend 10 protéines, numérotées de 1 à 10, caractérisées en C-terminal par le domaine COMM de 65 à 80 acides aminés, original et très conservé dans la famille (Figure 27 A). Ces protéines à domaine COMM sont retrouvées chez tous les vertébrés, avec un degré de conservation significatif chez les mammifères (Burstein, et al., 2005; Maine and Burstein, 2007b). Si les membres de la famille sont très homologues par leur domaine C-terminal, la partie N-terminale est très variable en séquence et en longueur, de 18 résidus pour COMMD6 à 151 résidus pour COMMD5. Ainsi, par exemple, si l'on considère les régions en dehors du domaine COMM, COMMD1 et COMMD10 ne partagent que 34% d'homologie, ce qui expliquerait la spécificité fonctionnelle de ces protéines (Maine and Burstein, 2007b).

Chez l'homme, les protéines COMMD sont ubiquitaires avec des variations du taux d'expression tissu-spécifiques (Figure 27 B, <http://biogps.gnf.org/#goto=search>)(Su, et al., 2004). Par exemple, COMMD1 est largement exprimée dans les cellules d'adulte, tandis que COMMD9 est préférentiellement exprimée dans les cellules myéloïdes ou le système nerveux central. La

localisation subcellulaire n'est connue que pour COMMD1 et COMMD5 : COMMD5 est une protéine nucléaire, tandis que COMMD1 est retrouvée aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau et les organelles péri-nucléaires (Solban, et al., 2000)

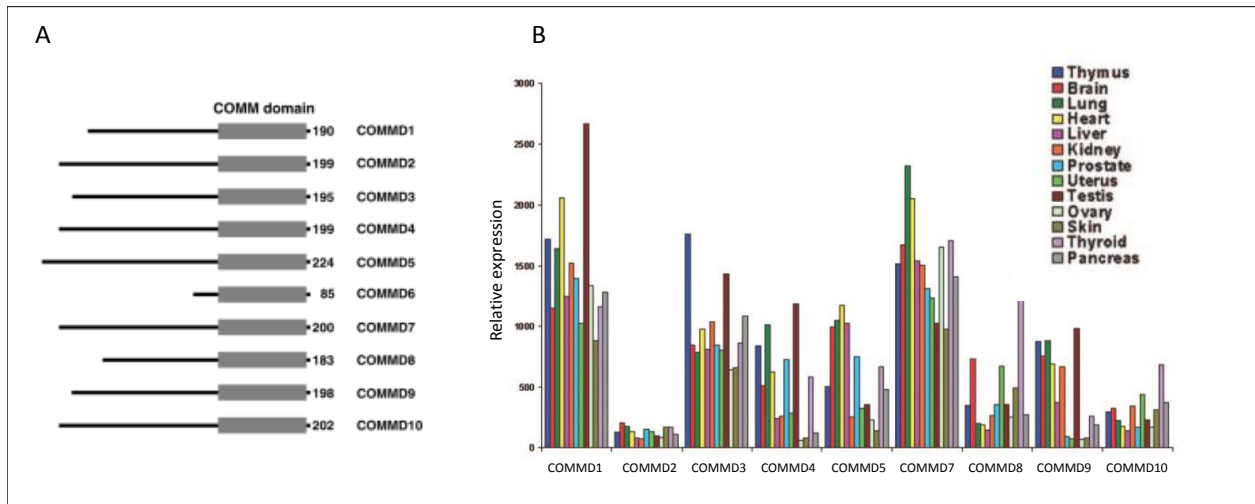


Figure 27. Les différents membres de la famille COMMD, chez l'homme. Les 10 protéines de la famille COMMD ont en commun un domaine COMM (Copper Metabolism Murr1 Domain) caractéristique en C-terminal et différent par leur extrémité N-terminale. Excepté la protéine COMMD6, presque exclusivement constituée du domaine COMMD, ces protéines ont toutes une longueur d'environ 200 acides aminés. L'expression tissulaire des différentes protéines COMMD a été établie d'après des données de puces d'expression (Maine and Burstein, 2007b)

Malgré l'identification d'un certain nombre de protéines partenaires, la fonction exacte des protéines COMMD reste inconnue. Un des obstacles majeurs est l'originalité de ces protéines COMMD qui ne sont les homologues d'aucune protéine connue, et qui ne contiennent pas de motif ou domaine déjà caractérisé sur le plan fonctionnel biochimique.

2. Structure et fonctions générales de COMMD1

Initialement désigné sous le nom de MURR1 (*Mouse U2af1-rs1 region 1*) de par son homologie avec un gène murin contenant dans un intron le gène soumis à empreinte *U2af1-rs1* (Nabetani, et al., 1997), COMMD1 (*Copper Metabolism Murr1 Domain 1*) a été renommée en 2005 et désignée comme chef de file de la famille COMMD. La structure très particulière de l'homologue murin n'est pas retrouvée chez les autres mammifères, et chez l'homme le gène *COMMD1* est située dans une région distincte de l'homologue d'*U2AF1-RS1*.

2.1. Localisation

COMMD1 est une protéine ubiquitaire. Des études par puces d'expression ont montré qu'elle est particulièrement exprimée dans l'appareil reproducteur masculin, les poumons, le placenta, le pancréas et l'intestin grêle, (Figure 27 B) (Burstein, et al., 2005), ainsi que dans de nombreuses lignées cellulaires (Klomp, et al., 2003).

Au niveau subcellulaire, une fraction minoritaire de COMMD1 peut être retrouvée dans le noyau, mais la fraction majeure est cytoplasmique (de Bie, et al., 2006; Klomp, et al., 2003). Cependant, la distribution varie selon les cellules. En effet, bien qu'une fraction cytosolique soluble ne puisse être exclue, dans les cellules HeLa, A549, H441 et HEK293, COMMD1 montre une distribution vésiculaire post-Golgi, et co-localise avec des marqueurs des endosomes précoces (« early endosomes »). Cependant, cette localisation est probablement cellule-spécifique, puisque des études d'immunofluorescence dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2, Hep3B et PLC/PRF/5, et les lignées de carcinome du côlon Caco2 et HT-29, ne présentent pas de marquage vésiculaire (Burstein, et al., 2005; Klomp, et al., 2003).

2.2. Structure

Transcrit d'un gène de 230 kb (MIM: 607238), comprenant 3 exons et localisé en 2p15, l'ARNm (911 pb) de COMMD1 est traduit en une petite protéine soluble de 190 acides aminés, avec un poids moléculaire de 21 kDa. Les études structurales de COMMD1 sont compliquées par l'instabilité de la protéine et sa capacité à s'agréger. Dans sa partie N-terminale, COMMD1 présente une séquence originale de 105 à 118 acides aminés. Comme toutes les protéines de la famille, il présente sur sa moitié C-terminale le domaine COMM impliqué dans les interactions protéine – protéine (Figure 28).

2.2.1. Le domaine N-terminal

En l'absence du domaine COMM, la partie N-terminale de COMMD1 adopte une conformation compacte, monomérique, constituée de 5 hélices α et arrangée de manière complexe et unique, jamais observée dans d'autres structures (Sommerhalter, et al., 2007). Cette nature compacte de l'extrémité N-ter-COMMD1 suggère que la forme entière des protéines COMM est un module dont les différents domaines ont des fonctions protéiques distinctes. Des zones chargées positivement en surface dans la partie N-terminale pourraient permettre des interactions protéine-protéine. Cependant, l'analyse structurale en cristallographie et résonance magnétique de COMMD1 n'a pas permis d'identifier des motifs offrant des clés mécanistiques à l'activité de COMMD1 (Sommerhalter, et al., 2007).

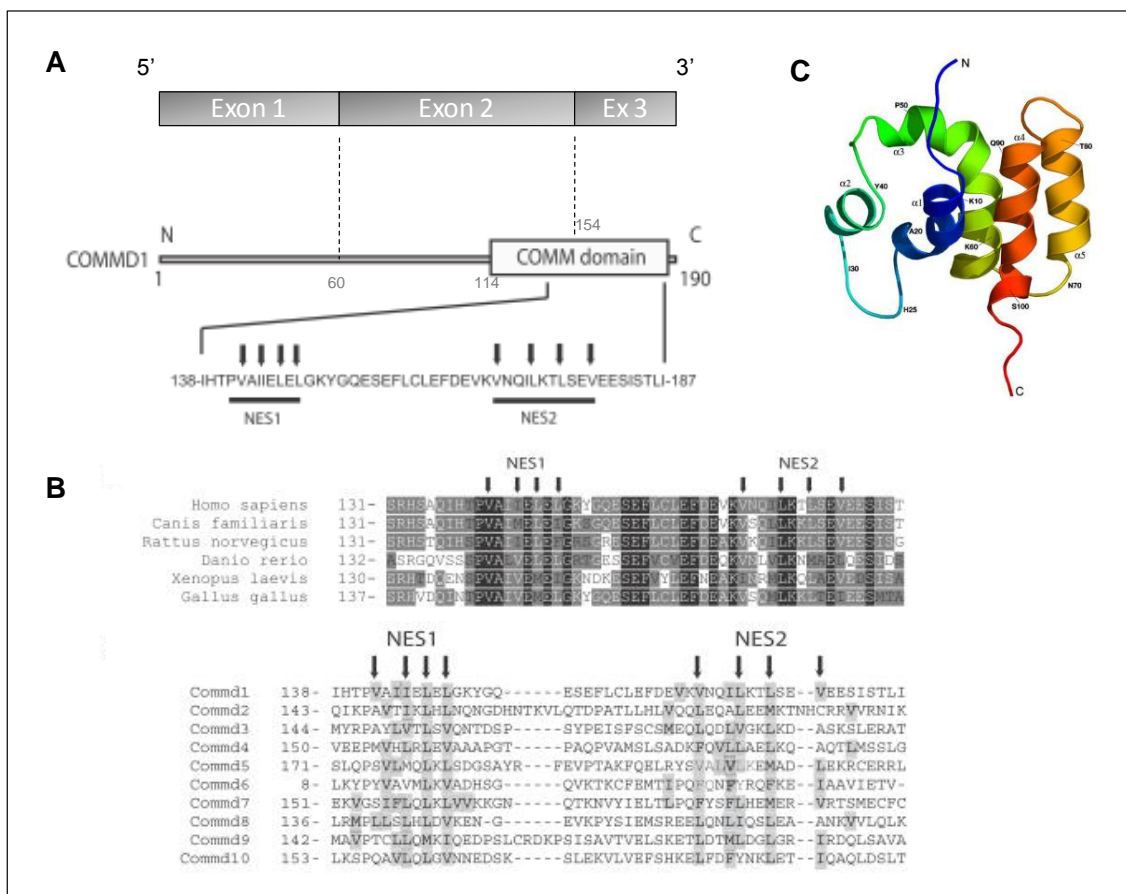


Figure 28. Représentation schématique de COMMD1. (A) Structure générale de COMMD1, avec sa séquence spécifique N-ter et son domaine COMM. (B) Homologie de séquence du domaine COMM, qui contient les 2 séquences d'export nucléaire NES, entre les espèces et entre les différentes protéines COMMD. (C) Représentation de la partie N-terminale de la protéine COMMD1. (A) et (B) : (Muller et al., 2009) ; (C) : (Sommerhalter et al., 2007)

2.2.2. Le domaine COMM : site d'interactions protéiques

Le domaine COMM est une séquence conservée, de 65 à 80 acides aminés selon les protéines qui définit la famille COMMD, et porte des fonctions identifiées d'export nucléaire et d'interactions avec des partenaires. Chez COMMD1, ce domaine est compris entre les acides aminés 118 et 186 (soit 68 résidus). Ce domaine riche en leucines, avec certains résidus très conservés, contient des signaux de localisation subcellulaire et constitue une interface pour les interactions avec d'autres partenaires. Des algorithmes de structure secondaire prédisent la présence d'un feuillet β conservé et d'une hélice α à l'extrémité C-terminale, mais la structure tertiaire de ce domaine n'a pas encore été résolue (Maine and Burstein, 2007b). L'activité du domaine COMM a surtout été étudiée chez COMMD1 et COMMD6.

a) Export nucléaire

Si la localisation subcellulaire de la majorité des protéines COMMD est encore inexplorée, COMMD1 est cependant connue pour sa double localisation nucléaire et cytoplasmique (Burstein, et al., 2005; Klomp, et al., 2003). Le mécanisme de passage de COMMD1 du cytoplasme vers le noyau est mal connu : étant donnée sa petite taille (21 kDa), il est possible que la protéine pénètre par diffusion, aucune séquence de localisation nucléaire ou *Nuclear Localisation Signal* (NLS) n'ayant été identifiée. Une étude récente a permis d'élucider en partie le passage du noyau vers le cytoplasme. En effet, le domaine COMM contient deux séquences d'export nucléaire ou *Nuclear Export Signal* (NES) contenant des acides aminés hydrophobes conservés au sein des espèces et dans les différentes protéines COMMD (Figure 28). L'exportine CRM1, qui reconnaît des séquences riches en leucine, en interagissant avec ces NES, permet la translocation de COMMD1 du noyau vers le cytoplasme (Muller, et al., 2009). Cette étude n'a été menée *in vitro* que sur COMMD1, mais ces séquences NES étant retrouvées dans les autres protéines COMMD, on peut supposer qu'elles aussi pourraient être des protéines navettes entre cytosol et espace nucléaire.

b) Interactions protéine-protéine et protéine-lipide

Lors de la définition de la famille COMMD, en 2005, Burstein et ses collaborateurs avaient montré que COMMD1 était capable de s'associer *in vitro* avec les neuf autres membres de la famille, bien que certains assemblages soient préférentiels, grâce au domaine COMM qui sert d'interface pour ces interactions (Burstein, et al., 2005).

Interactions avec des protéines COMMD

Des homodimères de COMMD1, des hétérodimères de COMMD1 avec COMMD3, COMMD4 ou COMMD6, voire même des homo-tétramères de COMMD1 ont été décrits à l'état naturel dans différentes lignées cellulaires (Burkhead, et al., 2009; Burstein, et al., 2005; de Bie, et al., 2006). Le mécanisme d'interaction est mal connu. La formation des dimères est favorisée par la liaison au cuivre (Narindrasorasak, et al., 2007). Le domaine COMM ne contient qu'une seule cystéine (Cys160) qui pourrait participer à la dimérisation par la création de ponts disulfures, mais qui n'est pas indispensable à cette interaction. L'hypothèse formulée par Narindrasorasak est que les ponts disulfures se forment pour consolider le dimère après le rapprochement des deux domaines COMM grâce à d'autres interactions. Ce modèle est valable pour les homo- et hétérodimères, mais par pour les tétramères (Narindrasorasak, et al., 2007).

Interactions avec d'autres protéines

Le domaine COMM permet aussi l'interaction des membres de la famille COMMD avec d'autres partenaires protéiques, parmi lesquels la protéine Cul2 (Maine, et al., 2007), certains membres de la famille NF- κ B (de Bie, et al., 2006), la kinase régulée par le sérum et les glucocorticoïdes SGK1 (Ke, et al.). Il est à noter cependant que si le domaine COMM apparaît comme une plate-forme d'interactions, la nature et la spécificité de ces interactions varient d'un membre de la famille à l'autre, comme cela a été montré pour la liaison avec les différentes protéines NF- κ B (Burstein, et al., 2005).

D'une manière intéressante, nous avons montré au laboratoire que COMMD1 est capable de lier grâce à son domaine COMM la protéine CFTR sur sa boucle ICL3 (Drevillon, et al., 2011)

Interactions avec des lipides

Par ailleurs, une étude récente suggère une interaction possible entre les protéines COMMD et les lipides membranaires. En effet, l'utilisation de membranes (PIPstrips) a permis récemment de montrer l'interaction possible de COMMD1 avec des partenaires lipidiques, et plus particulièrement des phosphatidyl-inositols di ou tri-phosphorylés. Notamment, COMMD1 interagit avec le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate PtdIns(4,5)P₂ ou PIP₂, une molécule d'ancrage à la membrane décrite dans le trafic vésiculaire, la modulation de l'activité des transporteurs, l'établissement et le maintien de la polarité dans les cellules épithéliales. Cette liaison requiert la présence du domaine C-terminal de COMMD1 (Burkhead, et al., 2009).

Bien que les mécanismes d'interaction avec ses différents partenaires ne soient pas complètement élucidés, COMMD1 interagit avec un grand nombre de molécules et est impliqué dans plusieurs voies physiopathologiques. Si de nombreux éléments montrent que le domaine COMM est essentiel à la fonction de la protéine, la spécificité d'action serait apportée par le domaine N-terminal. En effet, tous les membres de la famille COMMD peuvent lier des protéines de la famille NF- κ B grâce à leur domaine COMM, mais pour fixer la protéine RelA (p65), la forme totale de COMMD1 est requise (Burstein, et al., 2005). Un autre exemple de la collaboration étroite entre ces deux domaines est la fixation spécifique du cuivre (II) récemment mise en évidence qui est médiée par la méthionine M110 (domaine N-ter) et l'histidine H134 (domaine COMM) et favorise la dimérisation de COMMD1 (Narindrasorasak, et al., 2007).

3. COMMD1 et homéostasie du cuivre

La participation à la régulation du transport du cuivre a été la première fonction physiologique décrite de la protéine COMMD1, dont la découverte est due à l'implication de son homologue canin dans l'hépatotoxicose canine, une maladie de surcharge en cuivre pour laquelle le Bedlington terrier est un modèle naturel (délétion homozygote de l'exon 2) (van De Sluis, et al., 2002).

L'équivalent chez l'homme de cette maladie de surcharge en cuivre est la maladie de Wilson (OMIM 277900), une maladie autosomique récessive caractérisée par une accumulation toxique de cuivre essentiellement dans le foie et le système nerveux central, et résultant pour 60 à 70% des cas de mutations du gène *ATP7B* (Petrukhin, et al., 1994). La protéine **ATP7B** est un transporteur de cuivre qui, en condition basale dans l'hépatocyte, est localisé dans le compartiment transgolgien et permet d'incorporer le cuivre à des cuproenzymes comme la céruléoplasmine. En cas d'excès de cuivre intracellulaire, ATP7B participe à la libération du métal dans les canaux biliaires par un système vésiculaire encore mal connu (Figure 29) (Hung, et al., 1997; Miyayama, et al., 2010)(pour revue : (de Bie, et al., 2005)). Bien que COMMD1 soit lui-même capable de lier spécifiquement l'ion Cu_2^+ (Narindrasorasak, et al., 2007), c'est sa capacité d'interagir avec ATP7B qui a tout d'abord suscité l'intérêt (Tao, et al., 2003). En effet, COMMD1 apparaît nécessaire à la relocalisation d'ATP7B des vésicules diffuses vers le compartiment transgolgien après excrétion du cuivre (Miyayama, et al., 2010) et intervient dans la stabilité de ce transporteur (de Bie, et al., 2007). Notamment, dans la maladie de Wilson, des mutants naturels d'ATP7B sur le site d'interaction avec COMMD1 (G85V et G591D) sont retenus dans le réticulum endoplasmique puis dégradés par le protéasome (de Bie, et al., 2007). Cependant, l'étude moléculaire de COMMD1 dans des cohortes de patients présentant des surcharges en cuivre (Weiss, et al., 2006; Wu, et al., 2006b) n'a pas permis d'impliquer COMMD1 dans la maladie de Wilson, ni comme gène causal, ni comme gène modificateur.

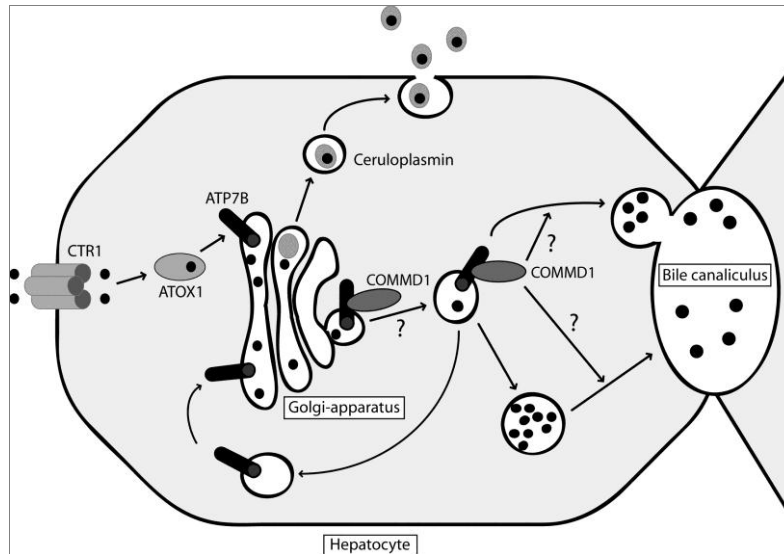


Figure 29. Rôle de COMMD1 dans le métabolisme du cuivre (deBie et al., 2005). Le cuivre pénètre dans l'hépatocyte par le transporteur CTR-1 et est délivré à ATP7B dans l'appareil de Golgi par la protéine chaperonne ATOX1. Dans l'appareil de Golgi, le cuivre est ensuite incorporé dans des cuproenzymes, parmi lesquels la céruléoplasmine. Lorsque le taux intracellulaire de cuivre augmente, ATP7B est redistribué vers un compartiment vésiculaire. Puis ATP7B est relocalisé vers le Golgi, et le cuivre est excrété dans la bile, *via* un mécanisme qui implique probablement COMMD1.

4. COMMD1 et régulation du transport sodique

En recherchant des partenaires protéiques de la sous-unité delta du canal **ENaC** (*Epithelial Na⁺ Channel*), l'équipe néo-zélandaise de McDonalds a identifié en 2004 la protéine COMMD1 comme pouvant se fixer à sa partie C-terminale (Biasio, et al., 2004). Le canal sodium épithélial amiloride sensible ENaC est un régulateur clé de l'absorption de sodium à travers la membrane épithéliale tapissant la partie distale du tubule rénal, du côlon distal, de certaines glandes exocrines et du poumon (Canessa, et al., 1994). Il s'agit d'un trimère, composé de 3 sous-unités, $\alpha/\beta/\gamma$ (rein, côlon, poumon) ou $\delta/\beta/\gamma$ (cerveau, testicule, ovaire, pancréas) (Waldmann, et al., 1995). Des études approfondies ont montré la fixation de COMMD1 non seulement avec la sous-unité delta de ENaC, mais aussi avec ses sous-unités beta et gamma, mais aucune avec la sous-unité alpha. Ces sous-unités comprennent un motif PY conservé, responsable de la liaison d'ENaC avec l'inhibiteur **Nedd4**, une E3 ubiquitine ligase qui favorise l'endocytose et la dégradation du canal (Abriel, et al., 1999). Nedd4 est elle-même régulée par des kinases (Figure 30) (Lee, et al., 2007).

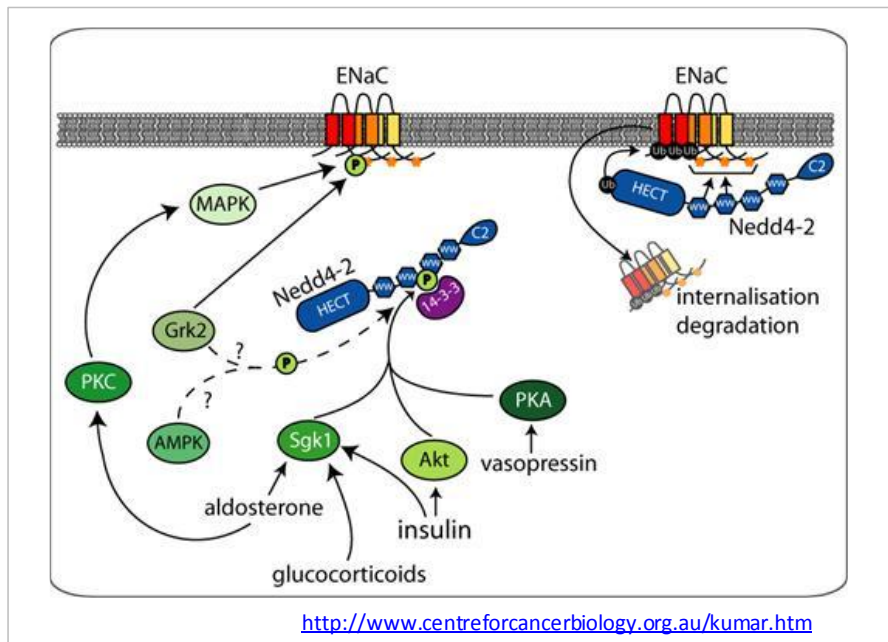


Figure 30. Régulation du canal ENaC par Nedd4-2. Lorsque le taux intracellulaire de Na^+ est bas, différentes hormones activent Sgk1, Akt ou PKA, qui phosphorylent Nedd4-2. Ceci a pour effet d'inhiber l'interaction de Nedd4-2 avec ENaC, entraînant une augmentation de la quantité de canal à la membrane cellulaire. Lorsque la concentration intracellulaire en Na^+ est élevée, Nedd4-2 ubiquitine ENaC, entraînant son internalisation. A partir des vésicules d'endocytose, ENaC peut être dirigé vers la dégradation ou bien être recyclé à la membrane plasmique. L'interaction Nedd4-2/ENaC serait favorisée par COMMD1.

COMMD1, comme Nedd4, est un régulateur négatif d'ENaC, en augmentant son ubiquitination et diminuant son expression membranaire (Biasio, et al., 2004; Ke, et al., 2010). Grâce au domaine COMM, COMMD1 se lie au canal ENaC (sous unités β, γ, δ), à SGK1, et à Akt1, et module positivement l'effet inhibiteur de Nedd4 sur le canal (Ke, et al., 2010; Snyder, et al., 2001). Le modèle proposé par l'équipe de McDonalds est que COMMD1, sous forme de dimère, forme un complexe membranaire avec ENaC, SGK1 et Nedd4, favorisant ainsi l'endocytose d'ENaC et résultant en une diminution du transport sodique (Ke, et al., 2010). Cette association pourrait être favorisée par l'ancrage à la membrane grâce aux interactions de COMMD1 avec les phospholipides (Burkhead, et al., 2009). Différentes hypothèses mécanistiques sur le phénomène régulateur en lui-même sont à explorer. Par exemple, le recrutement de COMMD1 pourrait promouvoir la dégradation de SGK1/Akt1 par le protéasome, ou bien l'encombrement stérique provoqué par COMMD1 pourrait empêcher l'activation par phosphorylation de SGK1/Akt1 et/ou prévenir la phosphorylation de Nedd4 par SGK1/Akt1 (Ke, et al., 2010). L'étude de souris knock-out tend à montrer que COMMD1 n'est probablement pas un régulateur majeur de l'homéostasie sodique (Shi, et al., 2008; Wulff, et al., 2002). Cependant, comme d'autres régulateurs de l'ENaC, comme par exemple la cavéoline, il a un effet modeste mais néanmoins significatif sur ce canal.

5. COMMD1 et signalisation HIF-1

En 2007, Van de Sluis et al. ont généré une souris transgénique KO pour *Commd1* (*Commd1*^{-/-}). Ces souris n'étaient pas viables et pour comprendre les origines de cette létalité embryonnaire, des puces d'expression ont été réalisées pour déterminer les gènes affectés par l'extinction de COMMD1. Ces résultats ont montré que COMMD1 avait un rôle essentiel dans la régulation de l'hypoxie durant l'embryogénèse précoce chez la souris (van de Sluis, et al., 2007). La réponse transcriptionnelle à l'hypoxie chez les mammifères dépend de nombreux complexes régulant plusieurs facteurs de transcription, le plus étudié étant HIF-1 (pour revue (Kim and Kaelin, 2003)).

Le facteur de transcription **HIF-1** est composé de 2 sous unités : **HIF-1 β** est exprimée de manière constitutive dans les cellules et **HIF-1 α** est oxygène labile et stabilisée dans les cellules exposées à un faible taux d'oxygène (Jiang, et al., 1996a; Jiang, et al., 1996b).

En **conditions normoxiques** ($pO_2=21\%$), HIF-1 α n'a une demi-vie que de quelques minutes. En effet, HIF1 α est rapidement hydroxylée sur le motif hautement conservé LXXLAP dans les domaines *Oxygen-Dependent-Degradation domain* (ODDs) en P564 (CODD) et P402 (NODD) (Ivan, et al., 2001; Jaakkola, et al., 2001) par une famille de proline hydroxylases à domaine PHD (Bruick and McKnight, 2001; Epstein, et al., 2001). La forme hydroxylée de HIF-1 α se lie à pVHL (protéine von Hippel Lindau) qui fait partie d'un complexe multiprotéique contenant une culline ubiquitine ligase activée par la NEDDylation (Hon, et al., 2002; Min, et al., 2002; Ohh, et al., 2002). HIF-1 α est alors ubiquitinée et dirigée vers le protéasome (Maxwell, et al., 1999). En **conditions hypoxiques** ($pO_2<5\%$), HIF-1 α n'est pas hydroxylée (Chan, et al., 2002), ne se lie donc pas à pVHL et est stabilisée (Maxwell, et al., 1999). Elle s'associe alors à HIF1 β , transloque dans le noyau et se lie à sa séquence spécifique HRE (*Hypoxic Responsive Element*) dans des gènes cibles pour activer la transcription. Un phénomène de régulation, faisant notamment intervenir p53, déstabilise ensuite HIF-1 α (Figure 31) (Ravi, et al., 2000).

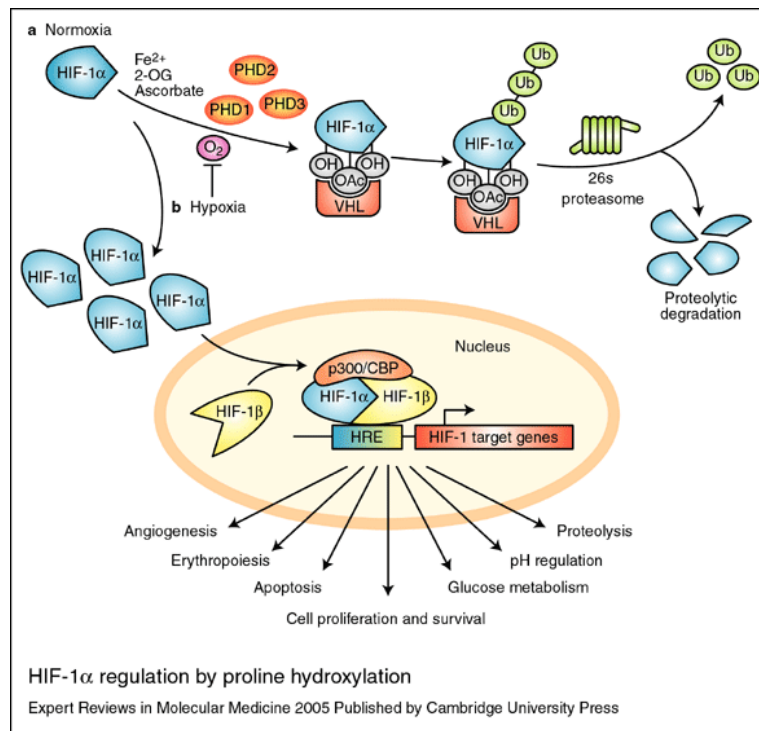


Figure 31. Régulation de l'activité du facteur de transcription HIF-1. (a) En condition normoxique, HIF-1 α est rapidement hydroxylé et dégradé dans le cytoplasme. (b) En conditions d'hypoxie, les prolylhydroxylases sont inhibées et HIF-1 α , non dégradé, transloque dans le noyau où il se dimérise avec HIF-1 β pour former le facteur HIF qui se lie à l'ADN et active ou réprime des gènes-cibles. (Carroll and Ashcroft, 2005)

Normalement, l'expression de COMMD1 est ubiquitaire dans l'embryon et le placenta, l'ARN étant détectable dès E8.5 jusqu'à des localisations plus ciblées à E13.5, ce qui montre l'importance de cette protéine pour le développement embryonnaire. Alors que les hétérozygotes canins et murins sont en bonne santé, la perte totale d'expression de la protéine chez le modèle murin *Commd1*^{-/-} entraîne un phénotype léthal *in utero* avec un défaut de vascularisation du placenta et une augmentation du taux de HIF- α et de l'expression de certains de ses gènes cibles. Ces gènes sont impliqués dans différentes fonctions cellulaires incluant l'apoptose, l'angiogenèse, ou encore le métabolisme (glycolyse, métabolisme du fer) (van de Sluis, et al., 2007).

La relation entre COMMD1 et HIF-1 a été étudiée *in vitro*. Des études d'immunoprécipitation montrent que COMMD1 se lie à la partie N-terminale (acides aminés 1-300) de HIF-1 α et HIF-1 β , sur des régions permettant l'hétérodimérisation de HIF et sa fixation à l'ADN (domaines bHLH/PAS). En situation normoxique, COMMD1 empêcherait la dimérisation de HIF-1 dans le noyau et sa liaison à l'ADN, et ainsi inhiberait l'activité transcriptionnelle de ce facteur (van de Sluis, et al., 2010). Cette interaction entre COMMD1 et HIF-1 est augmentée par l'oxygène. Sous conditions hypoxiques, l'export nucléaire de COMMD1 *via* le transporteur CRM1 augmente, ce qui permet d'augmenter

l'activité transcriptionnelle de HIF-1 (Muller, et al., 2009). Par ailleurs, dans le cytoplasme, COMMD1 permet la formation d'un complexe HIF-1 α /COMMD1/Hsp70 menant à la dégradation protéasomale de HIF-1 α d'une manière indépendante de pVHL (van de Sluis, et al., 2009).

6. COMMD1 et voie NF-kappaB (NF- κ B)

Le facteur de transcription dimérique NF- κ B contrôle de nombreux gènes impliqués non seulement dans l'immunité innée et adaptative, mais aussi dans l'apoptose et la prolifération cellulaire (Li and Verma, 2002; Wietek and O'Neill, 2007).

La régulation de cette voie de transduction dépend en partie d'enzymes ubiquitine ligases, qui régulent la dégradation des différents partenaires de la voie NF- κ B. Les complexes SCF sont les E3 ubiquitine-ligases les plus répandues chez les eucaryotes (Deshaies, 1999; Willems, et al., 2004) et sont composés notamment d'une protéine culline, d'une protéine adaptatrice (Skp1, ElonginB/C...) et d'une protéine F-box ou SOCS-box qui permet de reconnaître spécifiquement certains substrats. Les complexes ECF ont une structure assez proche (Petroski and Deshaies, 2005).

L'élément majeur de régulation de l'activité NF- κ B correspond à la dégradation stimulation-dépendante des protéines I κ B, permettant la translocation des dimères NF- κ B du cytoplasme vers le noyau, une étape critique pour l'initiation de la transcription des gènes cibles (Figure 32) (Hacker and Karin, 2006). Différents signaux, incluant les lipopolysaccharides (LPS), l'interleukine 1 (IL-1) ou le *Tumour Necrosis Factor α* (TNF- α), peuvent déclencher la voie canonique. Ils activent une cascade de signalisation qui aboutit à la phosphorylation de I κ B par le complexe IKK, l'ubiquitination de phospho-I κ B par un complexe ubiquitine ligase, comme le complexe multimérique SCF ^{β -TRCP}, puis son élimination par le protéasome (Ghosh and Hayden, 2008). D'autres mécanismes plus spécifiques participent ensuite à la régulation de NF- κ B au niveau nucléaire, incluant les modifications post-traductionnelles par phosphorylation, acétylation et ubiquitination des sous unités fixant l'ADN. Les principales sous unités de NF- κ B, RelA (p65) et p50, peuvent toutes deux être ubiquitinées et dégradées dans le noyau, permettant la terminaison de la réponse (Carmody and Chen, 2007; Ryo, et al., 2003; Sacconi, et al., 2004; Tanaka, et al., 2007).

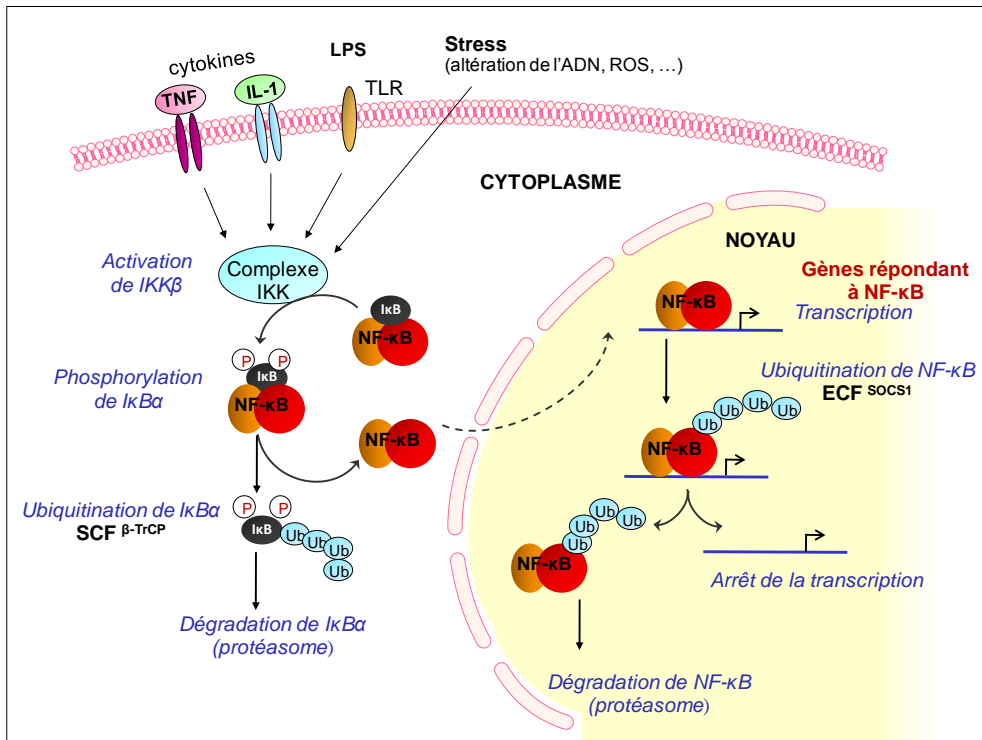


Figure 32. Les principaux mécanismes de régulation de la voie classique de NF-κB.

Ganesh et ses collaborateurs ont été les premiers à montrer l'implication de COMMD1 dans l'inflammation. En effet, COMMD1 inhibe la réplication du virus HIV-1 dans les lymphocytes CD4+ *via* l'inhibition de la signalisation NF-κB, le promoteur du virus contenant deux sites répondant à NF-κB (Ganesh, et al., 2003). Depuis, il a été montré que COMMD1 a un effet global d'inhibition de la transcription médiée par NF-κB engendrée par de nombreux *stimuli* incluant le TNF-α, l'IL-1β, les esters de phorbol, et l'expression ectopique de sous unités du complexe IKK. Plus récemment, il a été montré que COMMD1 contrôle l'expression d'un certain nombre de gènes induits par NF-κB comme ICAM1 et CCL2 (Maine, et al., 2007).

	COMMD 1	COMMD 2	COMMD 3	COMMD 4	COMMD 5	COMMD 6	COMMD 7	COMMD 8	COMMD 9	COMMD 10
RelA (p65)	++	++	-	++	++	+	+	+	-	++
c-Rel	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RelB	++	++	+	+	++	-	-	+	++	++
NF- κ B1/p105*	++	++	+	++	++	++	-	++	+	++
NF- κ B2/p100**	++	-	-	-	-	-	-	-	-	++

Tableau 5. Interactions des protéines COMMD avec les protéines NF- κ B. Adapté de (Burstein *et al*, 2005). D'après. La capacité de liaison des 10 membres de la famille COMMD avec les différentes protéines de la famille NF- κ B a été évaluée par immunoprécipitation (cellules HEK293T). ++ : liaison importante, + : liaison détectable, - : absence de liaison détectable. * : précurseur de p50, ** précurseur de p52. COMMD1, 2, 4, 7, 9, et 10 inhibent fortement l'activation de NF- κ B médiée par le TNF- α , tandis que COMMD3 et 8 ont un effet plus modéré.

COMMD1 est capable de se lier à I κ B α mais, comme les autres membres de la famille COMM, peut aussi interagir avec les sous unités NF- κ B par leur motif amino-terminal RHD, absent dans I κ B (Tableau 5). COMMD1 stabilise I κ B α phosphorylé, et, dans une moindre mesure, I κ B β probablement en prévenant leur ubiquitination par interaction avec la Culline 1 (Cul1) du complexe SCF ^{β -TrCP} ubiquitine ligase (β -TrCP1-Skp1-Cul1-Rbx1-E2-Ub) (Figure 33A) (Burstein, *et al.*, 2005; Ganesh, *et al.*, 2003; Greene, 2004). On pouvait penser qu'en inhibant la dégradation de I κ B, COMMD1 empêche la translocation nucléaire de NF- κ B et diminue ainsi l'activation de cette voie. Cependant, cet événement ne semble pas être dominant dans la régulation de l'inflammation puisque la surexpression de COMMD1 n'affecte pas la translocation nucléaire de RelA induite par le TNF α (Burstein, *et al.*, 2005). Cette absence apparente d'effet pourrait être due à une cascade d'interaction complexes induites par le TNF α , aboutissant à la dégradation de COMMD1 et de phospho-I κ B, et faisant intervenir des protéines chaperonnes telles que sCLU (*secretory Clusterin*) et l'ubiquitine ligase SCF ^{β -TrCP} (Zoubeidi, *et al.*, 2010).

En 2006, Maine *et al* ont montré que COMMD1 régule l'activité NF- κ B principalement après la translocation nucléaire du dimère (pour revue (Maine and Burstein, 2007a)). Dans le noyau, la stimulation par le TNF- α induit l'interaction de COMMD1 (probablement sous forme de dimère) avec la culline Cul2 du complexe Ubiquitine ligase ESC^{SOCS1}, et avec SOCS1 (Figure 33B) (Maine, *et al.*, 2007). Ceci stabilise l'interaction entre la ligase et p65, et favorise donc l'ubiquitination de p65. La protéine NF- κ B ubiquitinée est ensuite dirigée vers la dégradation par le protéasome, dans les nucléoles (Thoms, *et al.*, 2010). L'augmentation de l'expression de COMMD1 diminue la liaison de

NF- κ B à la chromatine, et inversement en cas d'extinction de COMMD1. De plus, COMMD1 peut être recrutée au promoteur lui-même de manière stimulus dépendante. Ainsi, même si le mécanisme responsable des effets de COMMD1 sur les interactions RelA/chromatine reste encore imprécis, Maine et ses collaborateurs ont proposé le modèle suivant : le complexe ECS^{SOCs1}/COMMD1 formé dans le noyau est recruté au niveau des régions promotrices régulées par NF- κ B, facilitant l'ubiquitination et la dégradation de ce facteur de transcription (Figure 33C) (Maine, et al., 2007)

Le mécanisme d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B pourrait faire intervenir d'autres membres de la famille COMMD. En effet, l'interaction de COMMD1 avec COMMD6 a été confirmée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. COMMD6 n'interagit pas directement avec I κ B α , mais est capable de se lier à RelA. Il inhibe l'activation de NF- κ B induite par le TNF- α , selon un mécanisme dépendant du domaine COMM. COMMD6 pourrait agir indépendamment de COMMD1 ou bien être recruté, *via* son domaine COMM, au sein d'un complexe COMMD1/I κ B dans le cytoplasme ou COMMD1/ RelA dans le noyau (de Bie, et al., 2006). La formation de tels échafaudages complexes pourrait également être envisagée pour les autres protéines COMMD.

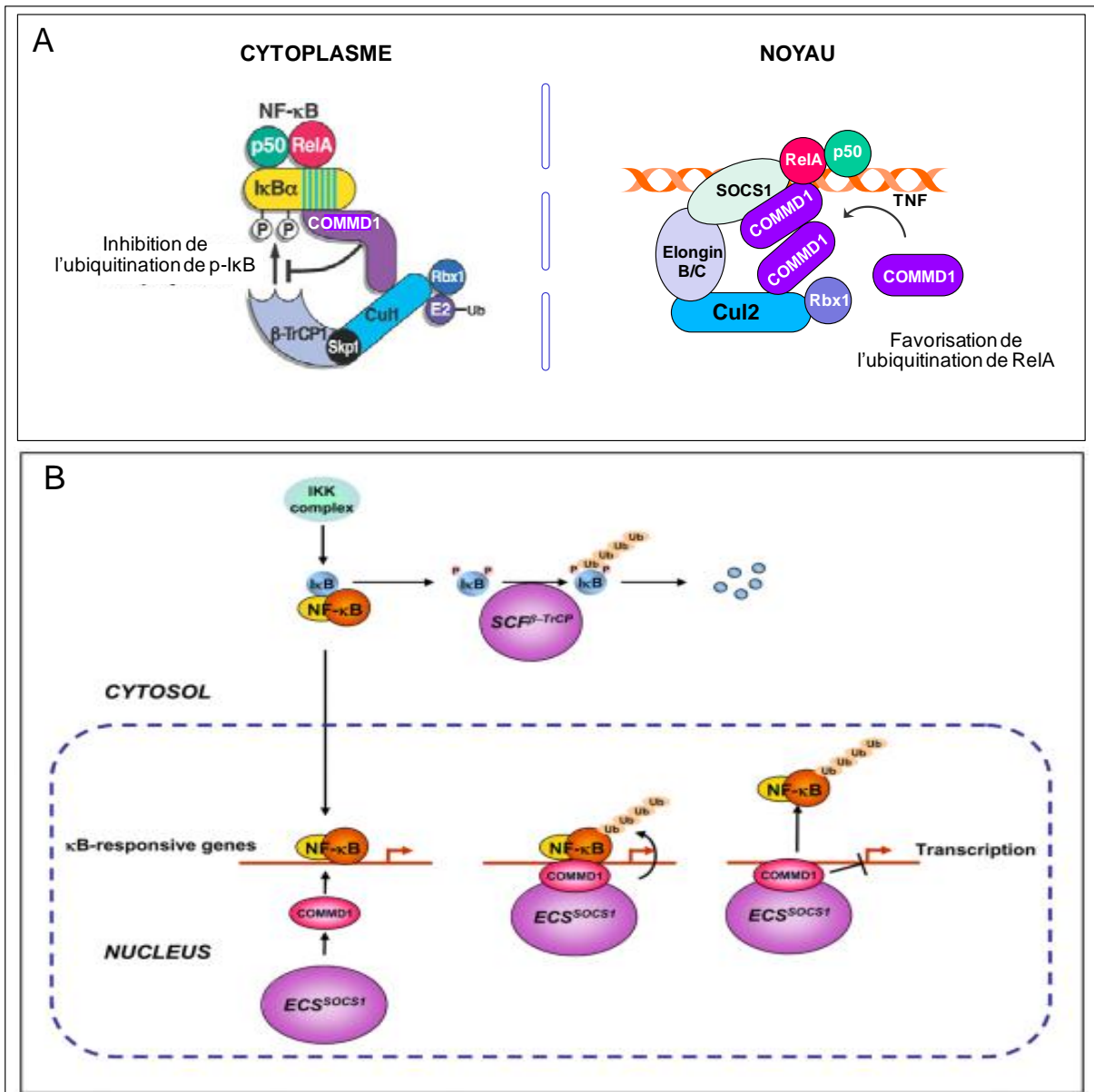


Figure 33. Mécanisme de régulation de la voie NF-κB par COMMD1. (A) Modèles d'interaction de COMMD1 avec les complexes E3 ubiquitine ligases, SCF^{β-TrCP} dans le cytoplasme (Greene et al, 2004) et ECS^{SOCS1} dans le noyau (d'après Maine et al, 2007). (B) Modélisation de la régulation par COMMD1 d'après Maine and Burstein, 2007. Bien que COMMD1 protège phospho-IκB de l'ubiquitination dans le cytoplasme, l'inhibition de la voie NF-κB résulte principalement de l'action nucléaire de COMMD1 qui stabilise l'interaction de l'ubiquitine ligase avec le complexe NF-κB/chromatine.

7. COMMD1 dans le contexte de la mucoviscidose

COMMD1 est une protéine pléiotrope, au carrefour de nombreux processus à la fois inflammatoires, d'hypoxie et de trafic intracellulaire de canaux et de transporteurs (Figure 34). Pour mémoire, la mucoviscidose est caractérisée par une inflammation exacerbée, l'atteinte pulmonaire entraîne une situation d'hypoxie et le canal ENaC est dérégulé par l'absence de CFTR fonctionnel.

L'identification de COMMD1 comme partenaire de CFTR au sein de notre laboratoire par un criblage double hybride de levure a permis d'initier l'étude de CFTR dans le contexte de la mucoviscidose.

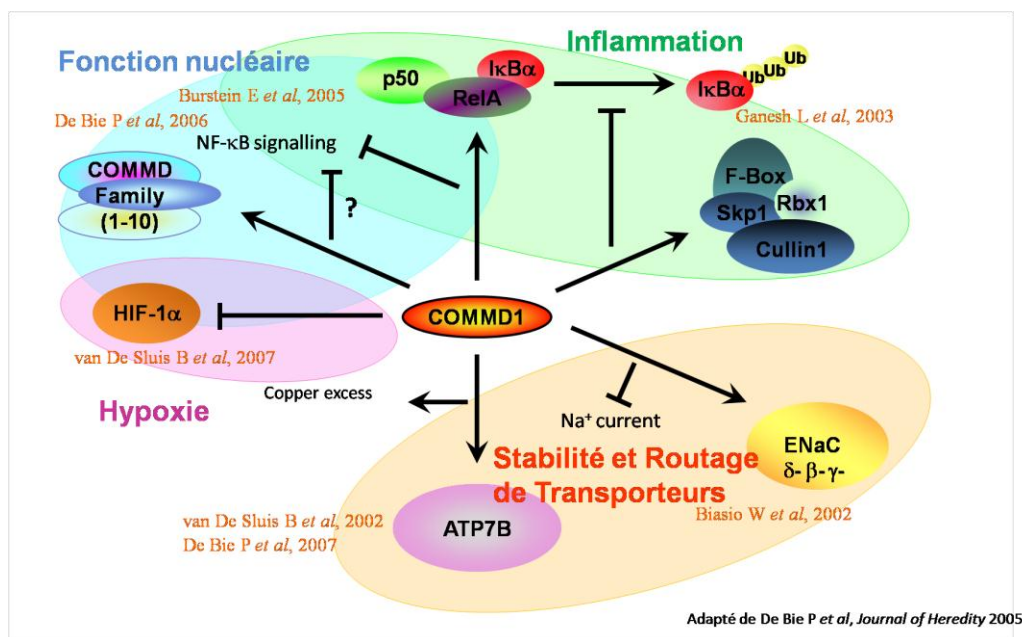


Figure 34. COMMD1 est un régulateur multiple impliqué dans des processus cellulaires variés

7.1.1. La maturation de CFTR

CFTR est une glycoprotéine qui subit un processus de maturation depuis son entrée dans le réticulum endoplasmique jusqu'à l'appareil de Golgi, avant d'être adressée à la membrane plasmique. Dans le réticulum endoplasmique, des protéines chaperonnes favorisent le bon repliement de CFTR. La fraction de protéine correctement repliée mais non glycosylée (**forme A**, 130kDa) transite alors vers l'appareil de Golgi où elle va subir différentes étapes de glycosylation : la forme « **core glycosylée** » (**forme B**, 140 kDa) contient des chaînes oligosaccharidiques sensibles à l'endoglycosidase H. A la fin de ce processus, plus de 75% de la forme B de la protéine CFTR sauvage sont rapidement dégradés. Les 20-25% restants, par une étape de maturation ATP-dépendante, sans glycosylation supplémentaire, acquièrent une résistance aux protéases (**forme B'**) (Lukacs, et al., 1994), Enfin, la forme B' est à nouveau glycosylée dans l'appareil de Golgi, pour donner naissance à la **forme mature** d'environ 170 kDa (**forme C**) qui est alors adressée à la membrane.

La protéine mutée CFTR-F508del, elle, est mal repliée dans le réticulum endoplasmique, et dégradée à près de 100% par la voie ubiquitine-protéasome. Aussi, elle est détectable en grande partie sous sa forme B, tandis que la proportion de forme C est extrêmement minoritaire (Jensen, et al., 1995)

7.1.2. COMMD1 permet l'adressage de CFTR-wt à la membrane

En 2011, L. Drévilon a montré que **COMMD1 interagit avec la troisième boucle intracytoplasmique (ICL-3) de CFTR**, se liant à la forme mature et immature de la protéine de manière endogène. La surexpression de COMMD1 augmente la proportion de CFTR-wt à la membrane (+20%) et son extinction la diminue (-35%).

L'expression membranaire de CFTR est partiellement régulée par l'interaction COMMD1/CFTR mature, probablement au niveau des endosomes précoces/de recyclage, où **COMMD1 participe à diminuer l'ubiquitination de CFTR-wt**, stabilisant ainsi le canal (Figure 35). Cette interaction dépend du domaine COMM de COMMD1 et des résidus Ser-945 et Lys-946 de la boucle intracellulaire 3 de CFTR. Si COMMD1 permet de stabiliser CFTR-wt, en revanche, il peut promouvoir l'ubiquitination de certains mutants comme c'est le cas pour CFTR-K946R et K951R (Drevillon, et al., 2011).

L'ubiquitination est le mode de régulation majeur de la localisation subcellulaire des protéines membranaires et peut entraîner l'adressage post-endocytose des protéines au lysosome (Miranda and Sorkin, 2007). Récemment, l'*Ubiquitine Specific Protease-10* USP10 a été montrée comme dé-ubiquitinant CFTR dans les endosomes précoces et comme activant le recyclage endocytaire de CFTR (Bomberger, et al., 2009). Par ailleurs, COMMD1 peut se lier au niveau des endosomes avec une grande spécificité au PIP₂, probablement au sein d'oligomères stabilisés par les interactions avec les lipides (Burkhead, et al., 2009). Le PIP₂ est un lipide de signalisation et régulation important, fixant de nombreuses molécules de signalisation et du cytosquelette. Il joue des rôles variés dans le trafic membranaire, régulant notamment celui de canaux ioniques, comme ENaC et CFTR pendant leur biosynthèse ou leur trafic vésiculaire (Himmel and Nagel, 2004; Yue, et al., 2002).

COMMD1 pourrait agir comme une protéine d'échafaudage dans le compartiment endocytaire, favorisant l'interaction de CFTR avec des enzymes nécessaires à la régulation de l'ubiquitination de transporteurs membranaires. USP10 et une ubiquitine ligase encore non identifiée pourraient coopérer pour réguler le ré-adressage de CFTR à la membrane.

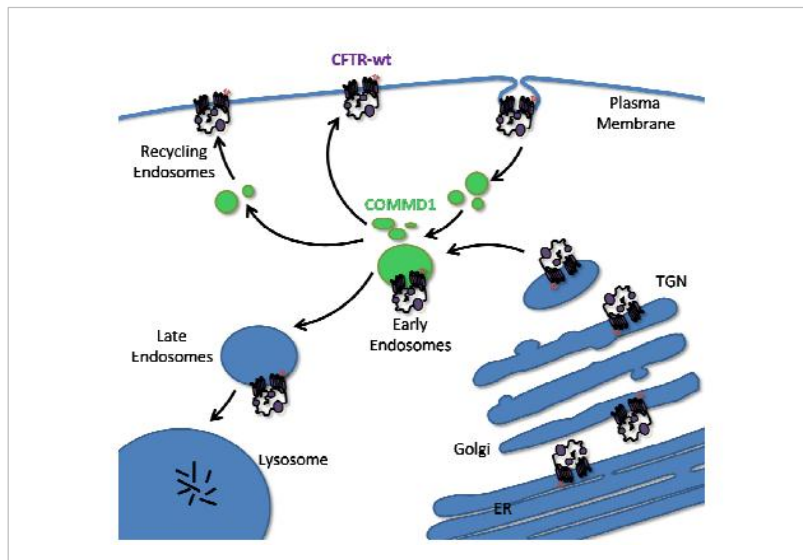


Figure 35. Modèle proposant le rôle de COMMD1 dans l'endocytose et le recyclage de CFTR-wt, d'après (Drevillon, et al., 2011)

7.1.2. COMMD1 se lie à CFTR core-glycosylée wt et F508del

COMMD1 interagit également avec la forme core-glycosylée de CFTR, de manière plus forte avec CFTR-F508del qu'avec CFTR-wt. Cette observation démontre que COMMD1 peut également interagir avec les protéines mal repliées au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Les conséquences fonctionnelles de cette interaction restent à déterminer. La liaison de COMMD1 avec la forme core-glycosylée CFTR-wt pourrait se faire préférentiellement avec la forme mal repliée (forme B) par rapport à la forme correctement repliée (forme B') au niveau du RE. Cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi la protéine COMMD1 interagit avec la protéine mutée CFTR-F508del (forme B). Cela suggère également que la protéine COMMD1 pourrait intervenir non seulement dans la voie d'endocytose/recyclage de CFTR-wt mais aussi dans la dégradation des protéines mal repliées *via* l'ERAD. La voie d'endocytose/recyclage et l'ERAD de CFTR sont tous deux régulés par un mécanisme d'ubiquitination dans lequel COMMD1 pourrait être un régulateur.

La fonction de COMMD1 dans la voie d'endocytose et de recyclage de CFTR-wt et son interaction avec CFTR-F508del localisé dans le RE suggèrent que la protéine COMMD1 intervient à plusieurs étapes du trafic intracellulaire de CFTR nécessitant un processus d'ubiquitination différents dans des compartiments cellulaires distincts. COMMD1, par régulation du trafic et de l'ubiquitination, est

capable d'augmenter CFTR à la membrane cellulaire et de diminuer la proportion membranaire du canal sodique ENaC, qui est anormalement activé dans la mucoviscidose (Amaral and Kunzelmann, 2007)

II. CSN5 et COP9 signalosome

1. Généralités

La protéine **CSN5** est une protéine soluble de 334 acides aminés, avec une masse moléculaire de 38 kDa, codée par un gène localisé en 8q13.1. Cette protéine a été conservée au cours de l'évolution chez l'homme, la souris, et les plantes, ce qui témoigne de son importance pour la survie et la prolifération cellulaire (Schwechheimer, 2004; Wei and Deng, 1999; Wei, et al., 1998). Identifiée tout d'abord pour son rôle de co-activateur du facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein 1*) (Claret, et al., 1996), qui lui a valu le nom de Jab1 (*Jun-Activator-domain-Binding-protein 1*), son identification en tant que 5^{ème} sous unité du COP9 signalosome CSN (*Constitutive Photomorphogenesis Signalosome*) qui régule le système ubiquitine-protéasome, la fait désigner également sous le nom de CSN5 (Deng, et al., 2000; Seeger, et al., 1998). CSN5 est présente dans la cellule sous forme de monomère libre ou intégré dans des complexes, et ces interactions protéiques conditionnent ses différentes fonctions. Dans les tissus humains, CSN5 est ubiquitaire, avec notamment une expression importante dans les cellules immunitaires (lignées lymphoïdes, polynucléaires neutrophiles, monocytes, cellules épithéliales) (EMBL-EBI, atlas ; USCS microarrays expression data).

CSN5 est la sous-unité du signalosome qui a été la plus étudiée. Elle contient dans sa partie N-terminale un domaine MPN (*Mpr1-Pad1-Nterminal*) contenant un motif JAMM (*JAB1 MPN Métalloenzyme domain* ou motif MPN+) à activité métallo-protéase (Hofmann and Bucher, 1998) qui porte la fonction catalytique caractéristique déneddylase du complexe CSN, permettant la régulation de la dégradation protéique par la voie ubiquitine-protéasome. Le clivage par le CSN de la molécule ubiquitine-like Nedd8 permet de réguler l'activité de certaines E3 culline-ubiquitine-ligases (complexes SCF) spécifiques impliquées dans la dégradation protéique par la voie ubiquitine-protéasome (Lyapina, et al., 2001). Ce domaine JAMM est indispensable mais insuffisant à l'activité déneddylase du CSN. En effet, CSN5 ne peut cliver Nedd8 que lorsqu'elle est insérée au sein du signalosome (Cope, et al., 2002; Lyapina, et al., 2001; Sharon, et al., 2009), et la déstabilisation du CSN entraîne la perte de l'activité déneddylase (Adler, et al., 2008; Wei, et al., 2008).

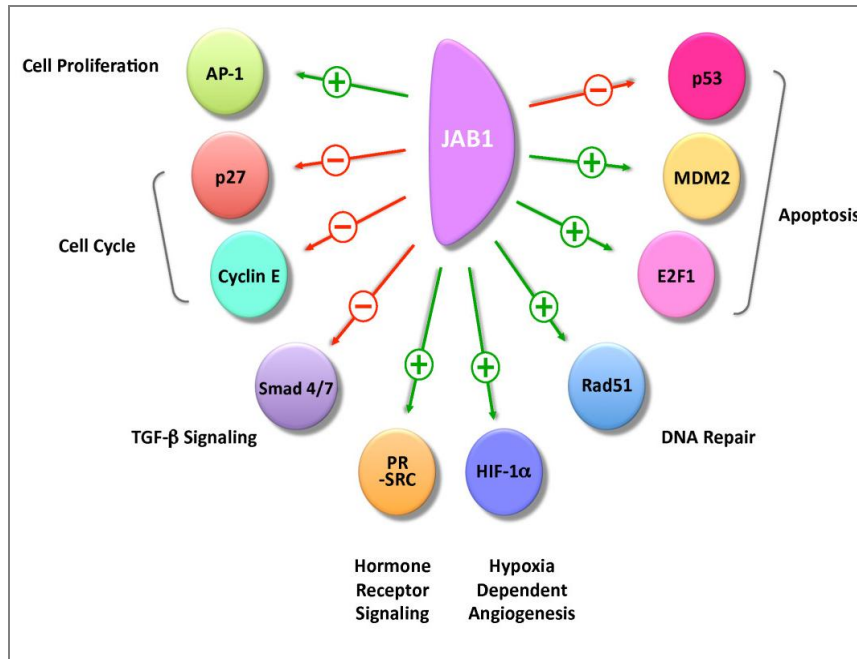


Figure 36. Régulation et cibles de CSN5/Jab1. Les flèches verte (+) indiquent les interactions positives de CSN5 et les flèches rouges (-) les interactions négatives. Abréviations : AP-1, activator protein 1; HIF-1α, hypoxia inducible factor-1 α; MDM2, murine double minute 2; PR, progesterone receptor, SRC-1, steroid receptor coactivator 1; TRC8, translocation in renal carcinoma, d'après (Shackleford and Claret)

CSN5 est la seule protéine du signalosome à posséder un signal d'export nucléaire NES situé entre ses résidus 233 et 242, dans sa partie C-terminale (Tomoda, et al., 2002; Wei and Deng, 2003). Grâce à ce NES, CSN5 permet la translocation du noyau vers le cytoplasme de nombreuses protéines comme p27^{Kip1} et p53 *via* la protéine du pore nucléaire CRM1 (Tomoda, et al., 2002). Ces protéines sont ensuite poly-ubiquitinées, souvent par des complexes SCF, puis dégradées par le protéasome (Kim, et al., 2004; Oh, et al., 2006a; Oh, et al., 2006b; Tomoda, et al., 1999). La dégradation de ces protéines permet de maintenir une prolifération et une homéostasie normale des cellules.

Les motifs JAMM et NES expliquent une partie des fonctions de CSN5. Cependant, les domaines responsables de nombreuses interactions de CSN5 avec d'autres protéines (Figure 36) et les mécanismes dirigeant de nombreuses fonctions, comme l'implication dans le COP9 signalosome ou les petits complexes, restent à déterminer (Shackleford and Claret, 2010).

2. Le signalosome, les subcomplexes et la forme monomérique

Le **COP9 signalosome CSN** (ou COPS9) est un complexe protéique de 450-550 kDa dont la principale fonction est la régulation de la dégradation de certaines protéines par la voie ubiquitine-protéasome, et qui est conservé de la plante aux mammifères (Wei, et al., 2008). Il est localisé principalement dans le noyau et dans la région périnucléaire des cellules eucaryotes (Bech-Otschir, et al., 2002; Naumann, et al., 1999), mais a également été observé récemment au niveau du centrosome (Peth, et al., 2007b).

Le modèle archétype de cet holocomplexe CSN comprend huit sous-unités, dont six possèdent un domaine PCI (*Proteasome COP9, Initiation factor 3* ou PINT) (CSN1,2,3,4,7a,7b,8) et deux un domaine MPN (CSN5 et 6) (Figure 37) (Wei and Deng, 2003). Ces domaines PCI et MPN sont aussi retrouvés dans des composants du « couvercle » subcomplexe du protéasome 26S et dans le complexe d'initiation de la traduction eucaryotique eIF3. En parallèle de leur similitude structurale, le couvercle et le CSN présentent tous deux une activité métallo-isopeptidase, qui clive les conjugués de l'ubiquitine ou de l'ubiquitine-like (Nedd8) (Cope, et al., 2002).

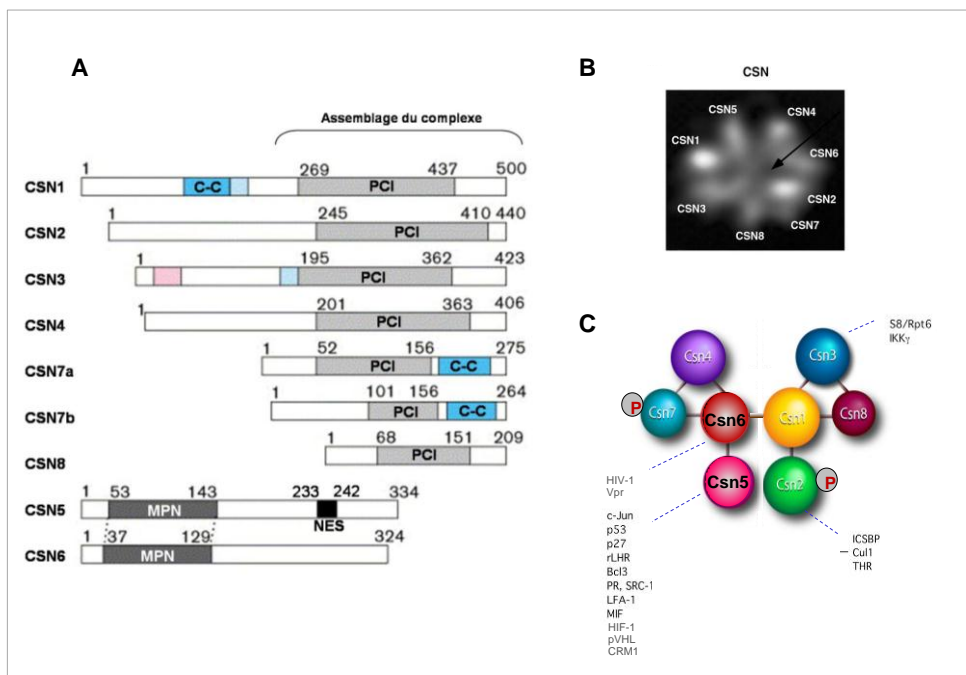


Figure 37. Structure du COPS9 signalosome. (A) Les différentes sous-unités du signalosome (Wei et al, 1998). (B) Structure du signalosome en microscopie électronique (Beth-Otschir et al, 2002). (C) Topologie du COP9 signalosome. Les interactions entre les différentes sous-unités, établies par spectrométrie de masse, sont indiquées par des traits pleins. Les lignes pointillées indiquent des interactions avec d'autres protéines décrites dans la littérature (d'après Sharon et al, 2009).

D'après des études de structure bioinformatiques récentes, le domaine PCI consisterait en deux sous domaines : un domaine TPR-like ou HEAT, habituellement impliqué dans les interactions

protéine-protéine, et un domaine « winged helix like », retrouvé dans des protéines liant l'ADN ou l'ARN (Scheel and Hofmann, 2005; Zhou, et al., 2005), ce qui permet de penser que le CSN pourrait lier les acides nucléiques. Ces deux sous domaines ne possèdent pas d'activité catalytique, mais ils sont impliqués dans les interactions avec les autres protéines contenant des PCI, et fonctionnent donc probablement comme des régions d'échafaudage pour la liaison au CSN d'autres partenaires protéiques.

CSN5 fait figure d'exception parmi les sous unités du signalosome. En effet, elle est la seule contenant un motif JAMM et fonctionne donc comme le centre catalytique du signalosome CSN pour son activité déneddylase (Wei, et al., 2008). Par ailleurs, si les six autres sous unité du CSN sont plus stables *in vivo* au sein de l'holocomplexe par rapport à l'état de monomère, CSN5 et CSN2 existent stablement en dehors du CSN (Gusmaroli, et al., 2007).

En plus de l'holocomplexe CSN de 450 kDa, il existe en faible proportion des petits complexes variés ou **subcomplexes** de 40 à 450 kDa formés par des sous unités du CSN, ou par CSN5 et d'autres protéines, à localisation principalement cytoplasmique (Fukumoto, et al., 2005; Tomoda, et al., 2005; Tomoda, et al., 2002). Ces subcomplexes, aussi appelés mini-complexes ou JACS (*Jab1 Containing Small complex*) seraient formés à partir du CSN et exportés dans le cytoplasme grâce à la séquence NES de CSN5, exportant également d'autres protéines partenaires (Tomoda, et al., 2002). Le plus étudié d'entre eux, constitué des sous-unités CSN4 à CSN8, participe à la régulation de la protéine p27^{Kip1} impliquée dans le cycle cellulaire (Fukumoto, et al., 2004; Tomoda, et al., 2005; Tomoda, et al., 2002; Tomoda, et al., 2004). Ces subcomplexes sont actuellement encore mal définis en termes de composition et de quantité. Des variations de la quantité des JACS selon les étapes du cycle cellulaire et en réponse à la densité ou à l'état de transformation cellulaire ont été décrites, laissant penser que ces petits complexes sont biologiquement actifs (Fukumoto, et al., 2005; Tomoda, et al., 2005).

Dans la cellule, CSN5 est également retrouvé sous forme de **monomère**. Ces formes libres de CSN5 sont cytoplasmiques et nucléaires, une fraction pouvant être localisée à la membrane plasmique ou à celle du réticulum endoplasmique (Tomoda, et al., 2002). C'est la fraction la plus sensible aux expériences de surexpression/extinction. En effet, la surexpression transitoire de CSN5 dans les cellules en culture entraîne une augmentation des formes monomériques ou de son inclusion dans les petits complexes de 100 kDa avec peu d'effets sur le taux d'holocomplexe CSN

(450kD) (Naumann, et al., 1999; Tomoda, et al., 2002), tandis que l'extinction de CSN5 déplete en majorité la fraction monomérique, beaucoup plus que le CSN (Cope and Deshaies, 2006; Peth, et al., 2007a; Tanguy, et al., 2008; Tomoda, et al., 2005).

La fonction de ces formes monomérique reste à élucider. Si certains travaux ont pu laisser penser que le monomère pouvait par exemple être responsable de l'activation transcriptionnelle du facteur AP-1 par CSN5 (la surexpression seule de Jab1 suffit à stabiliser l'interaction d'AP-1 (c-Jun) avec la chromatine) (Claret, et al., 1996), il apparaît maintenant que cette action est également médiée par une kinase associée à CSN1 et CSN5 (Naumann, et al., 1999). Il a également été montré que c-Jun co-précipite avec les JACS (Tomoda, et al., 2002).

3. Fonctions connues de CSN5

3.1. Activité isopeptidase : déneddylase et dé-ubiquitinase

Activité déneddylase

L'activité d'ubiquitination de des complexes SCF - E3 ubiquitine ligases est augmentée par la neddylation de leur sous-unité culline, c'est-à-dire l'addition post-traductionnelle de NEDD8/RUB1 (*Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated 8/Related to Ubiquitin 1*), une petite protéine ubiquitine-like (Pan, et al., 2004). Afin de maintenir une activité optimale des complexes SCF, les cellules alternent des étapes de neddylation et de déneddylation de la culline (Schwechheimer, et al., 2001) (Figure 38). Le clivage de la liaison peptidique entre l'extrémité C-terminale de Nedd8 et le groupement ϵ -amino d'une lysine de la culline est permise par l'activité métallo-peptidase du domaine JAMM de CSN5, uniquement dans le contexte du signalosome (Cope, et al., 2002; Lyapina, et al., 2001). En servant de point d'ancrage pour un grand nombre de protéines, le signalosome permet de les rapprocher des complexes SCF qui vont les cibler vers la dégradation par la voie Ubiquitine-Protéasome (Chamovitz and Glickman, 2002).

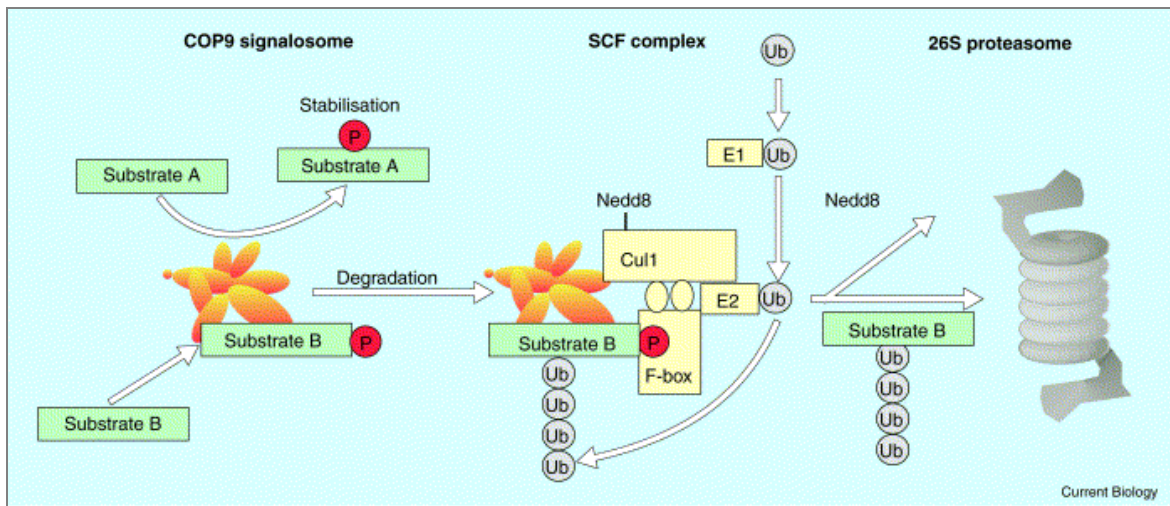


Figure 38. Modèle spéculatif pour la façon dont les activités de phosphorylation et de déneddylation associent le signalosome au protéasome *via* l'ubiquitination de substrat par le SCF. (Seeger 2001).

Activité dé-ubiquitinase

Le signalosome est responsable du clivage de l'ubiquitine et régule ainsi l'activité et la stabilité de certaines protéines (Wei and Deng, 2003; Wolf, et al., 2003). Les **mono-ubiquitinations** sont clivées par CSN5, comme c'est le cas pour l'enzyme de réparation de l'ADN Cul4 ou la protéine hsp70 (Groisman, et al., 2003). La dé-ubiquitination de hsp70 et probablement d'autres protéines composant certains exosomes pourrait participer à la régulation de l'exocytose de protéines spécifiques (Liu, et al., 2009). Le clivage des **poly-ubiquitinations** est réalisé par des isopeptidases s'associant au CSN, comme les protéines Ubp12/USP15 (Hetfeld, et al., 2005; Zhou, et al., 2003). Ce mécanisme permet notamment de réguler l'activité des complexes SCF ubiquitine ligase par un autre mécanisme que la déneddylation, (i) en limitant l'auto-ubiquitination de leurs sous-unités F-box reconnaissant les substrats et donc en prolongeant l'action des complexes SCF (Cope and Deshaies, 2006; Schweitzer, et al., 2007; Wee, et al., 2005), (ii) en limitant l'ubiquitination des substrats des SCF, empêchant ainsi leur dégradation (Petroski and Deshaies, 2005; Wu, et al., 2006a).

3.2. Couplage aux kinases/phosphatases

Une des premières fonctions identifiées du signalosome dans les cellules de mammifères était la régulation de la phosphorylation des substrats de la voie ubiquitine-protéasome par le biais de kinases associées au CSN (Naumann, et al., 1999; Seeger, et al., 1998; Wei and Deng, 2003). Actuellement les protéines kinases identifiées sont au nombre de 4: l'Inositol 1,3,4-triphosphate 5/6

kinase, la Caséine Kinase 2 (CK2), la Protéine Kinase D (PKD), et le complexe régulateur IκB kinase 2 de la voie NF-κB (Tableau 6).

Ces kinases agissent sur certains régulateurs cruciaux de la transcription, et de nombreux effets du CSN peuvent être associés à cette activité (pour revue (Harari-Steinberg and Chamovitz, 2004)). Elles sont notamment responsables de la stabilisation par phosphorylation de c-Jun (Seeger, et al., 1998) et de la déstabilisation de p53, p27, IκBα et p105 (NF-κB) qui sont alors dirigées vers la dégradation par la voie Ubiquitine-Protéasome (Bech-Otschir, et al., 2001; Tomoda, et al., 1999).

Protéine kinase associée au signalosome	Sous-unité(s) associée(s)	Références
Inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase (ITPK1)	CSN1	(Sun, et al., 2002; Wilson, et al., 2001)
Caséine Kinase 2 (CK2)	CSN3, CSN7	(Uhle, et al., 2003)
Protéine Kinase D (PKD)	CSN7	(Uhle, et al., 2003)
IκB kinase 2 (IKK2)	CSN5, CSN7	(Orel, et al., 2009)

Tableau 6. Les différentes kinases associées au signalosome.

3.3. Régulation de la localisation subcellulaire des protéines

Au niveau subcellulaire, CSN5 est une protéine à double distribution, cytoplasmique et nucléaire, dont la localisation varie selon qu'elle est sous forme libre, dans les mini-complexes ou dans le CSN (Tomoda, et al., 1999).

Le signalosome CSN et les subcomplexes ont un rôle encore mal connu dans la régulation de la localisation subcellulaire de molécules de signalisation. Ils peuvent lier un grand nombre de protéines, et, en réponse à différents *stimuli* intra- ou extracellulaires, entraîner la translocation de substrats nucléaires vers le cytoplasme. Parmi ces protéines, on peut citer le régulateur du cycle cellulaire p27^{Kip1}, les protéines suppresseurs de tumeur p53, Smad4 ou Smad7 ou encore RUNX3 (Kim, et al., 2009; Oh, et al., 2006a; Schwechheimer and Deng, 2001; Tomoda, et al., 2002). Cet export se fait *via* la protéine du pore nucléaire CRM1 (export leptomycine B sensible), qui interagit avec la séquence NES de CSN5 (Tomoda, et al., 2002). Les protéines exportées peuvent ensuite être poly-ubiquitinées par les complexes SCF puis dégradées par le protéasome, ce qui permet de maintenir une prolifération et une homéostasie normale des cellules (Wei, et al., 2008).

3.4. Co-activation/co-répression transcriptionnelle

Le CSN avait tout d'abord été décrit comme un répresseur transcriptionnel chez *Arabidopsis* (Wei and Deng, 1992), même si les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus. Chez les mammifères, CSN5 a tout d'abord été identifié comme co-activateur de c-Jun, un membre de la famille AP-1 (Claret, et al., 1996). Jab1 interagit avec les sous-unités c-Jun et JunD, du facteur dimérique AP-1, et en phosphorylant c-Jun, le stabilise sur sa séquence au niveau de la chromatine et potentialise son activité de transactivation (Seeger, et al., 1998). L'enzyme responsable de cette phosphorylation, la Inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase, est liée au CSN *via* CSN1 (Sun, et al., 2002; Wilson, et al., 2001). Le CSN, par un effet indirect sur la stabilité des protéines, a également été décrit comme co-activateur de MYC impliqué dans l'activation transcriptionnelle de gènes impliqués dans la prolifération, l'angiogenèse et l'invasion cellulaire (Figure 39) (Adler, et al., 2006; Bae, et al., 2002; Lee, et al., 2011).

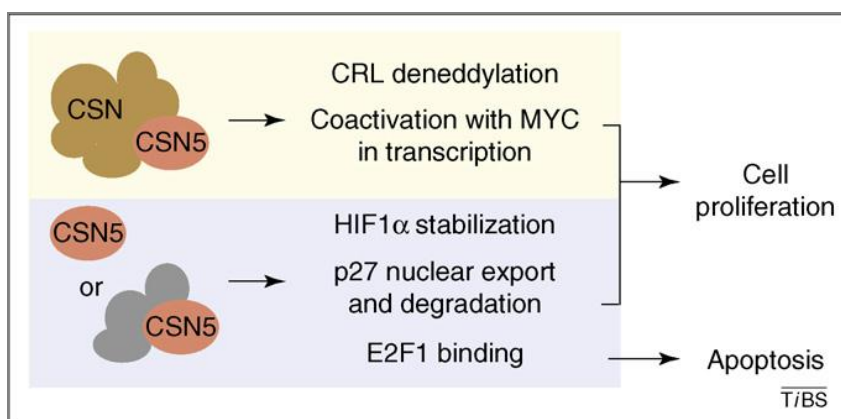


Figure 39. Les différents complexes contenant CSN5 et leurs fonctions spécifiques. L'holocomplexe CSN (marron) a une activité de déneddylase et collabore avec MYC pour l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles. Le monomère CSN5 (rouge) ou les petits complexes contenant CSN5 (gris) sont responsables de la stabilisation de HIF1- α , de l'export nucléaire et de la dégradation de p27 et de l'apoptose médiée par E2F1. La combinaison des fonctions spécifiques de CSN5 avec celles du signalosome rend cette protéine importante pour les voies de prolifération cellulaire et d'apoptose. D'après (Wei, et al., 2008)

CSN5 apparaît donc comme un régulateur indirect de la transcription, en modulant la stabilité de facteurs *trans*. Cependant, même si aucune étude ne le montre clairement, un rôle plus direct ne peut néanmoins pas être éliminé. En effet, 3 études avaient montré que les protéines à domaine PCI du CSN peuvent s'associer à la chromatine (Groisman, et al., 2003; Menon, et al., 2007; Ullah, et al., 2007). Par ailleurs, l'étude cristallographique récente de CSN7 montre dans le site MPI, partagé avec 5 autres sous unités du CSN, un motif hélice-boucle-hélice capable de lier l'ADN (Dessau, et al., 2008).

4. CSN5 et voie AP-1

La régulation de la voie AP-1 est un des premiers systèmes dans lequel CSN5 a été impliqué chez les mammifères. En effet, la surexpression de Jab1/CSN5 permet la stabilisation sélective de l'interaction des sous-unités c-Jun et JunD du facteur transcription AP-1 (Fos/Jun) avec la chromatine et l'augmentation de leur pouvoir transactivateur sur leurs gènes cibles (Claret, et al., 1996). Il n'est pas clair si CSN5 monomérique pourrait être responsable d'une partie de cet effet, mais il est certain que CSN5/CSN y participe. En effet, le CSN est connu pour s'associer à des kinases telles que CK2, PKD et ITPK1 qui sont capables de phosphoryler c-Jun (Seeger, et al., 1998; Uhle, et al., 2003; Wilson, et al., 2001). En se liant aux dimères de protéines c-Jun et JunD, CSN5/CSN favorise la phosphorylation et donc l'activation de c-Jun, ce qui a pour effet d'augmenter et de stabiliser la liaison du complexe sur les sites AP-1 (Seeger, et al., 1998; Wilson, et al., 2001).

5. CSN5 et voie NF- κ B

Pour mémoire, lors de différents stimuli l'inhibiteur cytoplasmique de la voie NF- κ B I κ B α est phosphorylé par la sous-unité IKK2 du complexe IKK (IKK1/IKK2/NEMO). Il est ensuite ubiquitiné et dégradé par le protéasome, libérant le dimère NF- κ B capable alors de transloquer dans le noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles, parmi lesquels I κ B α lui-même, dans une boucle d'autorégulation (chapitre I.1, page43).

CSN5 apparaît comme un régulateur de la voie NF- κ B au travers du signalosome. Le rôle du CSN (*via* ses kinases associées) dans la phosphorylation des inhibiteurs cytoplasmiques I κ B α et p105-NF- κ B de la voie NF- κ B avait déjà été rapporté. Cependant l'implication de cette phosphorylation sur l'activité transcriptionnelle de NF- κ B n'avait pas été étudiée (Seeger, et al., 1998). Quelques études ont montré récemment que CSN5/CSN est globalement un régulateur négatif constitutif de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, par un mécanisme dépendant du motif JAMM/MPN+ de CSN5 (Hong, et al., 2001; Orel, et al., 2009) selon des mécanismes d'interactions complexes avec I κ B α et les IKK (Harari-Steinberg, et al., 2007; Orel, et al., 2009; Schweitzer, et al., 2007).

Des études de co-immunoprécipitation montrent l'interaction transitoire entre le CSN, le complexe IKK et le complexe SCF ubiquitine ligase en condition basale (Orel, et al., 2009), et entre I κ B α et le CSN sous stimulation par le TNF α (Schweitzer, et al., 2007). D'après les données récentes de la littérature, le modèle suivant expliquerait pourquoi CSN5/CSN permettrait une résolution rapide de la cascade NF- κ B (Figure 40). Au niveau basal, le CSN forme un complexe avec IKK et SCF^{BTRCP}, empêchant la phosphorylation et l'ubiquitination d'I κ B α , et inhibant ainsi l'activité de NF- κ B (Orel, et al., 2009). La stimulation par le TNF α entraîne une activation des kinases IKK qui

phosphorylent CSN5 et se dissocient du complexe IKK/CSN/SCF. IκBα est alors rapidement phosphorylé par IKK, ubiquitiné par SCF^{βTRCP} et dégradé par le protéasome (Karin and Ben-Neriah, 2000; Orel, et al., 2009). CSN5 est lui aussi phosphorylé par IKK puis ubiquitiné et dégradé, ce qui permet d'activer le complexe SCF (Chang and Schwechheimer, 2004; Orel, et al., 2009). Le dimère NF-κB transloque dans le noyau où il active la transcription de ses gènes cibles, parmi lesquels IκBα. Le CSN est également responsable, par une kinase associée, de la phosphorylation de p105 qui va subir une protéolyse ménagée de son domaine C-terminal, produisant la protéine p50 active (Seeger, et al., 1998). Ce phénomène permet donc une activation rapide de la voie NF-κB. Lors d'une stimulation persistante, le CSN en réponse à des signaux qui restent encore à identifier, permet une terminaison rapide de la réponse inflammatoire. La formation d'un complexe phospho-IκBα /CSN permet la dé-ubiquitination de IκBα par l'isopeptidase USP15 associée au CSN, et donc la prévention de sa dégradation par le protéasome (Hetfeld, et al., 2005; Schweitzer, et al., 2007).

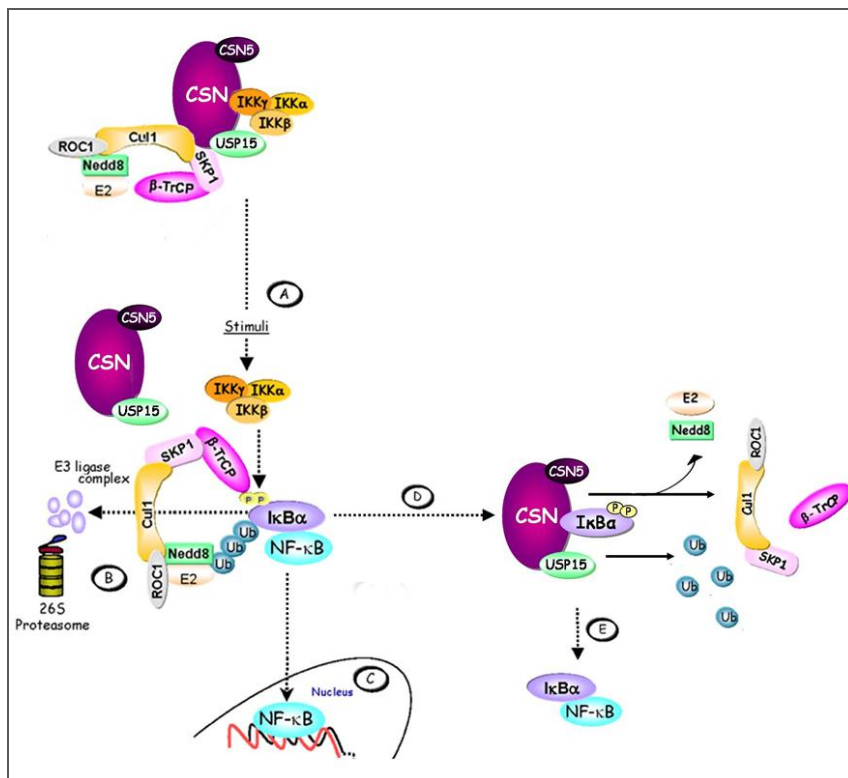


Figure 40. Implication du signalosome dans la régulation de la voie NF-κB. Au niveau basal, le CSN forme un complexe avec le complexe IKK et le complexe SCF. **A)** Différents *stimuli* entraînent la dissociation du complexe. Le complexe IKK phosphoryle IκBα, qui est alors reconnu comme substrat par β-TRCP activé par la neddylation de Cul-1. **B)** Dégradation d'IκBα par le système ubiquitine-protéasome. **C)** Translocation nucléaire de NF-κB qui va activer certains gènes, notamment IκBα. **D)** Lors d'une stimulation persistante, IκBα re-synthétisé est phosphorylé dans le cytosol pour un nouveau cycle. Ceci peut-être limité par la déneddylation de Cul-1 par CSN5. De plus, IκBα est dé-ubiquitiné par USP15. **E)** IκBα peut se réassocier à NF-κB. Adapté de (Schweitzer, et al., 2007). E2 : Ubiquitine Conjugase , Ub : Ubiquitine, P : Phosphorylation.

Cependant, cet effet anti-inflammatoire de CSN5/CSN dépend du contexte cellulaire. En effet, les études mécanistiques résumées ici ont été réalisées dans des lignées HeLa transitoires (Schweitzer, et al., 2007), des lignées HEK transitoires et stables (Orel, et al., 2009). D'autres études sont en faveur d'un effet plutôt pro-inflammatoire de CSN5/CSN : en effet la perte de Jab1 a été décrite comme diminuant l'activité NF- κ B dans les thymocytes de souris *csn5*^{-/-} (Panattoni, et al., 2008), dans les fibroblastes de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Wang, et al., 2006) dans les lignées d'hépatocarcinome Huh7 et HepG2 (Lee, et al., 2011).

6. CSN5 et HIF-1

Le facteur de transcription HIF de réponse à l'hypoxie est un dimère HIF- α /HIF- β dont la stabilité est oxygène-dépendante. En situation normoxique, HIF-1 α est rapidement hydroxylé, puis reconnu par l'inhibiteur pVHL (protéine von Hippel Lindau) couplé à une ubiquitine ligase, et enfin dégradé (cf chapitre 1.5, page 71). En conditions hypoxiques, l'activité de HIF-1 est notablement régulée par p53 qui se lie à HIF-1 α et entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Ravi, et al., 2000).

CSN5 interagit avec la voie HIF-1 à la fois au sein du CSN, et indépendamment du CSN, et cette action se traduit *in fine* par une augmentation de la stabilité de HIF-1 α et de l'activité transcriptionnelle de HIF-1, et de l'expression de certains gènes cibles comme VEGF (Bemis, et al., 2004; Mikus and Zundel, 2005).

Le signalosome est liée de manière constitutive à la protéine pVHL, en conditions normoxique et hypoxique, et peut permettre, par l'alternance entre neddylation et déneddylation, d'activer l'ubiquitine ligase responsable de la dégradation de HIF1 α (Bemis, et al., 2004; Miyauchi, et al., 2008). En cas d'hypoxie, CSN5 interagit également avec HIF-1 α de manière transitoire et le protège de l'hydroxylation, et donc de la dégradation (Bae, et al., 2002; Bemis, et al., 2004). Ce phénomène, conservé lorsque le motif JAMM est muté, n'étant pas reproduit avec CSN6 ou le paralogue Rpn11, cette stabilisation serait due à CSN5 indépendamment du CSN. Cette stabilisation de HIF-1 α est au moins partiellement indépendante de p53, puisqu'elle existe à une pO₂ (1-17% O₂) supérieure à la pO₂ permettant la stabilisation hypoxique de p53 (0-0,1% O₂) (Bemis, et al., 2004). Cependant, en cas d'hypoxie sévère, on ne peut éliminer un effet stabilisateur de HIF-1 α par CSN5 médié par p53 : en effet, p53 est une cible connue du signalosome qui provoque sa dégradation, et donc diminuerait son effet inhibiteur de HIF-1 (Bae, et al., 2002; Bech-Otschir, et al., 2001).

7. CSN5 dans le contexte de la mucoviscidose

CSN5 a été identifié dans notre laboratoire comme un nouveau partenaire de la protéine CFTR, par un crible de double-hybride de levure (Tanguy, et al., 2008). CSN5 permettrait de réguler la dégradation des protéines CFTR anormales à un stade précoce de leur maturation. En effet, elle participe à la dégradation de CFTR-F508del, en faisant intervenir les kinases liées au signalosome, sans augmenter la dégradation de CFTR-wt. CSN5 existe sous différentes formes dans les cellules (signalosome, mini-complexes ou monomères) ayant chacune des localisations différentes (Tomoda, et al., 2002). La forme interagissant avec la forme core-glycosylée de CFTR reste encore à déterminer. Nous avons observé que la protéine était exprimée dans le noyau et le cytoplasme des cellules exprimant CFTR. Lorsque CSN5 est surexprimée en présence de CFTR-F508del et non de CFTR-wt, la localisation de CSN5 est plus marquée dans le noyau et la région périnucléaire. Par ailleurs, l'inhibition des kinases associées au signalosome permettaient la stabilisation de CFTR de maturité intermédiaire. Ceci semble apporter un indice de l'implication du signalosome, ce complexe conduisant alors la protéine CFTR mal repliée vers la voie de dégradation Ubiquitine-Protéasome.

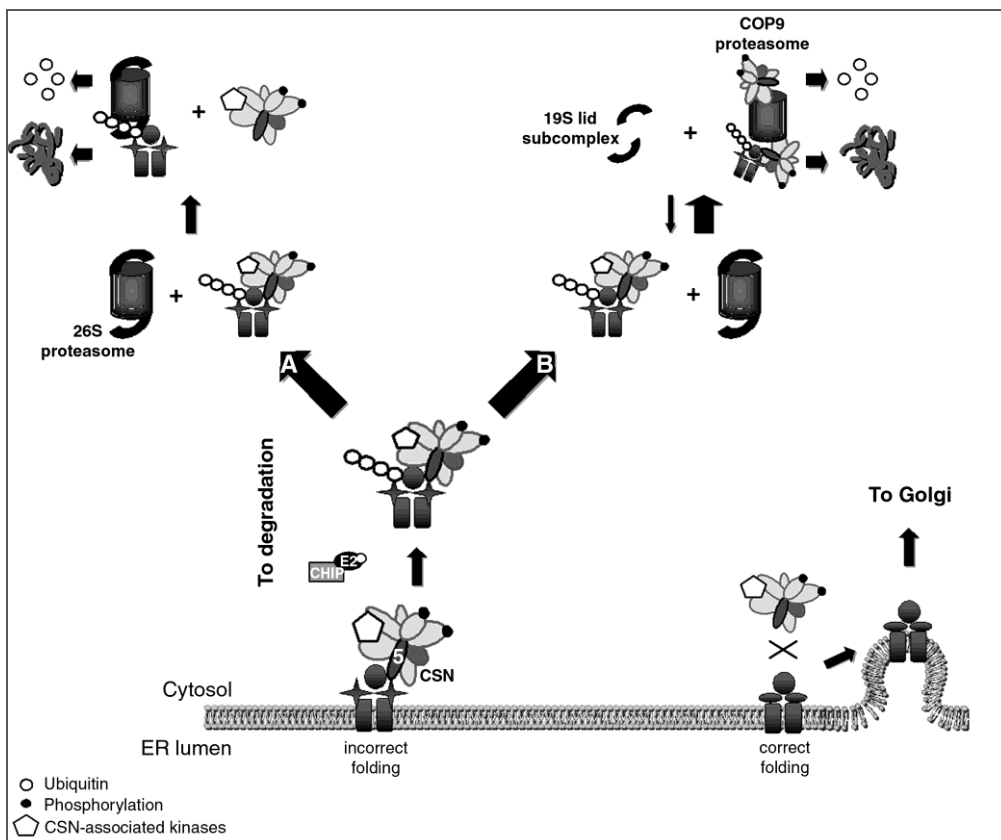


Figure 41. Modèle de dégradation de la forme mal repliée de CFTR *via* le signalosome.

Le signalosome et le protéasome 19S sont non seulement apparentés structurellement mais aussi fonctionnellement, une de leur fonction étant l'élimination de NEDD8 et de l'ubiquitine de leurs protéines cibles, respectivement (Chang and Schwechheimer, 2004). Le signalosome a été identifié comme une plate-forme d'assemblage des complexes SCF mais il a été également suggéré que le signalosome pouvait remplacer le couvercle du protéasome et ainsi favoriser la dégradation de substrats spécifiques (Huang, et al., 2005; Schwechheimer, 2004). Nous avons donc proposé une nouvelle voie de dégradation de la protéine *via* l'interaction de CFTR avec CSN5 et le signalosome. CSN5 peut donc soit diriger la protéine vers la voie Ubiquitine-Protéasome, soit de manière alternative entraîner le remplacement du couvercle du protéasome par le complexe CSN pour dégrader la protéine CFTR mal repliée (Figure 41).

En plus de son action de régulation de la dégradation des formes mal repliées de la protéine CFTR, CSN5 est capable de réguler la voie AP-1 et la voie NF- κ B qui sont anormalement activées dans la mucoviscidose, et de potentialiser la voie HIF-1. Toutes ces actions, pléiotropes telles celles régulées par COMMD1, nous conduisent à considérer que l'étude de l'une et l'autre de ces deux protéines est pertinente dans le contexte cellulaire de la mucoviscidose.

Problématique

But de l'étude

La mucoviscidose est une maladie caractérisée par une grande variabilité génotypique et phénotypique. La connaissance et la compréhension des évènements moléculaires à l'origine des anomalies de *CFTR* chez les patients, tant pour les formes sévères que pour les formes plus modérées, est un enjeu majeur à la fois pour le conseil génétique aux patients et pour orienter les axes de recherches d'un point de vue mécanistique puis à plus long terme thérapeutique (Figure 42).

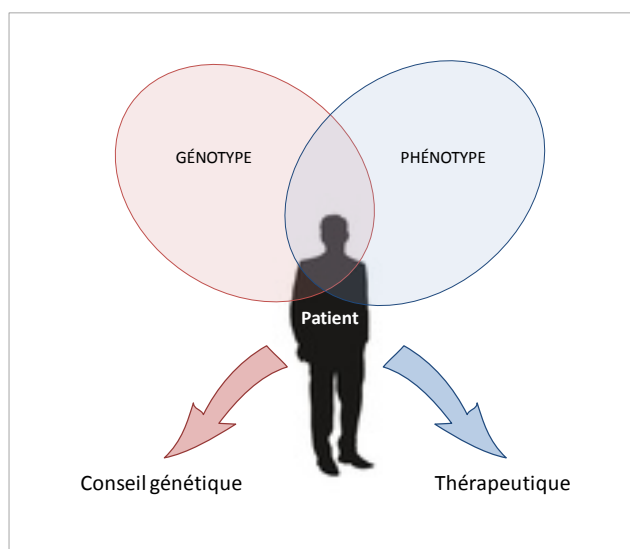


Figure 42. La corrélation génotype-phénotype améliore la prise en charge des patients

Ma position d'assistante hospitalo-universitaire, à l'interface entre le laboratoire de diagnostic moléculaire de l'AP-HP et l'unité de recherche INSERM m'a tout naturellement portée à m'investir dans l'amélioration des connaissances sur la relation génotype-phénotype. De manière indépendante, je me suis également intéressée à la caractéristique phénotypique mise en cause dans la survie des patients atteints de la mucoviscidose, qui est l'inflammation pulmonaire.

Le diagnostic prénatal de mucoviscidose peut-être évoqué devant des anomalies digestives fœtales observables aux échographies de routine du 2^{ème} ou du 3^{ème} trimestre. L'analyse moléculaire du gène *CFTR* permet alors de confirmer ou d'infirmer le diagnostic. En fonction des études, qui diffèrent notamment en termes d'analyse moléculaire et d'anomalies échographiques prises en compte, le risque que le fœtus soit atteint de la maladie est très variable. Afin d'améliorer la prise en

charge de ces patients, tant au niveau de l'analyse moléculaire qu'au niveau de l'évaluation des risques et du conseil génétique qui en découlent, nous avons réalisé une étude rétrospective de tous les dossiers de patients adressés entre 1992 et 2010 pour « suspicion échographique » de mucoviscidose. La corrélation génotype – phénotype qui en résultait montrait dans cette cohorte de patients une grande fréquence de larges réarrangements du gène *CFTR*, et des profils d'anomalies digestives particuliers.

Certains phénotypes ne sont pas expliqués par l'analyse moléculaire, soit parce que les deux anomalies du gène *CFTR* ne sont pas identifiées, soit parce que la forme clinique est atypique en regard des mutations retrouvées. Ces cas atypiques peuvent parfois être expliqués par des mutations introniques ou situées dans le promoteur, causant des anomalies d'épissage ou de régulation de l'expression génique. Dans un contexte de mise en place du diagnostic de l'étude de l'ARNm de *CFTR*, je me suis attachée à créer les outils nécessaires à l'exploration du promoteur de ce gène, afin d'identifier de manière fonctionnelle chez les patients des défauts de régulation.

Une des caractéristiques phénotypiques de la mucoviscidose est la réponse inflammatoire anormale au niveau pulmonaire, qui participe au syndrome obstructif et mène progressivement à la destruction du tissu. Diminuer efficacement cette inflammation exacerbée fait partie des défis en matière de recherche thérapeutique. L'identification de *COMMD1* et *CSN5*, deux partenaires de *CFTR*, également agents anti-inflammatoires, a conduit à l'étude de leur influence sur la régulation génique mise en jeu dans l'inflammation, dans des modèles de cellules épithéliales bronchiques.

L'ensemble de ces travaux, plaçant le patient au centre de la thématique de recherche, a pour objectif de mieux comprendre les caractéristiques phénotypiques liées au génotype, afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose.

RESULTATS

- 1^{ère} partie :** *Suspicion échographique de mucoviscidose :
Ré-évaluation et appréciation du risque de mucoviscidose foetale
en fonction du profil d'anomalies digestives*
- 2^{ème} partie :** *Mise en place des outils d'étude du promoteur CFTR*
- 3^{ème} partie :** *Contributions à l'étude de COMMD1 et de CSN5 en tant que
régulateurs de l'inflammation dans le contexte de la
mucoviscidose*

1^{ère} partie

Suspicion échographique de mucoviscidose :

***Ré-évaluation et appréciation du risque de mucoviscidose
fœtale en fonction du profil d'anomalies digestives***

A l'occasion des échographies de routine du deuxième et du troisième trimestre, des anomalies digestives peuvent être détectées chez le fœtus. L'hyperéchogénicité intestinale, observée dans 0,1 à 1,8 % des grossesses selon les études est caractérisée par une densité égale ou supérieure à celle de l'os (Penna and Bower, 2000; Scotet, et al., 2002; Simon-Bouy, et al., 2003). Elle peut être un variant bénin ou bien le signe d'une pathologie sous-jacente, comme des anomalies chromosomiques, des infections virales, ou bien la mucoviscidose. Bien que moins documentées dans le cadre de la mucoviscidose, les dilations des anses de l'intestin grêle signent en général une obstruction digestive, dont la péritonite méconiale peut être responsable, et ont été observées à l'état isolée chez quelques fœtus atteints (Corteville, et al., 1996; Muller, et al., 2002).

Environ 11% des fœtus atteints de mucoviscidose présentent des signes échographiques (Scotet, et al., 2010). L'hyperéchogénicité et les dilatations digestives peuvent être isolées, associées entre elles ou à d'autres signes comme des anomalies de la vésicule biliaire. En cas de telles anomalies digestives fœtales, le risque de mucoviscidose est évalué entre 0,8 et 7,6% selon les études, assez disparates en termes de signes échographiques considérés et d'étendue de l'étude moléculaire du gène *CFTR* (Berlin, et al., 1999; Ghose, et al., 2000; Scotet, et al., 2010; Simon-Bouy, et al., 2003). Dans notre laboratoire, d'après les recommandations européennes, les résultats d'analyse moléculaire en routine diagnostique sont rendus avec un calcul du risque résiduel que le fœtus soit atteint de mucoviscidose. Pour réaliser ce calcul, nous considérons jusqu'à présent le chiffre de 3% de risque *a priori* avant étude de *CFTR*, d'après les résultats d'une large étude collaborative française (Simon-Bouy, et al., 2003). Cependant, cette étude française était très hétérogène sur le plan des analyses moléculaires réalisées, et la sensibilité des outils diagnostics s'est améliorée depuis, notamment avec la mise en place de la recherche de grands réarrangements (Audrezet, et al., 2004; Niel, et al., 2004).

Les demandes d'analyse moléculaire du gène *CFTR* chez des couples suite à l'observation d'anomalies digestives chez leur fœtus ont augmenté ces dernières années dans notre laboratoire (augmentation d'environ 30% entre 2007 et 2008) (Figure 43). Si le plus souvent, les demandes remplissaient les indications des recommandations françaises et européennes, quelques unes ne semblaient pas justifiées (faible hyperéchogénicité, ou calcifications digestives isolées par exemple). En tant que laboratoire de référence, nous recevons des demandes émanant de services hospitaliers très divers, de différentes régions de France, et de laboratoires de niveau 1, suite à des échographies réalisées par des praticiens n'ayant pas toujours l'expertise dans les images échographiques évocatrices de mucoviscidose.

Par une étude rétrospective sur une période de 18 ans (1992-2000), nous souhaitons ré-évaluer le risque de mucoviscidose sur signes d'appel échographique dans notre population, toutes origines géographiques confondues, et évaluer la puissance diagnostique des différentes anomalies digestives fœtales observées.

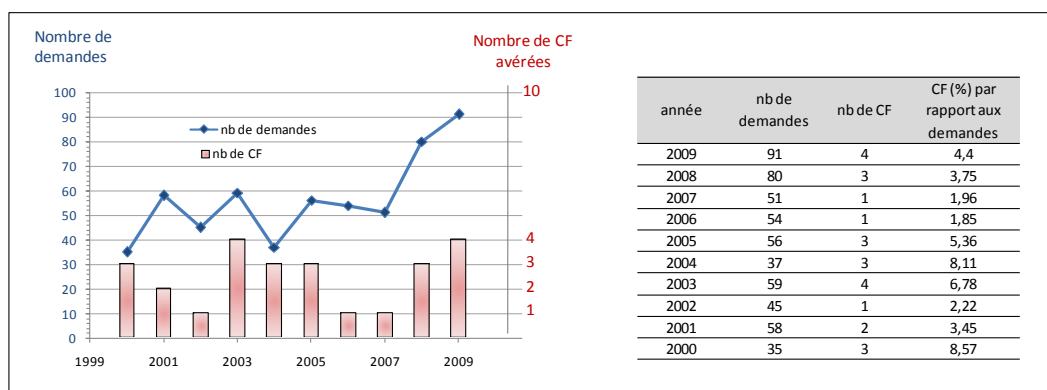


Figure 43. Evolution du nombre d'analyses sur signe d'appel échographique et du nombre de cas diagnostiqués sur une période de 10 ans (2000-2009) dans notre laboratoire. L'évolution du nombre de demandes est représentée par la courbe bleue, et le nombre de fœtus atteints de mucoviscidose parmi ces patients par un histogramme rose.

Le premier article présenté ici est un « case report », décrivant 5 patients diagnostiqués sur signes d'appel échographiques, chez lesquels nous avons identifié de larges réarrangements du gène *CFTR*. Il fait état de la nécessité de rechercher ce type de mutations en cas d'anomalies digestives fœtales, les grands remaniements ayant représenté alors en tout 11% des mutations sévères détectées dans la cohorte des fœtus atteints présentant des anomalies digestives.

Le deuxième article, écrit quelques mois plus tard, décrit l'ensemble des résultats de l'étude rétrospective de 694 cas de suspicion échographique de mucoviscidose (1992-2009), et permet d'évaluer l'importance diagnostique des différents signes digestifs fœtaux. La puissance de ces signes a été évaluée par un score (« likelihood ratio » ou LR), qui objective l'importance de prendre en considération les associations de signes, notamment la « triade » hyperéchogénicité intestinale/dilatations digestives/non visualisation de la vésicule biliaire.



SHORT REPORT

Notable contribution of large *CFTR* gene rearrangements to the diagnosis of cystic fibrosis in fetuses with bowel anomalies

Alix de Becelevre¹, Catherine Costa¹, Annick LeFloch¹, Marie Legendre¹, Jean-Marie Jouannic², Jacqueline Vigneron³, Jean-Luc Bresson⁴, Stéphanie Gobin⁵, Josiane Martin¹, Michel Goossens¹ and Emmanuelle Girodon^{1,*}

Grade III fetal bowel hyperechogenicity and/or loop dilatation observed at the second trimester of pregnancy can be due to several disease conditions, including cystic fibrosis (CF). Screening for frequent CF mutations is performed as a first step and, in certain situations, such as when a frequent CF mutation is found in the fetus, the increased risk of CF justifies an in-depth study of the second allele. To determine the contribution of large *CFTR* gene rearrangements in such cases, detected using a semiquantitative fluorescent multiplex PCR (QFM-PCR) assay, we collated data on 669 referrals related to suspicion of CF in fetuses from 1998 to 2009. Deletions were found in 5/70 cases in which QFM-PCR was applied, *dele19*, *dele22_23*, *dele2_6b*, *dele14b_15* and *dele6a_6b*, of which the last three remain undescribed. In 3/5 cases, hyperechogenicity was associated with dilatation and/or gallbladder anomalies. Of the total cases of CF recognized in the subgroup of first-hand referrals, deletions represent 16.7% of CF alleles. Our study thus strengthens the need to consider large *CFTR* gene rearrangements in the diagnosis strategy of fetal bowel anomalies, in particular in the presence of multiple anomalies.

European Journal of Human Genetics advance online publication, 26 May 2010; doi:10.1038/ejhg.2010.80

Keywords: *CFTR*; cystic fibrosis; deletions; rearrangements; fetal bowel anomalies; hyperechogenic bowel

INTRODUCTION

Fetal hyperechogenic bowel is a relatively common event detected at the second-trimester ultrasound scan in 0.04–1.80% fetuses.^{1,2} It can be benign and transient, or an indicator of varied fetal pathologies including cystic fibrosis (CF) (MIM 219700), which has been reported in 2.5–10.0% of cases.^{2–7}

CF is the most common severe autosomal recessive disorder in the Caucasian population with an overall incidence of approximately 1 in 3500 live births.^{8–10} Although patients' life expectancy has greatly improved over past decades, CF remains a severe disease, allowing prenatal diagnosis when both parents are known carriers for CF mutations or when abnormal ultrasound signs are detected during pregnancy. It is now a European recommendation that mutations in the *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)* gene (OMIM*602421) should be investigated in fetuses with bowel anomalies such as hyperechogenic bowel and loop dilatation.¹¹

More than 1700 *CFTR* variations have been reported so far (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). Most are point mutations, with variable distribution and frequency according to ethnic/geographic origin.¹² Large *CFTR* rearrangements such as deletions, insertions or duplications, which can be identified using semiquantitative assays,^{13–15} account for 1–3% of CF mutations and 14–26% of unidentified alleles in CF patients.^{13,16,17} To assess the frequency of large *CFTR* rearrangements in ultrasound signs suggestive of CF, data of 669

referrals related to suspicion of CF in fetuses were collated. In this study we report 5 cases out of 27 CF solved using a semiquantitative fluorescent multiplex PCR (QFM-PCR) assay.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

A series of 669 cases referred from different French clinics were investigated from 1992 to October 2009 because of fetal bowel anomalies detected by routine ultrasound examination during the second or third trimester of pregnancy. Ultrasound signs were hyperechogenic bowel (sonographic density greater than that of the surrounding bone), intestinal loop dilatation, intra-abdominal calcifications, meconium peritonitis and absence of gallbladder, with each sign being isolated or combined. According to French legislation, informed consent was obtained from the parents during a genetic counseling session. Data from amniotic fluid digestive enzyme (AF-DE) activities^{18,19} were collected, when available.

Samples from 450/669 couples were referred directly by clinicians to our laboratory (group 1, first-hand referrals). DNA samples from the other 219 couples were referred for further investigation after screening for frequent mutations in another laboratory (group 2).

CFTR gene analysis

Genomic DNAs were extracted from whole blood samples collected on EDTA or from amniotic fluid using varied protocols. DNA concentration and quality were determined for each sample.

¹Service de Biochimie-Génétique et Inserm U955 équipe 11, Groupe hospitalier Henri Mondor-Albert Chenevier, APHP, Créteil, France; ²Service de Gynécologie Obstétrique, Hôpital Armand Trousseau, APHP, Paris, France; ³UF de Génétique, Service de Néonatalogie, Maternité A. Pinard, Nancy, France; ⁴Service de Génétique-Histologie-Biologie du développement et de la reproduction, Hôpital Saint-Jacques, Besançon, France; ⁵Département de Génétique, Laboratoire de Génétique moléculaire, Groupe hospitalier Necker-Enfants Malades, APHP, Paris, France

*Correspondence: Dr E Girodon, Service de Biochimie Génétique, UF de Génétique, Groupe Hospitalier Henri Mondor-Albert Chenevier, APHP, 94010 Créteil, France. Tel: +33 1 49 81 48 22; Fax: +33 1 49 81 22 19; E-mail: emmanuelle.girodon@inserm.fr

Received 14 December 2009; revised 7 April 2010; accepted 21 April 2010



Screening for point mutations

Different study levels were carried out, depending on the clinical context.¹¹ As a first step, screening for frequent mutations was performed using diverse commercial assays or, before 1998, using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)^{20,21} focused on at least 10 exons. According to patients' ethnic/geographic origins, complementary screening for other mutations was carried out using DGGE or denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC).²² In most cases no mutation was found and the couple was reassured. In cases in which one mutation was identified, complete scanning of the 27 CFTR coding regions and a search for large rearrangements was carried out to look for a second CF mutation.

Screening for and characterization of large CFTR rearrangements

We used the QFM-PCR assay developed and implemented in our laboratory in 2004,^{13,23} retrospectively in certain cases referred before 2004. Abnormal patterns were confirmed by at least one other QFM-PCR experiment. Real-time quantitative-PCR (TaqMan) was performed in one case. Characterization of the rearrangement breakpoints was achieved by a combination of long-range PCR and sequencing experiments.

RESULTS

In group 1 of first-hand referrals, 408/450 couples (91%) were tested for frequent mutations according to their geographic origin. Comprehensive CFTR gene studies were carried out in 42 cases, including a search for large rearrangements in 17 of them (Table 1). CF was confirmed in 9 fetuses (2.0% of 450 fetuses), including 2 with a

In group 2 of second-hand referrals composed of 219 couples, 101 cases were referred for complementary screening depending on geographic origin, 92 because one frequent mutation was identified, 10 because of suggestive ultrasound signs and 16 because of technical problems. Search for large rearrangements by QFM-PCR was undertaken in 53 cases (Table 1). CF was confirmed in 18/219 cases (8.2%), including 3 with a large deletion (cases 2, 3 and 5).

Overall, of the 70 cases screened for gross rearrangements, a partial gene deletion was characterized in 5 cases (7.1%; Tables 2 and 3). Large CFTR deletions represent in this study 11.1% (6/54) of alleles in the 27 CF fetuses: 16.7% (3/18) in the 9 CF fetuses of group 1 and 8.3% (3/36) in the 18 CF fetuses of group 2.

Case 1

First cousins of Turkish origin were referred for fetal hyperchogenic bowel at 20 weeks of gestation.²⁴ Screening for frequent mutations by the CF-OLA assay (PE Biosystems) was negative in both parents, whereas three peaks corresponding to exon 19 were missing in the fetus. The deletion was confirmed using real-time quantitative-PCR (TaqMan), in heterozygosity in the parents and homozygosity in the fetus. Given the late stage of gestation, the pregnancy was continued to term. The 10-year-old girl has classical CF with a positive sweat test (90 mEq/l).

Case 2

The couple was referred at 20 weeks because of fetal bowel hyperchogenicity and dilatation associated with nonvisualization of gallbladder. Screening for frequent mutations in another laboratory identified W1282X in the father and the fetus. Complementary analysis led to the identification of a new heterozygous 55 kb deletion in the mother and the fetus, encompassing exons 2–6b. An 11-bp sequence homology overlapped the inserted sequence and the 3' breakpoint. The genotype was compatible with classical CF and, given the persistence of ultrasound signs, the parents chose to terminate the pregnancy at 26 weeks.

Case 3

The couple was referred at 30 weeks for fetal ascites, hyperchogenic bowel wall with hypoechoic loop content, which is indicative of incipient loop dilatation, and gallbladder sludge. The father and the fetus were found F508del heterozygous in another laboratory. Abnormally high AF-DE activities were compatible with ascites, probably caused by meconial peritonitis. We identified a heterozygous previously described deletion of exons 22 and 23 in the mother and the fetus.¹⁴ Termination of pregnancy was performed and the diagnosis of CF confirmed by fetopathological examination.

Table 1 Reasons of screening for large rearrangements

- In group 1 (first-hand referrals): 17/450*
- First step of the study: one CF mutation identified (n=8)
F508del (n=6), 394delTT (n=1), Q1352H (n=1)
 - Abnormal AF-DE (n=4)
 - Consanguinity in the couple (n=1)
 - Very suggestive ultrasound signs^a (n=4)
- In group 2 (second-hand referrals): 53/219*
- First step of the study: one CF mutation identified in another laboratory (n=45)
F508del (n=36), N1303K (n=3), G542X (n=2), G551D, R553X, W1282X, 3849+10kbC>T (n=1 for each)
 - Abnormal AF-DE (n=1)
 - Consanguinity in the couple and presence of the [R74W;V201M;D1270N] complex allele (n=1)
 - Very suggestive ultrasound signs^a (n=6)

^aVery suggestive ultrasound signs mean that several abnormal signs were associated and/or clinicians insisted on a comprehensive study of the CFTR gene.
AF-DE: amniotic fluid digestive enzymes.

deletion (cases 1 and 4).

Table 2 Phenotype and genotype data in fetuses carrying at least one large CFTR deletion

Case	Year of the study	Gestational age (weeks)	Ultrasound findings					Amniotic fluid digestive enzymes	Outcome	Allele 1 ^a	Allele 2 (short name)	Geographic origin for the deletion
			HB	LD	GB	Ascites	Other					
1	1998	20	+	-	-	-	-	Normal	Birth, CF	dele19	dele19	Turkey
2	2004	20	+	+	NV	-	-	Abnormally low	TOP	W1282X	dele2_6b	Denmark
3	2005	30	+	-	Sludge	+	-	Abnormally high	TOP	F508del	dele22_23	France
4	2008	25	+	+	NV	-	-	NP	Birth, CF	2347delG	dele14b_15	Brittany/Germany
5	2009	32	-	-	-	+	Polyhydramnios	NP	Birth, CF	F508del	dele6a_6b	Portugal

GB: gallbladder; HB: hyperchogenic bowel; LD: loop dilatation; NP: not performed; NV: not visualized; TOP: termination of pregnancy.
^aMutation names were given according to the international consortium mutation database (www.genet.sickkids.on.ca/cftr). For mutations denominated at the nucleotide level, the A of the ATG translation start codon was numbered as +133, in accordance with the current CFTR gene numbering based on cDNA sequence (GenBank NM_000492.3).

Table 3 Genotype data of the deletions found in CF fetuses

Case	Allele 1 ^a	Allele 2 ^a	Short name of the deletion	Motif sequence at the breakpoints
1	3601–2880_3849+2150del5279 bp ^b (c.3469–2880_3717+2150del5279 bp)	3601–2880_3849+2150del5279 bp ^b (c.3469–2880_3717+2150del5279 bp)	dele19	AACT (direct)
2	W1282X	185+2909_1002–1620del55429ins17bp ^c (c.53+2909_870–1620del55429ins17 bp)	dele2_6b	CAGCTCTAGTT (direct)
3	F508del	IVS21–78_IVS23+577del1532 bp (c.3964–78_4242+577del1532 bp)	dele22_23	ACT (direct)
4	2347delG	2751+1355_3040+243del7613 bp (c.2619+1355_2908+243del7613 bp)	dele14b_15	GTGGG–CTG (5') and GTGGG-CTG (3') (direct)
5	F508del	746_1002–1547del3273 bp (c.614_870–1547del3273 bp)	dele6a_6b	TCCTTTG (inverted)

^aMutation names were given according to the international consortium mutation database (www.genet.sickkids.on.ca/cftr). For mutations denominated at the nucleotide level, the A of the ATG translation start codon was numbered as +133, in accordance with the current CFTR gene numbering based on cDNA sequence (GenBank NM_000492.3). Deletion names according to the HGVS nomenclature (the A of the ATG translation start codon being numbered as +1) are indicated in parentheses.

^bFetus homozygous for the deletion, initially reported as 3600+15 kdel5.3 kb.²⁴

^c17 bp insertion consists of GTACTCAACAGCTCTAG.

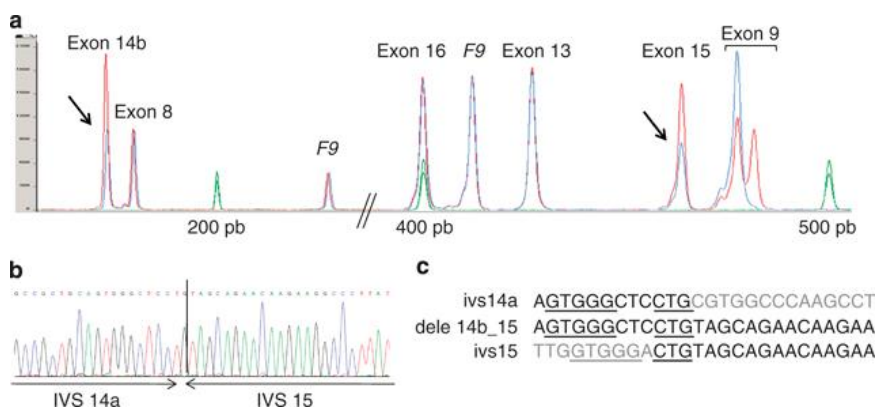


Figure 1 Identification and characterization of 2751+1355_3040+243del7613 bp (dele14b_15, case 4). (a) Electropherogram from a QFM-PCR experiment in fetus 4 (blue), carrying a deletion of exons 14b and 15 at the heterozygous state (indicated by arrows), superimposed with that of a normal control (red). The deletion is evidenced by a twofold decrease in fluorescence intensity in the fetus when compared with the normal control. The x axis represents the computed length of the PCR products in base pairs as determined using an internal lane standard (green). The y axis shows fluorescent intensities in arbitrary units. Normalization of the profiles was performed using *F9* (chromosome X) or *DSCR1* (chromosome 21, not seen in this window) reference genes.¹³ Presence of double peaks at exon 9 corresponds to heterozygosity at the intron 8 poly(TG)-polyT locus. (b) The breakpoint junctions of the deletion, as determined by direct sequencing. (c) Sequence comparison and alignment between the recombinant region (dele14b_15) and the wild-type sequences spanning the 5'- (IVS14a) and 3'- (IVS15) breakpoints. Identical sequences are in black and the direct repeat (GTGGG-CTG) is indicated underlined.

Case 4

The couple was referred at 25 weeks because of nonvisualization of fetal gallbladder associated with moderate digestive dilatation and hyperechogenicity. As screening for frequent mutations according to their geographic origin was negative in both parents, the study was stopped and the pregnancy carried out to term. However, neonatal screening for CF by determination of immunoreactive trypsinemia was positive in the baby, as was the sweat test (97 mEq/l). Complete analysis of the *CFTR* gene led to identification of the baby as compound heterozygous for the rare 2347delG mutation, inherited from the mother, and a paternal new large deletion removing exons 14b and 15 (Figure 1).

Case 5

The couple was referred at 32 weeks because of fetal ascites and polyhydramnios. The father and the fetus were found F508del

heterozygous in another laboratory. A novel deletion of exons 6a and 6b was identified by QFM-PCR in the mother and the fetus. Further characterization showed that it retains the first 12 codons of exon 6a, with a 7 bp homology at the breakpoints in exon 6a and intron 6b. Given the late stage of pregnancy, it was continued to term and the mother gave birth to a CF baby.

DISCUSSION

This is the first study reporting on the occurrence and frequency of large *CFTR* rearrangements in cases of bowel anomalies, hereby showing their notable contribution to the diagnosis of CF. The frequency of gross deletions among CF alleles found in affected fetuses (16.7% of first-hand referrals), which seems much higher than the 1.3% found in postnatally diagnosed CF patients in the same geographic population,¹³ makes our QFM-PCR assay the method of choice for second-line screening after testing for frequent mutations,



especially in emergency cases. With the development of commercial kits such as the Multiplex ligation-dependent probes amplification kit (MLPA; MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) and the implementation of laboratory networks for the molecular diagnosis of CF,¹¹ the frequency of *CFTR* gross rearrangements could even be re-evaluated upwards in the next few years.

We here refer to five large deletions, all of which could be detected using the MLPA assay, including three as yet undescribed: *dele2_6b*, *dele6a_6b* and *dele14b_15*.

As for other rearrangements described,^{13,16} these deletions seem to result from non-homologous recombination, with short sequence homologies at the breakpoints. Such deletions can result from slipped mispairing during DNA replication.¹⁴ The 'super hotspot' CCAAR, described in 10/40 breakpoints of *CFTR* large rearrangements,²⁵ was however not found in any of the five deletions reported in our study. Although the consequences of the deletions have not been studied at the functional level, it is presumed that they truncate the CFTR protein and can thus be considered to have a severe effect. Identification of deletions and consecutive confirmation of the diagnosis of CF had implications for genetic counselling in the families, as it enabled prenatal diagnosis to be offered in further pregnancies as well as cascade testing in relatives.

The clinical presentations of these five cases were representative of the signs suggestive of CF in fetuses.⁷ It is noteworthy that 3/5 CF fetuses carrying a deletion had associated digestive signs, all 3 with gallbladder anomalies. Few studies have been published about the association between CF and fetal gallbladder anomalies,^{7,26,27} thus calling for larger studies to assess better the frequency of CF in fetuses with such anomalies.

The present cases also further illustrate the variety of patterns of AF-DE activities. As recently evidenced in a wide retrospective study, AF-DE could still be of value for prenatal diagnosis of CF, although after 20 weeks, a physiological low value may be impossible to distinguish from a pathological one.²⁸

In conclusion, our study strengthens the need to consider large *CFTR* gene rearrangements in the diagnosis strategy of fetal bowel anomalies, in particular in the presence of multiple anomalies.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs C Philippe, D Feldmann, JP Bonnefont, J Kaplan, A Martin and ML Dalphin for referring the DNA samples. B Boissier, R Medina, C Gameiro and F Rossi are thanked for valuable technical assistance. D Kerridge is acknowledged for re-reading the paper.

- 1 Penna L, Bower S: Hyperechogenic bowel in the second trimester fetus: a review. *Prenat Diagn* 2000; **20**: 909–913.
- 2 Scotet V, De Braekeleer M, Audrezet MP et al: Prenatal detection of cystic fibrosis by ultrasonography: a retrospective study of more than 346 000 pregnancies. *J Med Genet* 2002; **39**: 443–448.

- 3 Ghose I, Mason GC, Martinez D et al: Hyperechogenic fetal bowel: a prospective analysis of sixty consecutive cases. *BJOG* 2000; **107**: 426–429.
- 4 Corteville JE, Gray DL, Langer JC: Bowel abnormalities in the fetus—correlation of prenatal ultrasonographic findings with outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1996; **175**: 724–729.
- 5 Slotnick RN, Abuhamad AZ: Prognostic implications of fetal echogenic bowel. *Lancet* 1996; **347**: 85–87.
- 6 Muller F, Dommergues M, Simon-Bouy B et al: Cystic fibrosis screening: a fetus with hyperechogenic bowel may be the index case. *J Med Genet* 1998; **35**: 657–660.
- 7 Muller F, Simon-Bouy B, Girodon E, Monnier N, Malinge MC, Serre JL: Predicting the risk of cystic fibrosis with abnormal ultrasound signs of fetal bowel: results of a French molecular collaborative study based on 641 prospective cases. *Am J Med Genet* 2002; **110**: 109–115.
- 8 Farrell PM: The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros* 2008; **7**: 450–453.
- 9 Southern KW, Munck A, Pollitt R et al: A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros* 2007; **6**: 57–65.
- 10 Welsh MJ, Smith AE: Cystic fibrosis. *Sci Am* 1995; **273**: 52–59.
- 11 Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA et al: Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**: 51–65.
- 12 Bobadilla JL, Macek Jr 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**: 575–606.
- 13 Niel F, Martin J, Dastot-Le Moal F et al: Rapid detection of CFTR gene rearrangements impacts on genetic counselling in cystic fibrosis. *J Med Genet* 2004; **41**: e118.
- 14 Audrezet MP, Chen JM, Ragueneau O et al: Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum Mutat* 2004; **23**: 343–357.
- 15 Hantash FM, Milunsky A, Wang Z et al: A large deletion in the CFTR gene in CBAVD. *Genet Med* 2006; **8**: 93–95.
- 16 Ferec C, Casals T, Chuzhanova N et al: Gross genomic rearrangements involving deletions in the CFTR gene: characterization of six new events from a large cohort of hitherto unidentified cystic fibrosis chromosomes and meta-analysis of the underlying mechanisms. *Eur J Hum Genet* 2006; **14**: 567–576.
- 17 Tomauiolo R, Sanguolo F, Bombieri C et al: Epidemiology and a novel procedure for large scale analysis of CFTR rearrangements in classic and atypical CF patients: a multicentric Italian study. *J Cyst Fibros* 2008; **7**: 347–351.
- 18 Brock DJ, Hayward C, Gosden C: Amniotic fluid GGTP in prenatal diagnosis of cystic fibrosis: a word of warning. *Lancet* 1983; **1**: 1099.
- 19 Mulivor RA, Cook D, Muller F et al: Analysis of fetal intestinal enzymes in amniotic fluid for the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1987; **40**: 131–146.
- 20 Fanen P, Ghanem N, Vidaud M et al: Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics* 1992; **13**: 770–776.
- 21 Costes B, Girodon E, Ghanem N et al: Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)n 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur J Hum Genet* 1995; **3**: 285–293.
- 22 Le Marechal C, Audrezet MP, Quere I, Ragueneau O, Langonne S, Ferec C: Complete and rapid scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by denaturing high-performance liquid chromatography (D-HPLC): major implications for genetic counselling. *Hum Genet* 2001; **108**: 290–298.
- 23 Ratbi I, Legendre M, Niel F et al: Detection of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene rearrangements enriches the mutation spectrum in congenital bilateral absence of the vas deferens and impacts on genetic counselling. *Hum Reprod* 2007; **22**: 1285–1291.
- 24 Costes B, Girodon E, Vidaud D et al: Prenatal detection by real-time quantitative PCR and characterization of a new CFTR deletion, 3600+15kdel5.3 kb (or CFTRdele19). *Clin Chem* 2000; **46**: 1417–1420.
- 25 Quemener S, Chen JM, Chuzhanova N et al: Complete ascertainment of intragenic copy number mutations (CNMs) in the CFTR gene and its implications for CNM formation at other autosomal loci. *Hum Mutat* **31**: 421–428.
- 26 Duchatel F, Muller F, Oury JF, Mennesson B, Boue J, Boue A: Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: ultrasonography of the gallbladder at 17–19 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther* 1993; **8**: 28–36.
- 27 Ochshorn Y, Rosner G, Barel D, Bronshtein M, Muller F, Yaron Y: Clinical evaluation of isolated nonvisualized fetal gallbladder. *Prenat Diagn* 2007; **27**: 699–703.
- 28 Oca F, Dreux S, Gerard B et al: Amniotic fluid digestive enzyme analysis is useful for identifying CFTR gene mutations of unclear significance. *Clin Chem* 2009; **55**: 2214–2217.

Article 2

Hum Genet (2011) 129:387–396
 DOI 10.1007/s00439-010-0933-1

ORIGINAL INVESTIGATION

Comprehensive description of *CFTR* genotypes and ultrasound patterns in 694 cases of fetal bowel anomalies: a revised strategy

Alix de Becdelièvre · Catherine Costa · Jean-Marie Jouannic · Annick LeFloch · Irina Giurgea · Josiane Martin · Rachel Médina · Brigitte Boissier · Christine Gameiro · Françoise Muller · Michel Goossens · Corinne Alberti · Emmanuelle Girodon

Received: 2 August 2010 / Accepted: 10 December 2010 / Published online: 24 December 2010
 © Springer-Verlag 2010

Abstract Fetal bowel anomalies may reveal cystic fibrosis (CF) and the search for CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene mutations is part of the diagnostic investigations in such pregnancies, according to European recommendations. We report on our 18-year experience to document comprehensive *CFTR* genotypes and correlations with ultrasound patterns in a series of 694 cases of fetal bowel anomalies. *CFTR* gene analysis was performed in a multistep process, including search for frequent mutations in the parents and subsequent in-depth search for rare mutations, depending on the context. Ultrasound patterns were correlated with the genotypes.

Cases were distinguished according to whether they had been referred directly to our laboratory or after an initial testing in another laboratory. A total of 30 CF fetuses and 8 cases compatible with *CFTR*-related disorders were identified. *CFTR* rearrangements were found in 5/30 CF fetuses. 21.2% of fetuses carrying a frequent mutation had a second rare mutation, indicative of CF. The frequency of CF among fetuses with no frequent mutation was 0.43%. Correlation with ultrasound patterns revealed a significant frequency of multiple bowel anomalies in CF fetuses. The results emphasize the need to search for rearrangements in the diagnosis strategy of fetal bowel anomalies. The diagnostic value of ultrasound patterns combining hyperechoic bowel, loop dilatation and/or non-visualized gallbladder reveals a need to revise current strategies and to offer extensive *CFTR* gene testing when the triad is

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00439-010-0933-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. de Becdelièvre · C. Costa · A. LeFloch · I. Giurgea · J. Martin · R. Médina · B. Boissier · C. Gameiro · M. Goossens · E. Girodon (✉)
 Service de Biochimie-Génétique,
 APHP, Groupe Hospitalier Henri Mondor-Albert Chenevier,
 UF de Génétique, Créteil 94010, France
 e-mail: emmanuelle.girodon@inserm.fr

A. de Becdelièvre · C. Costa · I. Giurgea · M. Goossens · E. Girodon
 INSERM, U955 équipe 11, 94010 Créteil, France

A. de Becdelièvre · I. Giurgea · M. Goossens
 Faculté de Médecine, UMR-S 955,
 Université Paris-Est, 94010 Créteil, France

J.-M. Jouannic
 Service de Gynécologie Obstétrique,
 AP-HP, Hôpital Armand Trousseau,
 75571 Paris, France

F. Muller
 Service de Biochimie-Hormonologie,
 AP-HP, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France

F. Muller
 Université Paris Ile de France Ouest, Paris, France

C. Alberti
 Unité d'Epidémiologie Clinique,
 AP-HP, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France

C. Alberti
 Inserm, CIE 5, Paris, France

C. Alberti
 Université Paris Denis Diderot Paris VII, Paris, France

diagnosed, even when no frequent mutation is found in the first-step analysis.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) (MIM#219700) is one of the most common autosomal recessive diseases in Caucasians (Welsh et al. 2001). It affects about 1 neonate in 3,500 and approximately one individual in 30 is a CF carrier, with marked regional variations (Bobadilla et al. 2002; Estivill et al. 1997) (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). The phenotype includes progressive pulmonary disease, pancreatic insufficiency, meconium ileus, liver disease and a positive sweat test. Although patients' life expectancy has greatly improved over the past decades, CF remains a severe and incurable disease; prenatal diagnosis is offered when both parents are known carriers for severe CF mutations. Apart from classical CF, there is a broad range of phenotypes associated with mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene (OMIM*602421), including late onset *CFTR*-related disorders (*CFTR*-RD) such as isolated male infertility by congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) (Castellani et al. 2008). Such phenotypes usually do not justify prenatal diagnosis.

CF may also be revealed in fetuses with ultrasound digestive anomalies such as hyperechogenic bowel and dilatation, mostly during the second trimester of pregnancy. CF has been reported in 2.5–9.9% of cases of hyperechogenic bowel (Corteville et al. 1996; Ghose et al. 2000; Muller et al. 1998, 2002; Scotet et al. 2002; Slotnick and Abuhamad 1996). In a large series of 641 pregnancies reported by Muller et al., CF accounted for 3.1% of fetal bowel anomalies and 20/21 cases with two *CFTR* mutations had "severe" genotypes associated with classical CF (Muller et al. 2002). However, this study was heterogeneous in terms of data collection and the extent of *CFTR* testing because of the numerous participating laboratories. In addition, testing for large *CFTR* rearrangements which account for 1–3% of CF alleles in postnatally diagnosed CF patients (Audrézet et al. 2004; Niel et al. 2004) was not part of molecular analyses.

We report on a collection of 694 cases of fetal bowel anomalies where a sequential strategy of *CFTR* analysis has been applied, according to European recommendations and including extensive analysis of the coding sequence and search for large rearrangements in selected cases (Dequeker et al. 2009). We discuss the notable contribution of such rearrangements in prenatally diagnosed CF, the unexpected occurrence of *CFTR*-RD genotypes and the relationship with ultrasound results. The predicted risk of CF in these cases has been reappraised.

Patients and methods

Subjects

From January 1992 to December 2009, 694 cases from diverse ethnic and geographic origins and referred from 61 French prenatal centers were investigated in our laboratory because of fetal digestive anomalies at routine ultrasound examination during the second or third trimester of pregnancy. Digestive ultrasound anomalies were: hyperechogenic bowel (sonographic density greater than that of the surrounding bone), intestinal loop dilatation, intra-abdominal calcifications, meconium peritonitis and non-visualization of the gallbladder, each sign being isolated or associated with other features (Table in supplementary data). In addition to *CFTR* molecular analysis, diagnostic investigations might have included measurement of amniotic fluid-digestive enzyme (AF-DE) activities (Oca et al. 2009), search for viral infections and fetal karyotyping. In accordance with the French legislation, informed consent to genetic studies was obtained from the parents during a genetic counseling session.

Blood samples from 465/694 couples were referred directly by clinicians to our laboratory (Group 1 of first-hand referrals), and DNA samples from the other 229 were referred for further investigations after screening for frequent mutations by another laboratory, including 95 cases with the presence of a frequent mutation in one parent and/or the fetus (Group 2 of second hand referrals). The two groups were studied separately in order to avoid bias, in particular for certain frequency calculations.

CFTR gene analysis

Genomic DNA was extracted from EDTA whole blood samples or from amniotic fluid using varied protocols, mostly a phenol–chloroform reference protocol or a commercial kit.

Different depths of *CFTR* mutation testing were achieved, depending on the clinical context (Dequeker et al. 2009). In the vast majority of cases (679/694), the study was first performed in the parents. The fetus was studied when a mutation was identified in at least one parent and/or when a fetal sample was available. As a first step, screening for frequent mutations was performed according to patients' ethnic/geographical origins. Most often, no mutation was found and the couple was reassured. If one mutation was identified, a complete scanning of the 27 *CFTR* coding regions and search for large rearrangements was carried out in the other parent, with an estimated 98% mutation detection rate. If both parents were found to be CF carriers, prenatal diagnosis was performed to confirm the diagnosis of CF.

Mutations names are legacy names found in the international consortium mutation database (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>), with the A of the ATG translation start codon numbered as +133, in accordance with the current *CFTR* gene numbering based on the cDNA sequence (GenBank NM_000492.3). Mutation names according to Human Genome Variation Society (HGVS) nomenclature are indicated in brackets at their first occurrence.

Statistical calculations

Qualitative variables are expressed as count (percentages) with their 95% confidence intervals (95% CI) computed by the binomial exact method. The diagnostic value of each ultrasound sign was assessed by sensitivity (95% CI), specificity (95% CI) and the likelihood of the ultrasound sign being found in a CF fetus, using the following formula: likelihood ratio = sensitivity/(1 – specificity) (95% CI). Comparisons between qualitative variables used χ^2 test. All statistical analyses were performed using SAS 9.2 (SAS Inc., Cary, NC, USA) for PC and <http://ktclearinghouse.ca/cebm/practise/ca/calculators/statscalc>.

Results

Genotype and phenotype data

Based on the genotype results, the diagnosis of CF was established in 10/465 fetuses in Group 1, indicating a CF frequency in this population of 2.15% (95% CI 1.04–3.92%), and in 20/229 (8.73%) fetuses in Group 2 (Table 1). A genotype compatible with CFTR-RD was identified in 8 fetuses (Table 2), reaching 0.64% (3/465) in Group 1 and 2.18% (5/229) in Group 2. In these eight fetuses, a comprehensive study was performed because one CF frequent mutation had been found ($n = 6$), because of low activities of AF-DE ($n = 1$), or because of consanguinity ($n = 1$). Three cases remained unresolved after complete molecular analysis. In one pregnancy obtained after ICSI, the fetus was found heterozygous for F508del (p.Phe508del, c.1521_1523delCTT) and termination of pregnancy was performed because of bowel hyperechogenicity and low AF-DE values at 16 weeks. Fetopathological analysis was compatible with CF. In two other cases, no *CFTR* mutation was identified although the phenotype in the babies was compatible with CFTR dysfunction. One baby had meconium peritonitis at birth and neonatal screening by determination of immunoreactive trypsinemia (IRT) was positive. The second, who had had low AF-DE activities at 17 weeks, had normal IRT and sweat test, but

presented with biliary duct atresia, low fecal elastase activity, absence of vas deferens and failure to thrive.

Simple CF carrier status for frequent mutations, with no other mutation found after extensive analysis and no evidence for CF after birth, was found in 13 fetuses of Group 1 (2.8%).

Residual risk of CF in fetuses

The frequency of CF in fetuses found to carry one frequent mutation was 18/85 (21.2%, 95% CI 9.3–30.5%). This frequency was calculated in the whole population because both groups were managed the same way once a frequent mutation was found.

The frequency of CF in fetuses found to carry no frequent mutation was evaluated from data of Group 1: two cases of CF were due to two rare mutations, making the residual risk in this group of 0.43% (2/465) (95% CI 0.07–1.4%).

Ultrasound signs, AF-DE, meconium ileus (MI) and correlations with the CF status and *CFTR* genotypes

Detailed ultrasound reports were available in 653/694 cases (94.1%), 393 at the second trimester and 260 at the third trimester. Ultrasound patterns found in CF fetuses and in fetuses with a CFTR-RD genotype are presented in Tables 1 and 2, respectively.

The distribution of ultrasound patterns was different between CF and non-carrier fetuses and between CF and carrier fetuses (Fig. 1). The diagnostic value of each sign or association of signs was estimated by likelihood ratios (LR) (Table 3). Of higher diagnostic value were isolated loop dilatation and associations of at least two signs consisting of hyperechogenic bowel, loop dilatation and/or non-visualization of gallbladder, these associations being observed in 14/30 (46.7%) CF fetuses, as compared with 61/422 (14.5%) non-CF fetuses ($p < 10^{-3}$). The rare triad hyperechogenic bowel–loop dilatation–non-visualization of gallbladder was of the highest value (LR = 31.40), observed in four CF fetuses versus four non-CF fetuses. Isolated absence of gallbladder was not associated to CF in our series. The seven CF fetuses presenting with a gallbladder anomaly (non-visualization in 6 and sludge in 1) also had hyperechogenic bowel and/or loop dilatation. Isolated bowel hyperechogenicity was of low diagnostic value (LR < 1), as it was observed in about two-thirds of non-CF fetuses and only one-quarter of CF fetuses. Isolated intra-abdominal calcifications appeared to be of poor diagnostic value, never being observed in CF fetuses in our series. Finally, no CF fetus was identified when associated

Table 1 Genotypes and ultrasound anomalies in CF fetuses

Genotype	Term (wg)	Ultrasound anomalies				Outcome
		HB	LD	GB	Other signs	
Group 1 (firsthand referrals), n = 10/465						
2 frequent mutations (n = 7)						
[F508del]+[F508del] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1521_1523delCTT]</i>	22	+	-			TOP
[F508del]+[F508del] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1521_1523delCTT]</i>	27	+	-	NV		TOP
[F508del]+[F508del] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1521_1523delCTT]</i>	21	+	-			TOP
[F508del]+[F508del] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1521_1523delCTT]</i>	22	+	+		MP	TOP, MI
[F508del]+[F508del] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1521_1523delCTT]</i>	32	-	+			Born, CF, MI
[F508del]+[1811+1.6kbA>G] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1680-886A>G]</i>	32	+	+			Born, CF, MI
[F508del]+[R553X] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1657C>T]</i>	29	-	+			Born, CF, MI
1 frequent and 1 rare mutation (n = 1)						
[F508del]+[2711delT] <i>c.[1521_1523delCTT]+[2583delT]</i>	25	+	+			TOP
2 rare mutations (n = 2)						
[2347delG]+[dele14b_15] <i>c.[2215delG]+[2619+1355_2908+243del7613]</i>	25	+	+	NV		Born, CF (no MI)
[dele19]+[dele19] ^a <i>c.[3469-2880_3717+2150del5279]+[3469-2880_3717+2150del5279]</i>	20	+	-			Born, CF (no MI)
Group 2 (secondhand referrals), n = 20/229						
2 frequent mutations (n = 3)						
[F508del]+[F508del] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1521_1523delCTT]</i>	31	-	-		Small bowel atresia	Born, CF, MI
[F508del]+[1811+1.6kbA>G] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1680-886A>G]</i>	23	+	+		Small bowel atresia	Born, CF, MI
[394delTT]+[1078delT] <i>c.[262_263delTT]+[948delT]</i>	15	+	+	NV		TOP, MI
1 frequent and 1 rare mutation (n = 17)						
[F508del]+[D36N] <i>c.[1521_1523delCTT]+[106G>A]</i>	20	+	-			Born, CF (no MI)
[F508del]+[K710X] <i>c.[1521_1523delCTT]+[2128A>T]</i>	31	-	+			Born, CF (no MI)
[F508del]+[Q493X] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1477C>T]</i>	17	+	-			Born, CF, MI
[F508del]+[R1158X] <i>c.[1521_1523delCTT]+[3472C>T]</i>	30	+	+		Polyhydramnios	Born, CF, MI
[F508del]+[R709X] <i>c.[1521_1523delCTT]+[2125C>T]</i>	27	+	+			Born, CF (no MI)
[F508del]+[3323_3324ins16;L967S] <i>c.[1521_1523delCTT]+[3191_3192ins16;2900T>C]</i>	20	+	+			TOP
[R1162X]+[R1066C] <i>c.[3484C>T]+[3196C>T]</i>	19	+	-			TOP
[711+1G>T]+[R709X] <i>c.[579+1G>T]+[2125C>T]</i>	28	-	-		MP	Born, CF, MI
[G542X]+[R764X] <i>c.[1624G>T]+[2290C>T]</i>	23	+	+		Ascites, hepatic calcifications	TOP, MI
[F508del]+[405+1G>A] <i>c.[1521_1523delCTT]+[273+1G>A]</i>	33	+	-	NV		TOP
[3849+10kbC>T]+[L548Q] <i>c.[3718-2477C>T]+[1643T>A]</i>	20	+	-			TOP
[F508del]+[I506T] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1517T>C]</i>	22	+	+	NV		TOP
[F508del]+[dele22_23] <i>c.[1521_1523delCTT]+[3964-78_4242+577del1532]</i>	30	+	-	HE		TOP, MI
[W1282X]+[dele2_6b] <i>c.[3846G>A]+[53+2909_870-1620del55429ins17]</i>	20	+	+	NV		TOP
[F508del]+[dele6a_6b] <i>c.[1521_1523delCTT]+[614_870-1547del3273]</i>	32	-	-		Ascites, polyhydramnios	Born, CF (no MI)
[I507del]+[Y913X] <i>c.[1519_1521delATC]+[2739T>A]</i>	30	+	+			TOP
[R553X]+[T338I] <i>c.[1657C>T]+[11013C>T]</i>	20	+	-			Born, mild CF, (no MI)

Mutation names according to HGVS nomenclature are indicated in italics after the traditional ones, at the nucleotide level only for more clarity
GB gallbladder, *HB* hyperechogenic bowel, *HE* hyperechogenicity, *LD* loop dilatation, *MI* meconium ileus, *MP* meconium peritonitis, *NV* not visualized, *TOP* termination of pregnancy, *wg* weeks of gestation

^a Consanguineous parents

Table 2 Genotypes compatible with CFTR-RD and associated ultrasound anomalies

Genotype	Term (wg)	Ultrasound anomalies				Outcome
		HB	LD	GB	Other signs	
Group 1 (firsthand referrals), n = 3/465						
1 frequent CF and 1 CFTR-RD mutation (n = 2)						
[F508del]+[S1235R] <i>c.[1521_1523delCTT]+[3705T>G]</i>	20	+	–		Ventriculomegaly	Born, not CF (no MI)
[W846X]+[G576A;R668C] <i>c.[2538G>A]+[1727G>C;2002C>T]</i>	21	+	–			Born, not CF (no MI)
2 rare mutations (n = 1)						
[V920M]+[S1235R] <i>c.[2758G>A]+[c.3705T>G]</i>	16	+	–			Born, not CF (no MI)
Group 2 (secondhand referrals), n = 5/229						
1 frequent CF and 1 CFTR-RD mutation (n = 4)						
[N1303K]+[D443Y;G576A;R668C] <i>c.[3909C>G]+[1327G>T;1727G>C;2002C>T]</i>	18	+	–			Born, not CF (no MI)
[F508del]+[G576A;R668C] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1727G>C;2002C>T]</i>	28	+	+	NV	Small bowel atresia	Born, not CF (no MI)
[F508del]+[(TG)13T5] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1210-34TG[13]T[5]]</i>	24	+	–			Born, not CF (no MI)
[F508del]+[(TG)11T5] <i>c.[1521_1523delCTT]+[1210-34TG[11]T[5]]</i>	25	+	–			Born, not CF (no MI)
2 rare CFTR-RD mutations (n = 1)						
[R74W;V201M;D1270N]+[R74W;V201M;D1270N] ^a <i>c.[220C>T;601G>A;3808G>A]+[220C>T;601G>A;3808G>A]</i>	31	–	–		Ascites	Born with MP, not CF

Mutation names according to HGVS nomenclature are indicated in italics after the traditional ones, at the nucleotide level only for more clarity GB gallbladder, HB hyperechogenic bowel, LD loop dilatation, MI meconium ileus, MP meconium peritonitis, NV not visualized, wg weeks of gestation

^a Consanguineous parents

non-digestive signs were observed, such as short femoral length or ventriculomegaly (Table in supplementary data).

Measurement of AF-DE activities was performed between 15 and 33 weeks of gestation in 97 cases, of which 16 were included in the study of Oca et al. (Oca et al. 2009). AF-DE activities were normal in 44 cases, abnormally low with an obstructive pattern in 43, and abnormally high (bilious vomiting or anal leakage pattern) in 10. In total, 7 CF fetuses were tested for AF-DE: 4 had an obstructive pattern (at 15, 17, 20 and 22 weeks), 1 had a pattern compatible with meconium peritonitis (at 33 weeks) and 2 were negative (at 20 and 23 weeks). Two fetuses with a CFTR-RD genotype (16 and 28 weeks) and 4 simple carrier fetuses also had an AF-DE obstructive pattern. Unfortunately, outcomes in other cases of abnormal pattern were poorly documented.

Of the 30 CF cases, 15 were born and MI was documented in 8/15 (53%), as compared with around 15% in CF newborns. None of the 8 children born with MI had the triad but 3/8 had hyperechogenic bowel and loop dilatation. MI was also mentioned in the 4 documented cases out of 15 with termination of pregnancy. Of the 8 cases with a CFTR-RD genotype, MI with meconium peritonitis

occurred in one but the child still does not present any sign of CF at 6 years of age.

Discussion

Here we present data from the largest cohort of CFTR gene molecular analysis performed in fetal bowel anomalies, that is, 694 cases over an 18-year period, and provide results of comprehensive gene analyses and documentation of ultrasound signs. In contrast to the previous French collaborative study of Muller et al. (2002), the results of the CFTR molecular studies are standardized and issued from a single laboratory. This is also the first study to include testing for large rearrangements, which has been developed and applied since 2004 and performed retrospectively in relevant cases of our cohort. The applied strategy complies with the current European recommendations (Dequeker et al. 2009). The outcomes of pregnancies were known in all cases where fetuses were found affected with CF or a possible CFTR-RD, as well as in most cases of CF carrier-ship. Some CF cases diagnosed after 30 weeks of gestation led to termination of pregnancy, which can be

Fig. 1 Digestive ultrasound signs in non-CF and CF fetuses. Distribution of abnormal digestive features in non-carrier, carrier and CF fetuses. Frequencies over 3% are indicated. Others signs were: minor signs of aneuploidy (4.3% in non carriers, 3.6% in heterozygotes), growth anomalies (1.9% in non carriers) and other structural anomalies (2.2% in non carriers)

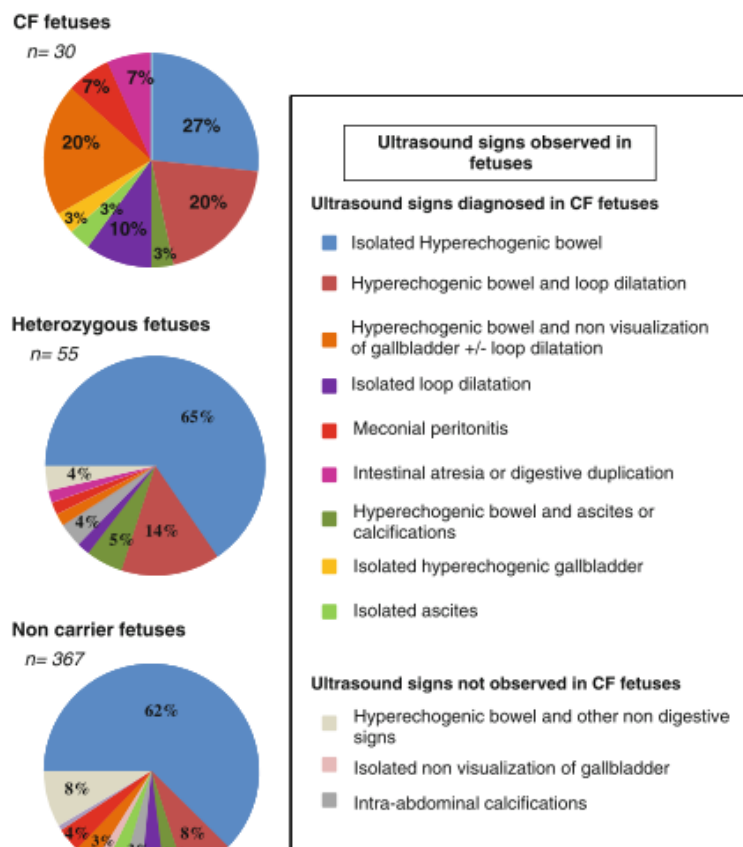


Table 3 Diagnostic value for CF of ultrasound signs

Ultrasound signs	Sensitivity, % (95% CI)	Specificity, % (95% CI)	Likelihood ratio (LR) (95% CI)
Abdominal calcifications	0.0	96.8 (94.7–98.2)	0
Isolated non-visualization of gallbladder	0.0	98.7 (97.2–99.5)	0
Isolated hyperechogenic bowel	26.7 (14.2–44.4)	35.9 (31.7–40.4)	0.42 (0.23–0.76)
Ascites	3.3 (0.6–16.7)	97.2 (95.3–98.4)	1.19 (0.16–8.81)
Hyperechogenic bowel + ascites	0.0	96.6 (94.5–98.0)	0
Meconium peritonitis	6.7 (0.2–21.3)	96.6 (94.5–97.9)	1.94 (0.47–8.04)
Isolated loop dilatation	10.0 (3.5–25.6)	96.4 (94.7–98.0)	3.10 (0.95–10.1)
Hyperechogenic bowel + loop dilatation	23.3 (11.8–40.9)	91.2 (88.2–93.5)	2.65 (1.30–5.41)
Hyperechogenic bowel + non-visualization of the gallbladder	6.7 (0.2–21.3)	98.3 (96.6–99.1)	3.87 (0.86–17.45)
Hyperechogenic bowel + loop dilatation + non-visualization of the gallbladder	13.3 (0.05–29.7)	99.6 (98.4–99.9)	31.40 (5.91–162.51)

Sensitivity indicates the frequency where a sign is present in CF fetuses, and specificity indicates the frequency where a sign is absent in non-CF fetuses. The likelihood ratio (LR = sensitivity/(1 – specificity)) quantifies the value of the patterns for the diagnosis of CF. LR > 1 indicates that a CF fetus has an increased risk of presenting a given pattern as compared with a non-CF fetus

performed regardless of the term in France. Each case was discussed in a multidisciplinary center for prenatal diagnosis and the couple’s request, the obstetrical context and

social/psychological aspects were taken into account. If no mutation was found, the outcome was unfortunately not obtained in most cases. However, if a postnatal diagnosis

of CF had been made despite negative or partial negative prenatal results of the *CFTR* molecular analysis, it is very likely that we would have been informed. Such was the case for two babies: one carrying two rare mutations, 2347delG and CFTRdele14b_15 (c.[2215delG]+[2619+1355_2908+243del7613]) and one for whom no mutation other than F508del was found after extensive analysis.

A variety of fetal bowel anomalies were encountered, either isolated or in combination, but the focus was made on intestinal grade II or III hyperechogenic bowel, loop dilatation and gallbladder anomalies, according to published data (Boughanim et al. 2008; Corteville et al. 1996; Muller et al. 2002; Ochshorn et al. 2007).

Updated frequency and risk of CF

From data of the unselected cases (Group 1), the overall frequency of CF for fetuses with fetal digestive anomalies was 2.15%. These data apply to the French population. Although they could be extrapolated to other European areas, they should be cautiously taken in other countries, in particular in Asia or Africa. Two other French studies have reported on CF in cases of fetal digestive anomalies. One collaborative study covering metropolitan France and including part of our results, reported a frequency for CF of 3.1% in a 2-year period (1997–1998), which is similar to ours (Muller et al. 2002). The other study, which focused on Brittany, reported a frequency as high as 9.9% (Scotet et al. 2002). However, in this French region the prevalence of CF at birth is higher than our national average (Munck et al. 2008). Moreover, 0.04% of pregnancies in Brittany are reported with fetal abnormal digestive signs, a rate lower than the 0.5–2% usually described. This could result from strict ultrasound examinations which are difficult to obtain in collaborative studies or when patients are referred from many different physicians.

In our study, and with the data from both groups, the residual risk for CF was evaluated to 21.2% when one frequent mutation was found, a figure higher than the 11% residual risk previously reported (Muller et al. 2002). Such a discrepancy could be attributed to more stringent criteria for second-level *CFTR* gene analysis in our series with its associated higher mutation detection rate. This high risk clearly justifies complete *CFTR* gene studies in cases where one frequent mutation is found in a fetus or one parent, possibly in the framework of laboratory networks.

Two CF fetuses from Group I carried two rare mutations, these cases thus making the risk for fetuses of carrying two rare mutations at 0.43%. One was prenatally detected as homozygous for the deletion of exon 19 because of a particular pattern in the fetus using the CF Genotyping Assay (Applied Biosystems), with 3 missing peaks corresponding to exon 19 (Costes et al. 2000). The other fetus was missed

during pregnancy and identified after birth as having CF with the [2347delG]+[CFTRdele14b_15] genotype (de Becdelièvre et al. 2010). Notably, the triad hyperechogenic bowel–loop dilatation–non-visualization of gallbladder had been observed in this latter case.

Like the previous French collaborative study, the frequency of carrier fetuses in our series (2.8%) was similar to the carrier frequency for frequent mutations found in the French general population (2.9%) (Thauvin-Robinet et al. 2009). It may therefore be supposed that the decrease in functional *CFTR* amount caused by simple CF carriage is not sufficient to cause abnormal digestive signs suggestive of CF.

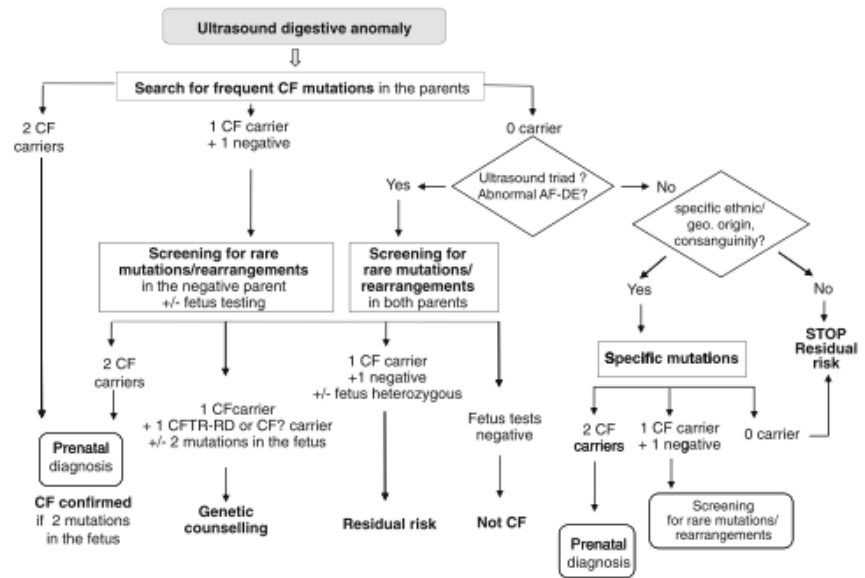
These findings should encourage revision of the empiric calculation made by Ogino et al. to assess the residual risk of CF in fetuses with digestive anomalies, in varied scenarios according to the results of *CFTR* molecular analysis, in particular those where one or no mutation was detected (Ogino et al. 2004). However, these rather complex calculations take into account the frequency of fetal bowel anomalies among CF, carrier and non-carrier fetuses taken from the study in Brittany and that could not be applied to all populations. These frequencies still remain to be assessed in the overall French population in order to provide accurate estimations of the CF risk.

Correlation with ultrasound patterns reveals a significantly higher risk in case of associated anomalies

Risks can be modulated depending on the ultrasound signs. Strikingly, association of at least two digestive signs was significantly different in CF fetuses (46.7%) and non-CF fetuses (14.5%). Of special interest was the association combining hyperechogenic bowel, loop dilatation and non-visualization of gallbladder. Of the eight fetuses presenting with this triad, four were genotyped as CF fetuses, one had a CFTR-RD genotype, one had a phenotype compatible with CFTR dysfunction but no *CFTR* mutation identified, one had associated signs compatible with a vascular pathology, while the last had no follow-up. Such a triad proved to be of high value for the diagnosis of CF and should be considered for thorough *CFTR* gene analysis even when no frequent mutation is found in the first step (Fig. 2).

Gallbladder anomalies were diagnosed in 7 CF fetuses, including 6 with non-visualized gallbladder. Hyperechogenic bowel was associated in all cases and loop dilatation in 4. Few data are available on the association between non-visualization of the fetal gallbladder and CF (Boughanim et al. 2008; Duchatel et al. 1993; Muller et al. 2002; Oca et al. 2009; Ochshorn et al. 2007).

Fig. 2 Revised strategy for molecular analysis in parents and fetuses with bowel anomalies. Screening for frequent mutations refers to use of a commercial kit



Though three cases of CF associated with isolated non-visualized gallbladder have been reported (Oca et al. 2009; Ochshorn et al. 2007), the studies, including ours and recent data from a team in Brittany (Duguépéroux et al. 2010), strengthen the diagnostic value of gallbladder anomalies when associated with hyperechogenic bowel.

Occurrence of bowel anomalies in CF fetuses is associated with a higher risk of MI

More than 50% of the babies born with CF had MI at birth, a proportion which is much higher than that of 15% described in the literature ($p < 0.01$) and leads to suggest that prenatal digestive anomalies predispose to MI. However, due to sample size effect, no specific ultrasound pattern was found to be predictive of MI at birth. No correlation could be made with pregnancy term at diagnosis, either. Although CF infants born with MI are usually pancreatic insufficient, several studies have shown that they did not have a more severe prognosis in terms of lung disease and pancreatic status than CF infants without MI (Johnson et al. 2010; Kerem et al. 1989; Munck et al. 2006). It is not clear whether the occurrence of prenatally diagnosed digestive anomalies could affect the prognosis in CF infants with MI. This remains to be investigated.

MI remained unexplained in one case with a CFTR-RD genotype, as there was no clinical or laboratory evidence of CF in the child. Such a case could be related to previous observations of MI in non-CF cases (Fakhoury et al. 1992).

Measurement of AF-DE activities may still be of value before 22 weeks

Our data support the diagnostic value of AF-DE for the diagnosis of CF when measured before 22 weeks (Oca et al. 2009), as 3/4 CF fetuses in our study sampled between 15 and 22 weeks had an obstructive pattern. However, measurement of AF-DE activities should not be a pre-requisite for *CFTR* testing. Indeed, most of the cases of fetal bowel anomalies are referred after 22 weeks. At this term, physiological low value can be impossible to distinguish from a pathological profile (Oca et al. 2009). Moreover, normal patterns may be observed in CF fetuses, as evidenced in two CF cases of our study.

Analysis of *CFTR* genotypes unmasks the notable contribution of large rearrangements to the diagnosis of CF

A high rate of large rearrangements was observed in our study, accounting for six CF alleles found in five fetuses (de Becdelièvre et al. 2010). In Group 1, 3/20 CF alleles (15.0%) were large rearrangements, which appears much higher than the 1.3% found in postnatally diagnosed CF patients in the same ethnic/geographic population (Niel et al. 2004) ($p < 0.001$). This difference could be due to a sample size effect but could also suggest an association between such null mutations, with absence of full-length protein, even misfolded, and a tissue-specific and temporal regulation of *CFTR* expression in the digestive tractus (McCarthy and Harris 2005).

Identification of CFTR-RD mutations, mutations of unknown significance and questionable cases makes genetic counseling delicate

As rarely reported (Abramowicz et al. 2000), mild or CFTR-RD associated mutations might be found incidentally while searching for CF-causing defects, in particular when one CF mutation has been identified, as was the case in our study for the splicing T5 variant of intron 8 (c.1210-12T[5]), S1235R (p.Ser1235Arg, c.3705T>G), or the complex [D443Y;G576A;R668C] allele(p.[Asp443Tyr;Gly576Ala;Arg668Cys], c.[1327G>T;1727G>C;2002C>T]). Eight fetuses were found with a genotype compatible with CFTR-RD, and 1 CF fetus with the mild T338I (p.Thr338Ile, c.1013C>T) CF mutation, thereby illustrating that fetal bowel anomalies not only reveal classical CF but also mild forms of the disease, as observed in newborn screening for CF (Narzi et al. 2007; Roussey et al. 2007; Thauvin-Robinet et al. 2009). In such cases of a genotype compatible with CFTR-RD in the fetus, careful management and genetic counseling are of utmost importance: the parents should be reassured and fetal sampling for prenatal diagnosis is not mandatory.

Much more difficult cases to manage are those where mutations of unknown significance are found, such as D36N (p.Asp36Asn, c.106G>A), L548Q (p.Leu548Gln, c.1643T>A) and V920M (p.Val920Met, c.2758G>A), which were considered as potentially CF-causing. This was supported by follow-up after birth for the case with the D36N mutation while, in the case with the L548Q mutation the fetopathological analysis was not contributive (Yamamoto et al. 2006). Qualification of a potential deleterious effect of V920M could not be done because the fetus also carried the mild S1235R mutation on the other allele and was not affected with CF.

Only three cases compatible with CFTR dysfunction remained unsolved by molecular analysis. Termination of pregnancy was performed for one of them. As the other two were lost to follow-up, it can be assumed that the children are still not recognized as CF patients in early childhood.

A revised strategy for CFTR molecular studies

The high value for the diagnosis of CF of the triad associating hyperechogenic bowel, loop dilatation and non-visualized gallbladder, elicits the consideration of a thorough CFTR gene analysis whatever the results of the first-line analysis of frequent mutations (Fig. 2). When two of these signs are associated, such a strategy could be discussed. In addition, our results strengthen the need to look for large CFTR gene rearrangements in the diagnosis strategy of fetal digestive anomalies whenever rare mutations should be searched for.

The experiments comply with the current laws of France.

Acknowledgments The authors wish to thank all clinicians for referring the cases, in particular M. Abramowicz, O. Ami, C. Baumann, V. Castaigne, J. Derelle, R. Favre, E. Flori, S. Fert-Ferrer, M. Gérard-Blanluet, F. Girard-Lemaire, D. Héron, P. Jonveaux, N. Joyé, J. Lespinasse, A. Martin, A. Miton, D. Molina-Gomes, D. Pathier, I. Sermet, B. Simon-Bouy, D. Vauthier-Brouzes, J. Vigneron and L. Weiss for careful follow-up of cases. A. Bazin, J.P. Bonnefont, J.L. Bresson, P. Clément, J.M. Costa, D. Feldmann, F. Fellmann, V. Geromel, S. Gobin, M. Koenig, G. Lalau, C. Philippe, C. Ronsin, B. Simon-Bouy and J. Steffann are acknowledged as molecular geneticists of the French CF Laboratory network for referring DNA samples to our laboratory for further analysis. We thank the IMRB genomic platform for its high expert technical assistance in sequencing analysis. F. Rossi is thanked for valuable technical assistance. D. Kerridge is acknowledged for rereading the manuscript.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abramowicz MJ, Dessars B, Sevens C, Goossens M, Girodon Boulandet E (2000) Fetal bowel hyperechogenicity may indicate mild atypical cystic fibrosis: a case associated with a complex CFTR allele. *J Med Genet* 37:E15
- Audrézet MP, Chen JM, Raguene O, Chuzhanova N, Giteau K, Le Marechal C, Quere I, Cooper DN, Ferec C (2004) Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum Mutat* 23:343–357
- Bobadilla JL, Macek M Jr, Fine JP, Farrell PM (2002) Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 19:575–606
- Boughanim M, Benachi A, Dreux S, Delahaye S, Muller F (2008) Nonvisualization of the fetal gallbladder by second-trimester ultrasound scan: strategy of clinical management based on four examples. *Prenat Diagn* 28:46–48
- Castellani C, Cuppens H, Macek M Jr, Cassiman J, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael B, Bombieri C, Brown A, Casals T, Claustres M, Cutting G, Dequeker E, Dodge J, Doull I, Farrell P, Ferec C, Girodon E, Johannesson M, Kerem B, Knowles M, Munck A, Pignatti P, Radojkovic D, Rizzotti P, Schwarz M, Stuhmann M, Tzetzis M, Zielenski J, Elborn J (2008) Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 7:179–196
- Corteville JE, Gray DL, Langer JC (1996) Bowel abnormalities in the fetus—correlation of prenatal ultrasonographic findings with outcome. *Am J Obstet Gynecol* 175:724–729
- Costes B, Girodon E, Vidaud D, Flori E, Ardalan A, Conteville P, Niel F, Vidaud M, Goossens M (2000) Prenatal detection by real-time quantitative PCR and functional consequences of a new CFTR deletion, 3600+15kdel5.3 kb (or CFTRdele19). *Clin Chem* 46:1417–1420
- de Becdelièvre A, Costa C, Lefloch A, Legendre M, Jouannic J, Vigneron J, Bresson J, Gobin S, Martin J, Goossens M, Girodon E (2010) Notable contribution of large CFTR gene rearrangements to the diagnosis of cystic fibrosis in fetuses with bowel anomalies. *Eur J Hum Genet* May 26

- Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M, Pignatti PF, Scheffer H, Schwartz M, Witt M, Schwarz M, Girodon E (2009) Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 17:51–65
- Duchatel F, Muller F, Oury J, Mennesson B, Boue J, Boue A (1993) Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: ultrasonography of the gallbladder at 17–19 weeks of gestation. *Fetal Diagn Ther* 8:28–36
- Duguépéroux I, Scotet V, Audrezet MP, Saliou A, Blayau M, Schmitt S, Kitzis A, Ferec C (2010) Non-visualization of the gallbladder: a major risk of cystic fibrosis when associated with echogenic bowel. *European Cystic Fibrosis Conference, Valencia*, pp S11
- Estivill X, Bancells C, Ramos C, Consortium TBCMA (1997) Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat* 10:135–154
- Fakhoury K, Durie PR, Levison H, Canny GJ (1992) Meconium ileus in the absence of cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 67:1204–1206
- Ghose I, Mason G, Martinez D, Harrison K, Evans J, Ferriman E, Stringer M (2000) Hyperchogenic fetal bowel: a prospective analysis of sixty consecutive cases. *BJOG* 107:426–429
- Johnson JA, Bush A, Buchdahl R (2010) Does presenting with meconium ileus affect the prognosis of children with cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol* 45:951–958
- Kerem E, Corey M, Kerem B, Durie P, Tsui LC, Levison H (1989) Clinical and genetic comparisons of patients with cystic fibrosis, with or without meconium ileus. *J Pediatr* 114
- McCarthy V, Harris A (2005) The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol* 40:1–8
- Muller F, Dommergues M, Simon-Bouy B, Férec C, Oury J-F, Aubry M-C, Bessis R, Vuillard E, Denamur E, Bienvenu T, Serre J-L (1998) Cystic fibrosis screening: a fetus with hyperchogenic bowel may be the index case. *J Med Genet* 35:657–660
- Muller F, Simon-Bouy B, Girodon E, Monnier N, Malinge MC, Serre JL, Group Fc (2002) Predicting the risk of cystic fibrosis with abnormal ultrasound signs of fetal bowel. Results of a french molecular collaborative study based on 641 prospective cases. *Am J Med Genet* 110:109–115
- Munck A, Gérardin M, Alberti C, Ajzenman C, Lebourgeois M, Aigrain Y, Navarro J (2006) Clinical outcome of cystic fibrosis presenting with or without meconium ileus: a matched cohort study. *J Pediatr Surg* 41:1556–1560
- Munck A, Dhondt J-L, Sahler C, Roussey M (2008) Implementation of the French nationwide cystic fibrosis newborn screening program. *J Pediatr* 153:228–233, 233.e1
- Narzi L, Ferraguti G, Stamato A, Narzi F, Valentini S, Lelli A, Delaroché I, Lucarelli M, Strom R, Quattrucci S (2007) Does cystic fibrosis neonatal screening detect atypical CF forms? Extended genetic characterization and 4-year clinical follow-up. *Clin Genet* 72:39–46
- Niel F, Martin J, Dastot-Le Moal F, Costes B, Boissier B, Delattre V, Goossens M, Girodon E (2004) Rapid detection of CFTR gene rearrangements impacts on genetic counselling in cystic fibrosis. *J Med Genet* 41(11):e118
- Oca F, Dreux S, Gérard B, Simon-Bouy B, de Becdelièvre A, Ferec C, Girodon E, Muller F (2009) Amniotic fluid digestive enzyme analysis is useful for identifying CFTR gene mutations of unclear significance. *Clin Chem* 55:2214–2217
- Ochshorn Y, Rosner G, Barel D, Bronshtein M, Muller F, Yaron Y (2007) Clinical evaluation of isolated nonvisualized fetal gallbladder. *Prenat Diagn* 27:699–703
- Ogino S, Wilson RB, Grody WW (2004) Bayesian risk assessment for autosomal recessive diseases: fetal echogenic bowel with one or no detectable CFTR mutation. *J Med Genet* 41:e70
- Roussey M, Le Bihannic A, Scotet V, Audrezet MP, Blayau M, Dagonne M, David V, Deneuille E, Giniès JL, Laurans M, Moisan-Petit V, Rault G, Vigneron P, Férec C (2007) Neonatal screening of cystic fibrosis: diagnostic problems with CFTR mild mutations. *J Inherit Metab Dis* 30:613
- Scotet V, De Braekeleer M, Audrezet M, Quéré I, Mercier B, Duguépéroux I, Andrieux J, Blayau M, Férec C (2002) Prenatal detection of cystic fibrosis by ultrasonography: a retrospective study of more than 346,000 pregnancies. *J Med Genet* 39:443–448
- Slotnick RN, Abuhamad AZ (1996) Prognostic implications of fetal echogenic bowel. *Lancet* 347:85–87
- Thauvin-Robinet C, Munck A, Huet F, Génin E, Bellis G, Gautier E, Audrezet MP, Férec C, Lalau G, Des Georges M, Claustres M, Bienvenu T, Gérard B, Boisseau P, Cabet-Bey F, Feldmann D, Clavel C, Bieth E, Iron A, Simon-Bouy B, Costa C, Medina R, Leclerc J, Hubert D, Nové-Josserand R, Sermet-Gaudelus I, Rault G, Flori J, Leroy S, Wizla N, Bellon G, Haloun A, Perez-Martin S, d'Acremont G, Corvol H, Clément A, Houssin E, Gautier E, Binquet C, Bonithon-Kopp C, Alberti-Boulmé C, Morris MA, Faivre L, Goossens M, Roussey M, Girodon E, the collaborating working group on R117H (2009) The very low penetrance of cystic fibrosis for the R117H mutation: a reappraisal for genetic counselling and newborn screening. *J Med Genet* 46:752–758
- Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR (2001) Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *Metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. McGraw-Hill, New York, pp 5121–5188
- Yamamoto M, Molina-Gomes D, Girodon-Boulandet E, Moulis M, Leroy B, Simon-Bouy B, Selva J, Ville Y (2006) Mid-trimester hyperchogenic bowel in a fetus of Japanese origin carrying a new mutation of CFTR gene (L548Q). *Prenat Diagn* 26:6–8

Comprehensive description of *CFTR* genotypes and ultrasound patterns in 694 cases of fetal bowel anomalies: a revised strategy
 Human Genetics
 A. de Becdelièvre, et al.
 Supplementary data

Digestive anomalies observed in fetuses (n=694)

		Number of fetuses	No mutation identified	CF genotype	CFTR-RD genotype	1 CF mut. in hétérozigosity	Questionable cases	Unknown status	Total non CF	
Bowel hyperechogenicity	isolated	384	285	8	5	34	1	51	375	
	loop dilatations	isolated	47	32	5	0	7	0	3	42
		non visualized gallbladder	8	1	4	1	1	1	0	3
		ascites	4	2	1	0	1	0	0	3
		calcifications	1	1	0	0	0	0	0	1
		abnormal amount of amniotic fluid	3	2	1	0	0	0	0	2
	anomaly of gallbladder	non visualized gallbladder	14	8	2	0	0	0	4	12
		ascites	1	1	0	0	0	0	0	1
		calcifications	1	1	0	0	0	0	0	1
		hyperechogenic gallbladder and ascites	1	0	1	0	0	0	0	0
	ascites	isolated	11	8	0	0	1	0	2	11
	intra-abdominal calcifications	isolated	9	7	0	0	2	0	0	9
		ascites	2	1	0	0	1	0	0	2
		other non digestive malformation	1	0	0	0	1	0	0	1
	abnormal amount of amniotic fluid	12	11	0	0	1	0	0	12	
	other signs	IUGR	9	9	0	0	0	0	0	9
soft markers of aneuploidy		17	14	0	1	1	0	1	17	
other non digestive malformations		8	8	0	0	0	0	0	8	
mesenteric cyst		1	0	0	0	1	0	0	1	
Loop dilatation	isolated	29	21	3	0	1	0	4	26	
	ascites	isolated	2	2	0	0	0	0	0	2
		non visualized gallbladder	1	1	0	0	0	0	0	1
		calcifications	1	1	0	0	0	0	0	1
	calcifications	1	0	0	0	0	0	1	1	
	soft markers of aneuploidy	3	2	0	0	0	0	1	3	
	other non digestive malformations	1	1	0	0	0	0	0	1	
intra-abdominal calcifications	isolated	12	10	0	0	1	0	1	12	
	hydramnios	1	1	0	0	0	0	0	1	
	cystic kidney and hydramnios	1	1	0	0	0	0	0	1	
	liver calcification	isolated	1	1	0	0	0	0	0	1
		hyperechogenic gallbladder	1	1	0	0	0	0	0	1
Ascites	isolated	14	11	0	1	0	0	2	14	
	hydramnios	3	2	1	0	0	0	0	2	
	soft markers of aneuploidy	1	1	0	0	0	0	0	1	
	abdominal cyst	1	1	0	0	0	0	0	1	
Gall-bladder anomalies	non visualized gallbladder	6	5	0	0	0	0	1	6	
	isolated cyst near the hepatic hilum	1	1	0	0	0	0	0	1	
	hyperechogenic gallbladder	1	1	0	0	0	0	0	1	
Suspicion of meconium peritonitis		28	22	2	0	1	1	2	25	
Suspicion of digestive duplication/small bowel atresia		8	6	2	0	0	0	0	6	
Soft markers of aneuploidy		3	2	0	0	0	0	1	3	
Not available		40	31	0	0	5	0	4	40	
Total		694	516	30	8	59	3	78	661	

IUGR : intra-uterin growth retardation

Soft marker of aneuploidy include short femora, choroid plexus cyst, ventriculomegaly or abnormal fetal nuchal thickness

Other non digestive malformations include polydactyly, syndactyly, club-feet, single umbilical artery

Discussion

Dans le cas de la mucoviscidose (CF), l'hyperéchogénicité intestinale ou les dilatations digestives fœtales justifient l'étude moléculaire du gène *CFTR* chez les parents et/ou le fœtus. Cette étude, sur la plus grande cohorte décrite d'analyse de *CFTR* pour anomalies digestives fœtales (694 cas sur une période de 18 ans), a permis de documenter plus précisément et de manière formelle les signes échographiques évocateurs de mucoviscidose ainsi que de ré-actualiser les risques dans notre population principalement recrutée en Ile de France mais d'origine géographique hétérogène.

Contrairement à une étude publiée quelques mois avant la nôtre (alors en « reviewing ») par une équipe brestoise (Scotet, et al., 2010), l'issue de la grossesse n'était pas documentée dans les dossiers, et nous n'avons pu l'obtenir que pour les fœtus atteints de mucoviscidose, ceux avec un génotype compatible avec une CFTR-opathie, et les fœtus simples hétérozygotes. Mais on peut supposer que, en cas de mucoviscidose dont le diagnostic nous aurait échappé en période prénatale, nous aurions été informés. Cela a d'ailleurs été le cas pour un enfant hétérozygote composite pour 2 mutations rares, [2347delG]+[CFTRdele14b_15] (c.[2215delG]+[2619+1355_2908+243del7613bp]), chez lequel, conformément aux recommandations européennes, nous n'avions recherché que les mutations fréquentes, et pour un nouveau-né chez lequel une étude extensive n'a permis de retrouver que la mutation F508del (c.1521_1523delCTT) à l'état hétérozygote.

1. Fréquence de la mucoviscidose dans notre population

Lors du recueil des données, nous avons choisi de répartir les patients en 2 groupes. Le groupe de « 1^{ère} main » comprenait les patients qui nous ont été directement adressés (n=229), sans sélection autre que celle réalisée à cause des signes d'appel, et reflète donc la population générale. Le groupe de « 2^{nde} main » rassemblait les patients dont la recherche de mutations fréquentes avait déjà été réalisée dans un autre laboratoire, et qui nous étaient adressés pour complément d'étude (n=465). Ils nous étaient adressés le plus souvent pour recherche de mutation ciblée selon les origines géographiques, ou lorsqu'une mutation fréquente avait été identifiée chez un parent et/ou le fœtus, ou encore suite à une inquiétude particulière des cliniciens devant des signes très évocateurs. Ce groupe de « 2^{nde} main » présentait donc un biais de sélection, et la fréquence de la mucoviscidose y était assez élevée (20/229 soit 8,7% en 2^{nde} main vs 10/465 soit 2,15% en 1^{ère} main).

La fréquence de la mucoviscidose, de 2,15% sur l'ensemble de notre groupe de 1^{ère} main, est statistiquement non différente du chiffre donné par l'étude de F. Muller de 3,1% (1997-1998) (Muller, et al., 2002). Ce chiffre, relativement stable sur ces 10 dernières années dans notre laboratoire (Tableau 7), est applicable à notre population en Ile-de France. Il s'agit d'une population hétérogène, dans laquelle les origines mixtes étaient fréquentes (8,9% des cas documentés). Pour les origines apparemment uniques, les plus représentées étaient la France métropolitaine (34%), l'Afrique du Nord (17%) et l'Afrique noire (12%). Ce risque *a priori* de 2,15% est nettement plus bas que celui chez les patients d'origine bretonne qui est de 7,6% (Scotet, et al., 2010). Deux raisons peuvent expliquer un tel écart : la différence de population et le caractère discriminant des examens échographiques. En effet, la population bretonne est très homogène, avec une incidence de la mucoviscidose particulièrement élevée (1/2913 en Bretagne vs 1/4136 dans la population française générale, avec des fréquences d'hétérozygotes évaluées à 1/28 et 1/33 respectivement). Par ailleurs, il existe une grande variabilité inter-opérateurs pour la détection des hyperéchogénicités intestinales fœtales (Caspi, et al., 1992; Ferriman, et al., 1999; Vincoff, et al., 1999). Enfin, dans notre étude, nous avons inclus tous les cas adressés pour « signes d'appel échographiques de mucoviscidose » : une minorité ne présentaient pas d'hyperéchogénicité intestinale ni de dilatation, mais d'autres signes (« ascite et images de calcifications faisant évoquer une péritonite méconiale », calcifications digestives, ascite, non visualisation isolée de la vésicule biliaire par exemple). Pour être au mieux représentatif de la pratique diagnostique de routine, nous avons choisi de garder dans notre étude ces cas où l'indication semblait « limite ».

Période	Nb d'analyses en 1 ^{ère} main	Nb de CF	Proportion de fœtus CF (%)
2007-2009	135	3	2,22
2002-2006	148	3	2,03
1997-2001	124	4	3,23
1992-1996	59	1	1,69

Tableau 7. Evolution du nombre de cas de mucoviscidose diagnostiquée sur signes d'appel échographiques à Créteil, sur le groupe de 1^{ère} main.

Dans notre étude, à partir des données des 2 groupes (1^{ère} et 2^{nde} main) le risque de mucoviscidose a été évalué à 21,2% lorsqu'une mutation fréquente était identifiée chez le fœtus, un chiffre plus élevé que celui de 15% (3/20) retrouvés par V. Scotet en 2010 et davantage encore de celui de 11% décrit par F. Muller en 2002. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'étude réalisée à Brest et la nôtre ont une sensibilité plus grande.

2. Taux élevé de larges réarrangements du gène *CFTR*

Nous avons observé dans notre cohorte un grand nombre de larges réarrangements du gène *CFTR*, soit 6/60 allèles CF au total, présents chez 5 fœtus. Trois de ces grandes délétions ont été identifiées dans le groupe de 1^{ère} main (15% des allèles) et 3 dans le groupe de 2^{nde} main (7,5%). La fréquence globale de 10% obtenue est beaucoup plus élevée que celle de 1,3% observée chez des patients CF (Niel, 2004). Nous n'avons pas d'explication claire à cette observation qui peut être due au hasard. L'expression spatio-temporelle de *CFTR* est très finement régulée, particulièrement au cours du développement (McCarthy and Harris 2005). Une hypothèse serait que ces larges réarrangements pourraient être à l'origine d'une absence d'ARN messager (dégradation accrue par mécanisme de NMD) ou d'un repliement de la protéine anormale, qui interfèreraient avec cette régulation d'expression spécifique de *CFTR* et provoqueraient des anomalies plus sévères au niveau digestif que des mutations CF ponctuelles. Quoi qu'il en soit, ces résultats montrent la nécessité d'intégrer la recherche de grands réarrangements à la stratégie d'analyse du gène *CFTR*, lorsque cela est justifié. Ce type d'analyse, qui fut pendant longtemps réservée à des laboratoires très spécialisés devient techniquement abordable grâce à la commercialisation de troupes (MLPA-MRC Holland). A noter que sur 5 réarrangements différents, 1 seul avait déjà été décrit auparavant (Audrezet, et al., 2004).

3. Les signes évocateurs de mucoviscidose

La force de notre étude réside dans les descriptions détaillées des anomalies échographiques rapportées dans les comptes-rendus grâce auxquelles nous avons pu formaliser par un score LR (*Likelihood Ratio*), ou rapport de vraisemblance, la valeur diagnostique des signes digestifs (Figure 44). Ce LR, lorsqu'il est supérieur à 1, indique qu'un fœtus CF a plus de risque de présenter un type de profil qu'un fœtus sain. Une cohorte plus importante de fœtus atteints aurait été nécessaire pour pouvoir attribuer aux différents profils de signes un risque facilement utilisable pour les calculs de risque résiduel, mais le *likelihood ratio* permet néanmoins d'apprécier le caractère plus ou moins péjoratif de certaines anomalies digestives

Ainsi, nous avons montré que les associations de signes « hyperéchogénicité intestinale/dilatation » et surtout la triade « hyperéchogénicité intestinale/dilatation/non visualisation de la vésicule biliaire » sont plus souvent retrouvées chez les fœtus CF que les fœtus non

CF. L'association de la triade est rare (8 fœtus au total, parmi lesquels 4 avaient un génotype CF et 1 un génotype CFTR-RD), et une étude complète, même en l'absence de mutation fréquente, dans de tels cas, pourrait être proposée.

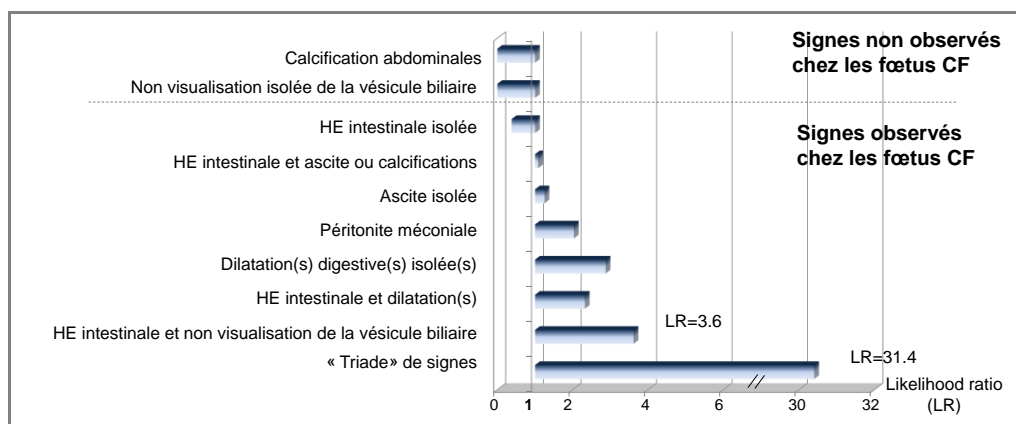


Figure 44. Valeur diagnostique des anomalies digestives fœtales évaluée par le « likelihood ratio ». LR=Sensibilité/(1-Spécificité). Un LR>1 indique qu'un fœtus CF a un risque augmenté de présenter un profil de signes par rapport à un fœtus non CF.

Parmi les enfants nés et atteints de mucoviscidose dans notre cohorte (n= 15), plus de la moitié présentaient un iléus méconial, une proportion bien supérieure au chiffre de 15% rapporté dans la littérature scientifique. Cependant, sur d'aussi petits effectifs, il est difficile de déterminer si un profil particulier de signes est associé à l'iléus méconial à la naissance. Un fœtus porteur d'un génotype CFTR-RD présentait une péritonite méconiale à la naissance, qui est restée inexpliquée. Cet enfant issu d'une union consanguine et porteur à l'état homozygote de l'allèle complexe [R74W;V201M;D1270N] n'a apparemment pas développé de signe de mucoviscidose avant l'âge de 4 ans puis a été perdu de vue. Bien que la péritonite méconiale ou l'iléus méconial soient le plus souvent causés par la mucoviscidose, de tels symptômes ont déjà été décrit chez de rares cas non CF (Fakhoury et al.1992).

Par ailleurs, nous avons observé que les anomalies digestives fœtales peuvent mener à l'identification de génotypes CFTR-RD, qui ne justifient pas de diagnostic prénatal. Dans de tels cas, les parents étaient rassurés. Les résultats sont donc toujours à rendre avec prudence, sur un faisceau d'arguments, et l'expertise moléculaire est d'une importance primordiale pour la discrimination entre CF et CFTR-RD.

Au total, l'apport de ces études au diagnostic moléculaire prénatal de la mucoviscidose sur signes d'appel échographiques est triple. (i) Par la mise en évidence de la fréquence élevée de larges

remaniements du gène *CFTR*, nous avons montré l'importance de l'intégration de ce type d'analyse dans la stratégie d'étude du gène, en cas d'anomalies digestive fœtales à l'échographie. (ii) Nous avons ré-évalué le risque de mucoviscidose dans notre population, et défini quels sont les profils de signes d'appel les plus évocateurs, apportant ainsi des informations supplémentaires aux cliniciens. (iii). Enfin, ces études nous ont permis de proposer un changement dans la stratégie moléculaire du gène *CFTR* : dans les cas de la relativement rare « triade » de signes qui présente un *likelihood ratio* pour la mucoviscidose très élevé, nous réalisons maintenant une étude complète du gène, même si aucune mutation fréquente n'est identifiée chez les parents (Figure 45. Proposition de stratégie d'analyse moléculaire du gène *CFTR* en cas de signe d'appel échographique chez un fœtus..

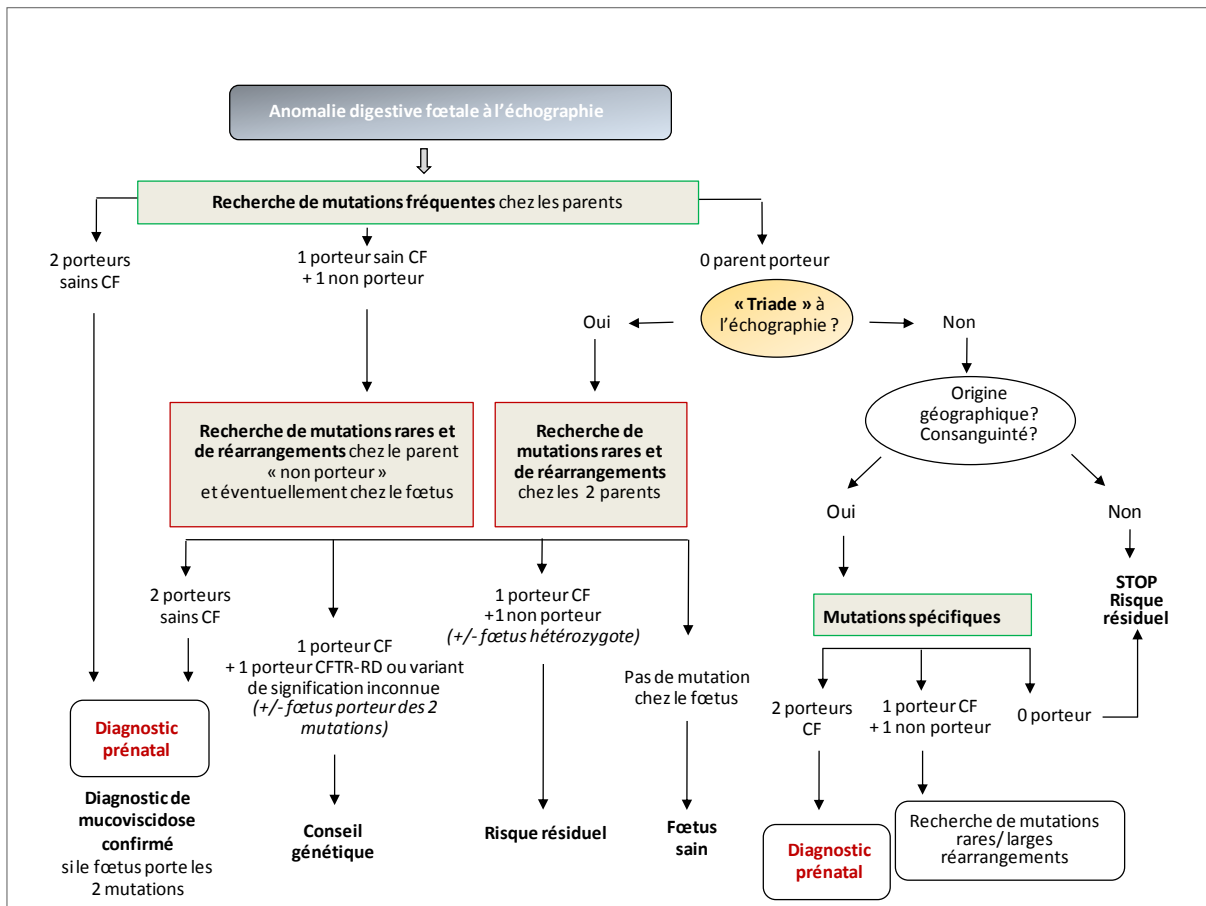


Figure 45. Proposition de stratégie d'analyse moléculaire du gène *CFTR* en cas de signe d'appel échographique chez un fœtus. En plus des circonstances préconisées par les recommandations nationales et européennes, nous proposons de réaliser une recherche de mutations rares et de larges remaniements dans certains cas particuliers. En effet, devant la triade de signes « hyperéchogénicité intestinale/dilatation digestive/ non visualisation de la vésicule biliaire », même en l'absence de mutation fréquente chez les 2 parents, la valeur élevée du rapport de vraisemblance (LR=31,4) justifie une analyse exhaustive du gène *CFTR*.

2^{ème} partie

Mise en place des outils d'étude du promoteur CFTR

Malgré le développement continu et la sensibilité croissante des outils d'analyse du gène *CFTR*, notamment avec la mise en place de la recherche de grands réarrangements géniques, et plus récemment, de l'analyse de ses transcrits, l'origine moléculaire de la pathologie reste dans quelques cas inconnue. De même que les anomalies partielles d'épissage, comme celles dues par exemple au variant T5 de l'intron 8, peuvent être responsables de formes très modérées, des anomalies de régulation transcriptionnelle causées par des mutations dans le promoteur de *CFTR* pourraient expliquer le caractère modéré, voire atypique, de la pathologie chez certains patients. Le gène *CFTR* est soumis à une régulation spatio-temporelle très spécifique, qui est encore mal comprise d'après les données connues sur son promoteur. Dans le but d'améliorer la corrélation génotype-phénotype, nous avons mis en place au laboratoire les outils nécessaires pour mener des études « mutation-fonction » concernant le promoteur de *CFTR* par un système gène rapporteur luciférase. Ce type d'outil permet de tester rapidement au niveau fonctionnel les variants du promoteur identifiés chez des patients.

1. Mesure de l'activité du promoteur dans différentes lignées

Afin de rechercher des régions d'intérêt contenant des séquences régulatrices dans la région 5' du gène *CFTR*, une des premières étapes à réaliser était la mise en place des outils nécessaires à l'étude de ce promoteur. Nous avons réalisé des constructions contenant des tailles croissantes du promoteur *CFTR*, d'un pas d'environ 300 pb, en amont du gène *luciférase*, dans le vecteur pXP1. La construction la plus courte contient le promoteur minimal connu de *CFTR*, la construction la plus longue s'étend jusqu'en position -3918 pb en amont de l'adénine du codon ATG initiateur de traduction (Figure 46). Ce pas de 300 pb nous semblait un bon compromis pour définir des régions d'intérêt suffisamment longues pour couvrir la région de 3,9 kb en 5' sans multiplier les constructions, et suffisamment courtes pour que l'on puisse espérer isoler des événements régulateurs. L'intérêt des formes tronquées du promoteur était de conserver le promoteur minimal de *CFTR*, et d'observer potentiellement des effets additifs de régulation transcriptionnelle dans les constructions plus longues. Ces constructions sont nommées selon leur taille, de P-3918 à P-313.

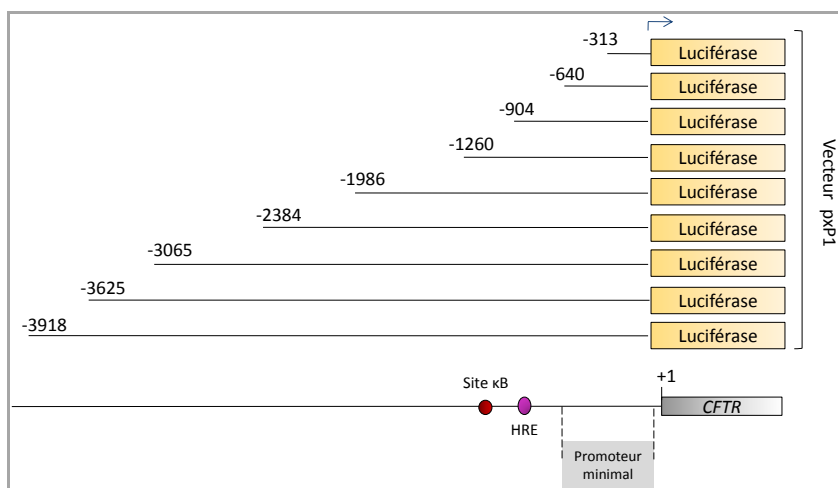


Figure 46. Représentation des constructions tronquées du promoteur *CFTR* en amont du gène *luciférase*. Chaque construction débute à la position indiquée sur la figure (en pb par rapport au +1, A du codon d'initiation de la traduction) jusqu'à la position c.-47pb.

L'activité transcriptionnelle de nos différentes constructions du promoteur a été évaluée dans les cellules HEK (lignée de rein embryonnaire humaine), et dans 2 lignées d'origine épithéliale bronchique, les cellules IB3-1 (génotype CF) et les cellules BEAS-2B (non CF). En effet, l'utilisation de plusieurs lignées cellulaires peut permettre d'identifier des différences tissu/cellule spécifiques de l'activité transcriptionnelle du promoteur, due à des variations de niveau d'expression des facteurs de transcription.

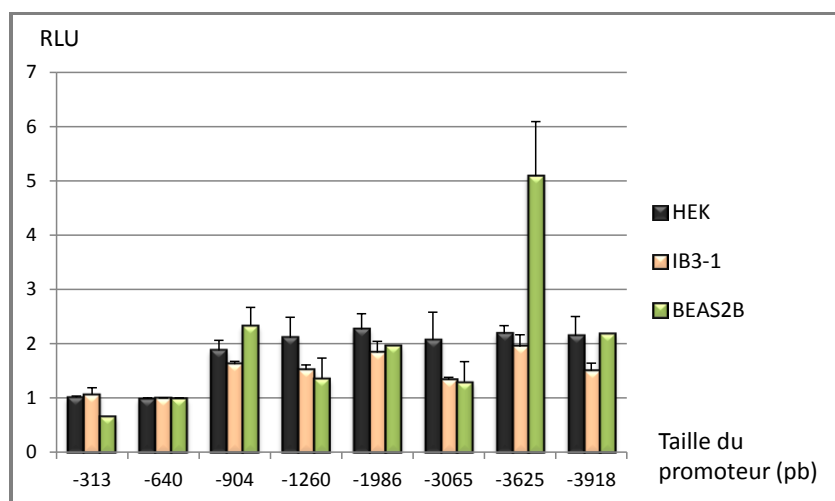


Figure 47. Activité transcriptionnelle du promoteur *CFTR*. Les différentes constructions de promoteur *CFTR* clonées dans le vecteur pXP1 (Firefly) ont été transfectées dans 3 lignées cellulaires en même temps qu'un plasmide contrôle (Renilla). L'activité luciférase a été mesurée après 24h de transfection (kit Dual Luciferase Assay, Promega), et les résultats sont exprimés en Relative Luciferase Units (RLU). Les résultats ont été normalisés dans chaque lignée par rapport au promoteur -640 pb. n=3 expériences indépendantes, sauf pour P-313 et P-3918 dans les BESA2B : n=1.

L'activité transcriptionnelle de *CFTR* dans les 3 lignées augmente significativement grâce à une séquence comprise entre les positions -904 et -641 pb (HEK et BEAS-2B : $p < 0,05$; IB3-1 : $p < 0,001$) (Figure 47). Cette région contient de nombreux sites potentiels de fixation pour des facteurs de transcription, dont une sélection, selon le seuil prédictif (*threshold*), le profil d'expression et la pertinence basée sur des données bibliographiques, sera présentée dans le chapitre suivant dans le Tableau 8 (page 127).

Au-delà de -904 pb, l'activité transcriptionnelle du promoteur est stable dans les HEK, tandis que des variations sont observées dans les lignées bronchiques. Bien que ces variations soient plus facilement détectables dans les BEAS-2B, il semble que le même profil, avec des amplitudes de variations néanmoins très faibles, soit retrouvé dans les cellules IB3-1. Ces variations pourraient être tissu-spécifique. La région située entre -3065 et -3625 pb est responsable d'une activation conséquente du promoteur (augmentation de 50% en moyenne dans les IB3-1 et de plus de 100% dans les BEAS-2B), nous avons donc affiné l'étude avec la construction intermédiaire P-3332 dans les BEAS-2B (Figure 48).

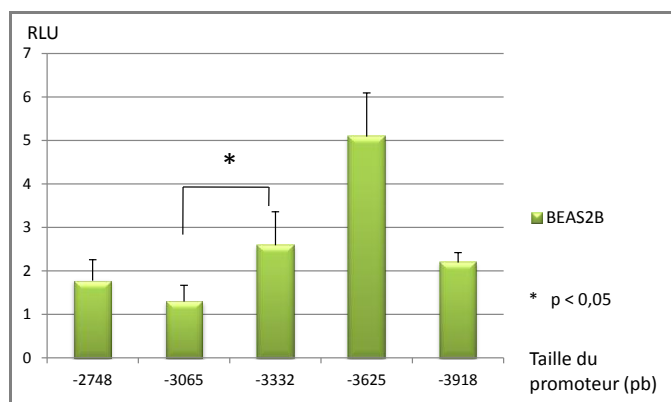


Figure 48. Activité transcriptionnelle du promoteur *CFTR* ciblée sur la région -2748 à -3918 pb dans les cellules BEAS-2B. L'analyse complémentaire du promoteur P-3332 montre une activation transcriptionnelle significative par rapport à P-3065. N=3 expériences indépendantes sauf pour P-2748 et P-3918 (n=2).

L'augmentation de l'activité transcriptionnelle entre P-3065 et P-3625 précédemment observée n'est pas due qu'à un seul élément *cis*-régulateur. En effet, le promoteur de longueur intermédiaire P-3332 montre une activité intermédiaire entre P-3065 et P-3625. L'activité transcriptionnelle du promoteur P-3332 double presque par rapport à celle de P-3065 ($p < 0,05$) et l'activité de P-3625 en moyenne double aussi par rapport à P-3332. Cette dernière différence n'était cependant pas

significative ($p=0,053$), sans doute à cause de la dispersion des mesures, avec des augmentations comprises entre +70 et +300% selon les expériences. Par ailleurs, entre les positions -3918 et -3625 se trouve probablement un élément inhibiteur induisant ici une diminution de 50% de l'activité transcriptionnelle de P-3625 dans les cellules BEAS-2B.

Nous avons donc ici identifié 4 régions d'intérêt pour la régulation transcriptionnelle de *CFTR* :

- **3 régions activatrices** : de c.-3625 à c.-3333 pb (soit 293 pb), de c.-3332 à c.-3066 pb (soit 267 pb) et de c.-904 à c.-641pb (soit 264 pb)
- **1 région inhibitrice** : de c.-3918 à c.-3626pb (soit 293 pb).

Afin d'appréhender quels pouvaient être les facteurs de transcription responsables de ces variations d'expression, une analyse bio-informatique de ces régions a été réalisée.

2. Analyse *in silico* des régions d'intérêt

Les facteurs de transcription reconnaissent en général des séquences consensus de moins de 10 pb. De tels motifs sont extrêmement fréquents dans le génome. Les outils bioinformatiques reconnaissent ces séquences consensus, mais ne peuvent tenir compte d'autres éléments essentiels pour la fixation des facteurs de transcription, comme l'environnement chromatinien. Une analyse *in silico* réalisée en 2007 par le logiciel MatInspector de la suite Genomatix montre donc de nombreux sites de fixation potentiels pour des facteurs de transcription. La région 5' entière, d'environ 4 kb, a été analysée par cet outil, et nous avons choisi de présenter ici ceux présents dans les 4 régions activatrices et inhibitrice, qui paraissent les plus pertinents de par leur seuil statistique, leur expression tissulaire ou leur fonction connue.

Analyse de la région activatrice de c.-904pb à c.-641pb

Cette région semblait contenir des sites *cis*-activateurs dans les trois lignées cellulaires testées (Tableau 8).

Symbole	Nom du facteur trans-regulateur	Seuil	Sens	Séquence cible	Position
GATA/GATA1.02	GATA-binding factor 1	0.99	-	aggaGATAatgct	-890
IRFF/IRF4.01	Interferon regulatory factor (IRF)-related protein (NF-EM5, PIP, LSIRF, ICSAT)	0.94	-	ctgaaagaGAAaaaaaat	-860
HIFF/HIF1.01	Hypoxia induced factor-1 (HIF-1)	0.87	+	ttcagtACGTgtcct	-847
EBOR/XBP1.01	X-box-binding protein 1	0.86	+	cagtACGTgtcctaa	-847
EBOX/ATF6.01	Member of b-zip family, induced by ER damage/stress, binds to the ERSE in association with NF- γ	0.93	+	gtgCCACccttgtag	-826
SF1F/FTF.01	Alpha (1)-fetoprotein transcription factor (FTF), liver receptor homologue-1 (LRH-1)	0.94	-	actcCAAGggtgg	-821
CREB/CREBP1.01	cAMP-responsive element binding protein 1	0.80	+	gttcaactACCTaaacctgaa	-807
IRFF/ISRE.01	Interferon-stimulated response element	0.81	+	ctaaacctGAAActaataa	-797
PDX1/ISL1.01	Pancreatic and intestinal lim-homeodomain factor	0.82	+	acctgaaacTAATaaagcttg	-792
CREB/CREBP1.01	cAMP-responsive element binding protein 1	0.80	-	atgcatttACCTtagcgcttc	-758
IRFF/IRF2.01	Interferon regulatory factor 2	0.80	-	tgaaaaggGAAgaaaatg	-666
CEBP/CEBPB.01	CCAAT/enhancer binding protein beta	0.94	-	tgcatthtGAAaagg	-658
SF1F/FTF.01	Alpha (1)-fetoprotein transcription factor (FTF), liver receptor homologue-1 (LRH-1)	0.94	-	ttgCAAGgtgca	-646

Tableau 8. Liste des sites potentiels de fixation pour des facteurs de transcription entre les positions c.-641 et c.-904 du promoteur *CFTR*. D'après une analyse de la suite Genomatix (2007). Les sites présentés ici ont été sélectionnés en fonction de leur seuil de probabilité (threshold >0,80) et de leur fonction ou expression tissulaire.

Un des sites qui avait tout d'abord retenu notre attention est le site putatif **HRE** pour le facteur de transcription lié à l'hypoxie HIF-1. Cependant, au moment où nous envisagions d'étudier ce site plus particulièrement, les travaux de l'équipe de J. Karhausen étaient publiés, montrant que dans les cellules intestinales et chez des modèles murins, la surexpression de HIF était associée à une diminution de la transcription de *CFTR* médiée par ce site HRE (Zheng, et al., 2009). Plus récemment encore, une augmentation d'activation sous stimulus proinflammatoire de la voie HIF a été montrée entre les cellules IB3-1 vs S9 (Legendre, et al., 2011). Bien que l'on ne puisse s'affranchir d'une différence de régulation due à la tissu-spécificité de l'action de HIF, ces données font de ce site HRE un mauvais candidat en tant qu'activateur transcriptionnel.

Parmi les autres sites d'intérêt de la région, on retrouve deux sites **CREB** (*cAMP Response Element Binding protein*). Ce type de site permet la régulation génique dans les cascades moléculaires impliquant l'AMPc. Or il a été montré que l'inhibition de la protéine kinase A (PKA) dépendant de l'AMPc entraîne une suppression totale de l'expression de *CFTR*. Un site CRE a été décrit au niveau fonctionnel dans le promoteur *CFTR*, en position c.-119pb (McDonald, et al., 1995). D'autres sites CREB pourraient avoir un effet additionnel à celui déjà décrit. Un site **C/EBP** inversé ou Ybox activateur de transcription a également déjà été décrit dans le promoteur *CFTR*, en position c.-132

pb, (Pittman, et al., 1995). L'étude du site C/EBP de notre région d'intérêt pourrait donc aussi être intéressante.

Enfin, cette région contient 3 sites de liaison potentiels pour des facteurs liés à la voie de l'**interféron (IFN)**, en positions c.-860, c.-797 et c.-666pb. On pourrait plutôt s'attendre à une régulation négative du promoteur par l'interféron. En effet, il a déjà été montré que l'interféron gamma (IFN γ) diminue la quantité d'ARNm de CFTR et le courant de chlorures dans les cellules épithéliales de colon HT-29 et T-84, sans effet sur la transcription mais par déstabilisation des transcrits (Besancon, et al., 1994). Cependant, il a été montré plus récemment que l'IFN γ régulait l'expression de *CFTR* par des voies différentes entre les cellules épithéliales T-84 (voie JAK/STAT) et les mastocytes d'origine endothéliale (voie des MAPK). Dans les mastocytes, le traitement par IFN γ entraînait une augmentation de l'ARNm de CFTR, le mécanisme sous-jacent (effet transcriptionnel ou stabilisation de l'ARNm) n'ayant pas été exploré (Kulka, et al., 2005). Dans les cellules épithéliales bronchiques, bien que le traitement par IFN γ entraîne une diminution de la fonctionnalité de CFTR (Galietta, et al., 2000), il pourrait être intéressant de tester l'influence de l'IFN γ sur la transcription du gène. Récemment, une étude de cohortes a permis d'identifier le gène *IFRD1* (*Interferon Related Development Regulator 1*) comme gène modificateur de l'inflammation neutrophilique dans la mucoviscidose (Gu, et al., 2009). Des différences d'expression de ce facteur IFRD1 ont été montrées dans des modèles épithéliaux de cellules CF par rapport à des modèles non CF (Blanchard, et al., 2011). Ces données de la littérature montrent que la voie de l'IFN γ , et des protéines qu'il module, sont d'un intérêt particulier pour essayer de mieux comprendre la régulation de *CFTR* et les dérégulations de l'inflammation observées dans la mucoviscidose.

Analyse de la région activatrice comprise entre c.-3625pb et c.-3066pb

D’après les résultats de test luciférase réalisés dans le modèle BEAS-2B, le promoteur *CFTR* serait modulé dans les cellules bronchiques par deux sites *cis*-régulateurs, l’un entre les positions c.-3625 et c.-3333 pb, et l’autre entre c.-3332 et c.-3066 pb (Tableau 9).

	Symbole	Nom du facteur trans-régulateur	Seuil	Sens	Séquence cible	Position
promoteur de c.-1-3635 pb à c.-1-3333 pb	GATA/GATA.01	GATA binding factor	0.93	+	cttaGATAaactt	-3600
	SMAD/SMAD3.01	Smad3 transcription factor involved in TGF-beta signaling	0.99	-	GTCTggttg	-3577
	GATA/GATA1.01	GATA-binding factor 1	0.96	+	tcccGATAggag	-3522
	FKHD/HNF3B.01	Hepatocyte Nuclear Factor 3beta (FOXA2)	0.95	-	aagaAATAgta	-3507
	NKXH/NKX32.01	Homeodomain protein NKX3.2 (BAPX1, NKX3B, Bagpipe homolog)	0.96	-	tgataAGTGgta	-3454
	GATA/GATA1.02	GATA-binding factor 1	0.99	-	tagtGATAagtg	-3453
	HOXF/HOXC13.01	Homeodomain transcription factor HOXC13	0.91	+	actatTAAAgctt	-3441
	HOXF/GSH2.01	Homeodomain transcription factor Gsh-2	0.95	-	tcaactTAATtgagag	-3402
	CLOX/CDP.02	Transcriptional repressor CDP	0.81	-	ttacttATCCatcatgt	-3388
	GATA/GATA.01	GATA binding factor	0.93	+	gatgGATAagtaa	-3386
	CEBP/CEBPB.01	CCAAT/enhancer binding protein beta	0.94	+	agtattgGAAAggt	-3369
	COUP/COUP.01	COUP antagonizes HNF-4 by binding site competition or synergizes by direct protein - protein interaction with HNF-4	0.81	-	tGAACttcacaata	-3365
	PXRF/PXRCAR.01	Halfsite of PXR (pregnane X receptor)/RXR resp. CAR (androstane receptor)/RXR heterodimer binding site	0.98	-	agTGAAccttc	-3364
	HOXF/BARX2.01	Barx2, homeobox transcription factor that preferentially binds to paired TAAT motifs	0.95	+	gatttcTAATggtgaaa	-3346
	AARF/AARE.01	Amino acid response element, ATF4 binding site	0.95	-	gTTTCacca	-3338
promoteur de c.-1-3332 pb à c.-1-3066 pb	AP1F/AP1.03	Activator protein 1	0.94	+	ggTGACtaatc	-3324
	CREB/ATF.01	Activating transcription factor	0.90	+	aatcttTGACgagaaggtt	-3309
	CEBP/CEBPB.01	CCAAT/enhancer binding protein beta	0.94	-	tgtgttcaGCAAtgt	-3244
	IRFF/IRF7.01	Interferon regulatory factor 7 (IRF-7)	0.86	-	gaGAAAggaagccaac	-3218
	EV11/MEL1.02	MEL1 (MDS1/EV11-like gene 1) DNA-binding domain 2	0.99	-	agagcgagGATGagta	-3194
	CDXF/CDX1.01	Intestine specific homeodomain factor CDX-1	0.94	+	ttctctTTTAatatact	-3180
	OCTP/OCT1P.01	Octamer-binding factor 1, POU-specific domain	0.86	+	ttaatATACctt	-3172
	EREF/ERR.01	Estrogen related receptor	0.87	+	tatattAAGGtcagtct	-3123
	OCT1/OCT1.02	Octamer-binding factor 1	0.84	-	ctaATGCaagaactg	-3110
	CEBP/CEBPB.01	CCAAT/enhancer binding protein beta	0.94	+	tgcatagGAAAttc	-3102
	ETSF/ELK1.01	Elk-1	0.82	+	tataggGGAAtgatgtg	-3093
	OCT1/OCT1.04	Octamer-binding factor 1	0.80	+	agTATGgaagtatg	-3085
	AP1F/AP1.02	Activator protein 1	0.96	-	actGACTacac	-3071
	AP1F/AP1.02	Activator protein 1	0.96	-	aaTGACTgact	-3063

Tableau 9. Sites potentiels de fixation de facteurs *trans*-régulateurs dans la région activatrice du promoteur *CFTR* de c.-3625 pb à c.-3066 pb. D’après la suite de logiciels Genomatix (2007)

Dans la portion la plus distale, l’analyse *in silico* montre des séquences de fixation **GATA**, et plus particulièrement des sites GATA-1. GATA-1 est un facteur impliqué dans la croissance cellulaire et la cancérogénèse, et est principalement exprimé dans les cellules érythroïdes. Cependant, le seuil élevé de ce type de sites dans cette portion du promoteur peut susciter l’intérêt. On peut noter également la présence d’un site **C/EBP**. Notons aussi la présence d’un site **CDP**, qui pourrait potentiellement recruter un modulateur capable de mobiliser des histones désacétylases (Li, et al., 2000). Ce fragment du promoteur contient un site potentiel de réponse aux hormones sexuelles **PXRF/PXRCAR** en c.-3364pb, qu’il serait intéressant d’explorer : en effet, malgré les éléments en faveur d’une

régulation hormonale du gène *CFTR*, aucun site particulier n'a à ce jour été identifié. Enfin, notons la présence d'un élément de réponse à un facteur **FOXA2** qui est très fortement exprimé dans le foie, le pancréas, le poumon adulte et foetal, et les bronches (UCSC Genome Browser, update de 2009).

La portion plus proximale du promoteur (c.-3331 à c.-3065 pb) contient trois sites potentiels de liaison pour **AP-1** qui n'ont encore jamais été décrits. Parmi les nombreux sites AP-1 décrits *in silico* dans des régions plus proximales du promoteur (entre c.-354 et c.-1129pb), aucun n'a pu être impliqué par des études fonctionnelles dans la régulation du gène *CFTR*. Une stimulation de ce fragment du promoteur par le PMA (Poly-phorbol-myristate) serait un essai simple pour tester l'importance de ces sites AP-1. Un autre site d'intérêt est le site de liaison de **Elk-1**, un facteur ETS-like. Une autre étude en cours dans notre laboratoire montre que certains facteurs de cette famille ESE activent le promoteur *CFTR* grâce à d'autres sites plus proximaux (travaux du Dr A. Hinzpeter). On retrouve également deux sites **C/EBP** et un site **CREB**.

Analyse de la région inhibitrice comprise entre c.-3918pb et c.-3626pb

Symbole	Nom du facteur trans-régulateur	Threshold	Sens	Séquence cible	Position
CEBP/CEBPB.01	CCAAT/enhancer binding protein beta	0.94	-	ctatatttGTAAtac	-3907
STAT/STAT6.01	STAT6: signal transducer and activator of transcription 6	0.84	+	gtgaaTTCAaaggaaa	-3893
LEFF/LEF1.02	TCF/LEF-1, involved in the Wnt signal transduction pathway	0.94	+	gtgaattCAAAGgaaaa	-3889
STAT/STAT6.01	STAT6: signal transducer and activator of transcription 6	0.84	-	atgttTTCCTtgaattca	-3885
GKLF/GKLF.02	Gut-enriched Krueppel-like factor	0.96	+	attcAAAGgaaaaca	-3888
IRFF/IRF4.01	Interferon regulatory factor (IRF)-related protein (NF-EM5, PIP, LSIRF, ICSAT)	0.94	+	attcaagGAAAcataag	-3884
FKHD/ILF1.01	Winged-helix transcription factor IL-2 enhancer binding factor (ILF), forkhead box K2 (FOXK2)	0.98	+	aaggaaAACAtaaga	-3881
OCT1/OCT1.02	Octamer-binding factor 1	0.84	+	aagATGCAattcgtg	-3872
CHOP/CHOP.01	Heterodimers of CHOP and C/EBPalpha	0.90	+	agaTGCAattcgt	-3871
PDX1/PDX1.01	Pdx1 (IDX1/IPF1) pancreatic and intestinal homeodomain TF	0.74	-	atacatTCATaacc	-3831
CREB/E4BP4.01	E4BP4, bZIP domain, transcriptional repressor	0.80	+	gaatgatGTAAtaga	-3821
MEF2/MEF2.05	MEF2	0.96	-	tgtttaTAAAcacacac	-3794
MEF2/MEF2.05	MEF2	0.96	+	gtgttaTAAAcagaatt	-3789
TALE/TGIF.01	TG-interacting factor belonging to TALE class of homeodomain factors	1.00	+	aattGTCAGac	-3778
PRDF/PRDM1.01	PRDI binding factor 1	0.81	+	cagtAAAgtaaactag	-3749
P53F/P53.02	Tumor suppressor p53 (5' half site)	0.91	+	tgccctagtCATGccc	-3727
AREB/AREB6.04	AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	0.98	-	aagatGTTcagg	-3694
PDX1/ISL1.01	Pancreatic and intestinal lim-homeodomain factor	0.82	+	aagactgTAATgtgtgt	-3676
GREF/PRE.01	Progesterone receptor binding site	0.84	+	gctgtggcTGTtcta	-3622

Tableau 10. Sites potentiels de fixation de facteurs *trans*-régulateurs dans la région inhibitrice du promoteur *CFTR* de c.-3918 pb à c.-3626 pb. D'après la suite de logiciels Genomatix (2007)

L'analyse *in silico* de cette région inhibitrice retrouve plus de sites pour des candidats répresseurs que les précédentes régions présentées (Tableau 10).

Un score statistique maximal de 1 était obtenu pour le facteur **TGIF** (*TGFβ Induced Factor*), qui fait partie de la superclasse des protéines homéodomaine atypique TALE (*Three-Amino-acid-Loop-Extension*). Cette protéine est un co-répresseur de Smad2 et serait impliquée dans des voies de transduction de signal lors du développement et chez l'adulte. Il agit comme répresseur transcriptionnel de la voie TGF-β (Melhuish, et al., 2010). Le TGF-β, codé par un gène qui a été identifié comme gène modificateur dans la mucoviscidose (Bremer, et al., 2008; Collaco and Cutting, 2008), diminue l'expression de *CFTR* (Howe, et al., 2004; Pruliere-Escabasse, et al., 2005). Le mécanisme de cette diminution d'expression pourrait être dû en partie à l'action de TGIF.

Parmi les autres sites *cis*-régulateurs potentiels, on peut relever les séquences de liaison pour les facteurs suivants : **AREB6/ZEB1** est un facteur de transcription qui peut, selon les sites de fixation et les signaux intracellulaires, se présenter comme un activateur ou un répresseur transcriptionnel. Notamment, il diminue l'activité du promoteur de l'IL-2 (Ikeda and Kawakami, 1995) ; **E4BP4/NFIL3** est un facteur de transcription à domaine bZip qui a été impliqué comme répresseur transcriptionnel dans le cycle circadien, la survie cellulaire et l'inflammation (Cowell, 2002) ; **FOXK2** est un répresseur de transcription intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire qui a été décrit comme modulant l'expression de p21 (Marais, et al., 2010) et **MEF2** (*Myocyte Enhanced Factor 2*) est un facteur de transcription impliqué dans de nombreuses voies de signalisation, parmi lesquelles la voie des MAP kinases (Potthoff and Olson, 2007). Il n'a pas été décrit comme particulièrement exprimé dans les cellules épithéliales, mais son seuil élevé et la présence de deux sites assez proches (possibilité de dimérisation) en font un facteur de choix. On retrouve également deux sites de liaison pour **STAT6** : le rôle de ce type de sites au niveau transcriptionnel est encore mal connu dans les cellules BEAS-2B (Kanai, et al., 2011)

Les tests fonctionnels pour tester les différents facteurs *trans* candidats n'ont pas été réalisés, car il faudrait encore limiter leur nombre. Néanmoins, toutes les constructions réalisées peuvent servir après mutagenèse dirigée à étudier de manière fonctionnelle les variations du promoteur observées chez des patients. L'exemple de la mutation c.-148A>G est présenté dans les pages suivantes.

3. Etude du mutant naturel c.-148A>G

Nous avons identifié au laboratoire chez une patiente présentant une forme CFTR-RD et hétérozygote pour la mutation F508del, le variant encore jamais décrit c.-148A>G. La patiente présentait depuis l'âge de 43 ans une pathologie bronchique chronique caractérisée par des dystrophies bronchiques diffuses au scanner, avec des poussées infectieuses nécessitant une antibiothérapie. Le VEMS (*Volume Expiratoire Maximum par Seconde*) était variable, compris entre 17% lors des épisodes d'exacerbation et 86% en temps normal. Les tests de la sueur étaient dits « intermédiaires » avec des valeurs de 47,8 et 65,3 mmol/L pour une normale < 70 mmol/L.

Afin d'étudier le potentiel pathogène de ce variant et son influence sur la transcription de *CFTR*, nous avons réalisé par mutagenèse dirigée à partir des constructions du promoteur précédemment obtenues, des plasmides contenant le gène rapporteur luciférase dirigé par le promoteur muté. Comme certains repliements chromatinien sont parfois nécessaires à la fixation de facteurs *trans*-régulateurs (Ott, et al., 2009), nous avons choisi d'utiliser deux longueurs de promoteur différentes, une relativement courte (P-604pb) et une plus longue (P-1986 pb). L'activité transcriptionnelle de ces constructions a été évaluée dans différentes lignées cellulaires (Figure 49).

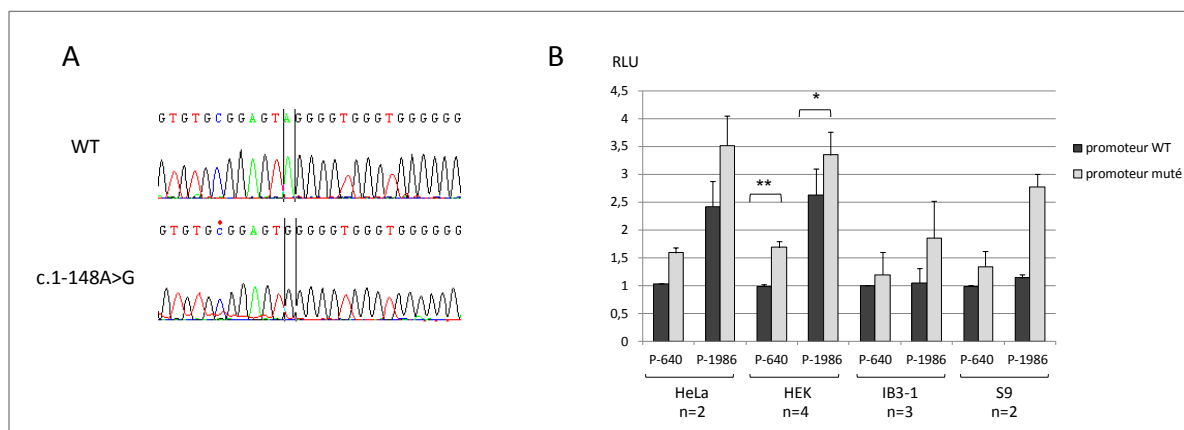


Figure 49. Etude de fonction des promoteurs wt et muté de *CFTR*. (A) Séquence des promoteurs wt et muté en position c.-148. (B) Mesure de l'activité transcriptionnelle du promoteur *CFTR* wt ou muté (c.-148A>G). Les constructions de gène rapporteur luciférase sous le contrôle des promoteurs P-640 et P-1986 wt ou mutés (c.-148A>G) ont été transfectées dans les cellules HeLa, HEK, IB3-1 et S9. Les résultats sont exprimés en RLU, normalisés par la Renilla (contrôle d'efficacité de transfection). Le nombre d'expériences indépendantes réalisées est indiqué en dessous de chaque lignée cellulaire. Le calcul statistique n'a pu être réalisé que pour les cellules HEK (n=4), par un test de Student unilatéral apparié : * p<0,05 ; ** p<0,01.

A cause du faible nombre d'expériences, le calcul de significativité statistique n'a pu être réalisé que dans les cellules HEK ($p < 0,05$), mais le même type de résultat a été retrouvé dans toutes les lignées testées : de manière inattendue, on observe une activité plus forte du promoteur muté P-640 ou P-1986 par rapport au promoteur normal, variant entre +20% et +100% selon les cellules et les constructions (Figure 49 B).

L'analyse *in silico* du variant montre qu'il induit des changements dans le potentiel de fixation d'un certain nombre de facteurs de transcription (Figure 50). Une analyse antérieure de la séquence entière du promoteur *CFTR* normal par la suite Genomatix avait prédit à proximité immédiate de la mutation la fixation du facteur **TIEG/EGR α** (*TGF- β Inducible Early Gene/Early Growth Response α*), le TGF β étant connu pour diminuer la quantité d'ARNm *CFTR* dans les polypes de patients CF (Pruliere-Escabasse, et al., 2005). Le site de consensus rapporté de TIEG est (5'-GGTGTG-3') (Chrisman and Tindall, 2003). On peut penser que la substitution A>G induit des changements de l'environnement chromatinien immédiat de ce facteur, modifiant partiellement sa liaison. Par ailleurs, les logiciels TRANSFAC et AliBaba prédisent des changements de sites **Sp1**, type de sites sur lesquels la liaison de TIEG a déjà été rapportée, et des variations du site **EGR1** (*Early Growth Response gene 1*) induit par le TGF β .

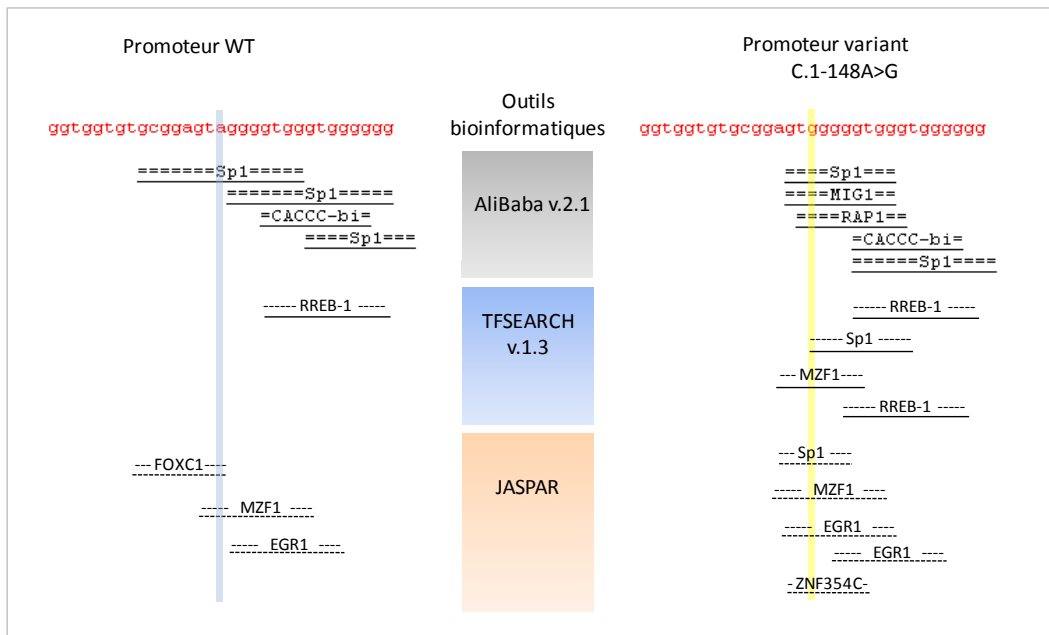


Figure 50. Représentation des variations dans les sites potentiels de liaison de facteurs de transcription, d'après les bases de données bioinformatiques AliBaba, Transfac et Jaspas.

Afin d'étudier si un facteur induit par le TGF β pouvait être impliqué dans la régulation de *CFTR*, nous avons activé cette voie dans nos cellules, après transfection du système promoteur *CFTR*/gène *luciférase* (TGF- β Millipore, à la dose de 20 ng/mL pendant 24h).

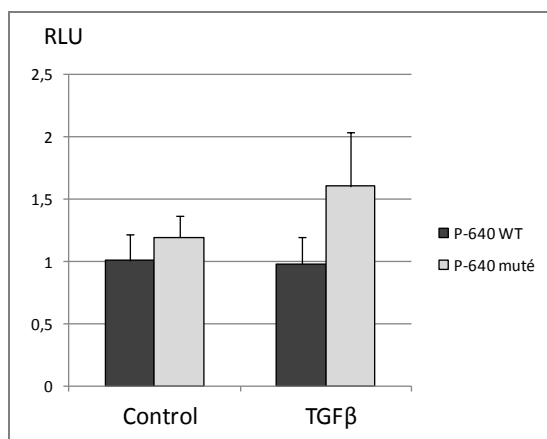


Figure 51. Influence du TGF β sur l'activité transcriptionnelle du promoteur wt ou muté (c.-148A>G). 24h après transfection des constructions wt et mutée du promoteur P-640, les cellules ont été traitée ou non par le TGF β (20 ng/mL) pour 24 heures. Résultats de 2 expériences indépendantes.

Le traitement de 24h par TGF β n'entraîne pas de variation de l'activité transcriptionnelle du promoteur wt, tandis qu'une augmentation d'environ 30% de l'activité est observée pour le promoteur muté (Figure 51).

Quelques temps après avoir réalisé ces expériences, nous avons pu obtenir un échantillon d'ARN de la patiente, issu d'un broyage de cellules épithéliales nasales. L'analyse des transcrits de *CFTR* ne montre aucune anomalie, tant sur le plan qualitatif (non présenté ici) que quantitatif (Patiente P, Figure 52), par comparaison à des témoins sains (témoins ne portant aucune mutation dans les régions codantes de *CFTR*). Ainsi, dans son échantillon de cellules nasales, la quantité d'ARNm *CFTR* de la patiente était semblable à celle de nos témoins lors du prélèvement.

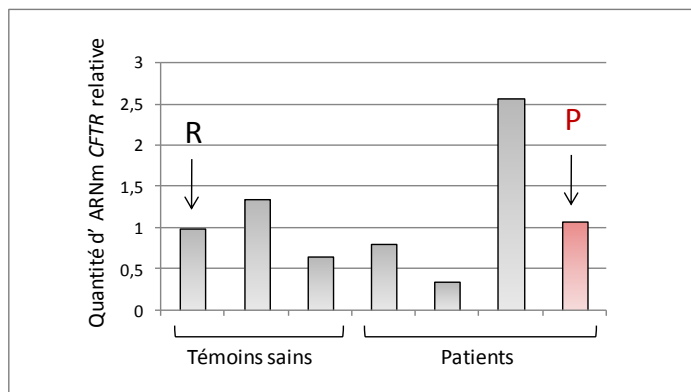


Figure 52. Quantification de l'ARNm issu de cellules épithéliales nasales par PCR en temps réel. L'ARNm de patients et de témoins a été extrait à partir de brossages de cellules épithéliales nasales, rétro-transcrit en ADNc et amplifié par Q-PCR en technologie TaqMan. Les résultats sont rapportés au gène de ménage *KRT18*, en prenant comme référence un témoin sain (R). L'échantillon correspondant à la patiente P est indiqué par une flèche et représenté en rouge.

Le TGF β est une des cytokines pro-fibrotiques les plus importantes, impliquée notamment dans la réparation tissulaire et l'inflammation (Lee, et al., 2004). Une étude a montré l'augmentation du TGF β dans le surnageant de culture de cellules épithéliales bronchiques de type CF par rapport aux cellules non CF (Perkett, et al., 2006). Par ailleurs, le TGF β diminue l'expression de CFTR dans les cellules de polypes de patients CF et dans les cellules de colon T-84 et HT-29 (Howe, et al., 2004; Pruliere-Escabasse, et al., 2005).

Nos expériences de gène rapporteur sur le promoteur muté (c.-148A>G) de la patiente montrent une activation par le TGF β , tandis que le promoteur wt ne varie pas, dans les cultures de cellules bronchiques CF IB3-1. Cette action pourrait être médiée par les protéines TIEG ou EGR1, dont l'expression est induite par le TGF β . Des expériences de surexpression ou d'extinction de ces facteurs pourraient apporter des éléments de réponse à cette interrogation. Bien que nous nous soyons plutôt attendus à observer une diminution de la transcription, compte-tenu du phénotype de la patiente, les résultats montrent une différence de régulation entre le promoteur muté et le promoteur wt, avec une augmentation de l'activité transcriptionnelle associée au mutant. La quantification des transcrits issus de cellules épithéliales nasales montre un taux d'ARNm comparable aux témoins sains. La quantification des transcrits allèle spécifique (allèle portant la mutation F508del vs c.-148A>G) n'a pas été réalisée, mais la mutation F508del n'est pas connue pour causer des variations de stabilité de l'ARNm. Le mutant du promoteur ne semblait donc pas entraîner de variation de la quantité d'ARNm. Cependant, ceci n'est pas en contradiction avec nos résultats : cette quantification d'ARNm reflète le taux présent dans les cellules nasales, et non pas dans les cellules bronchiques, à un moment donné. On peut penser que c'est seulement dans certaines

conditions de stimulation que le promoteur se comporte de façon anormale chez la patiente, ce qui expliquerait son phénotype très modéré, avec un test de la sueur intermédiaire témoignant de la fonction résiduelle de CFTR. Par ailleurs, il serait intéressant de séquencer chez cette patiente le gène codant le TGF β , qui a été décrit comme gène modificateur de la pathologie pulmonaire, afin d'établir si elle porte des polymorphismes particuliers (Bremer, et al., 2008).

Bien que des études complémentaires soient nécessaires pour comprendre le mécanisme à l'origine de la pathologie modérée de la patiente présentée ici, l'ensemble des outils mis en place permet une première approche fonctionnelle rapide pour l'analyse des nouveaux variants du promoteur *CFTR* chez les patients. Ces essais fonctionnels s'inscrivent dans un contexte d'implantation de l'étude qualitative et quantitative des ARNm issus de cellules épithéliales nasales dans le laboratoire de diagnostic moléculaire. La description fonctionnelle de nouveaux mutants permettra de mieux comprendre la relation génotype-phénotype, particulièrement pour les formes modérées.

3^{ème} partie

***Contributions à l'étude de COMMD1 et de CSN5
en tant que régulateurs de l'inflammation dans le contexte
de la mucoviscidose***

L'atteinte pulmonaire est le principal facteur de morbidité et de mortalité dans la mucoviscidose. Elle est caractérisée par le cercle vicieux « inflammation – syndrome obstructif – infection », chacun de ces trois éléments aggravant les deux autres. L'inflammation est anormalement activée relativement aux pathogènes présents dans les voies aériennes des patients, et cette réaction inappropriée chronique évolue vers une détérioration progressive du parenchyme pulmonaire (Muhlebach, et al., 2004; Verhaeghe, et al., 2007a). L'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires dans des modèles cellulaires de phénotype CF, en dehors de toute inflammation détectable ou sous stimulation a été décrite dans plusieurs études (Venkatakrisnan, et al., 2000; Weber, et al., 2001). Ceci serait notamment dû à une activation anormale de la voie NF-κB dans les cellules CF (DiMango, et al., 1998; Jacquot, et al., 2008; Venkatakrisnan, et al., 2000). A l'heure actuelle, la réduction de cette inflammation anormale fait partie du défi thérapeutique.

COMMD1 et CSN5 sont deux protéines pléiotropiques de localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique. Elles avaient toutes deux été identifiées dans notre laboratoire, à l'occasion d'un criblage double hybride de levure, comme partenaires de la protéine CFTR, dont elles régulent l'une de l'autre le trafic intracellulaire, depuis ses premières étapes de maturation jusqu'à son expression à la membrane plasmique.

COMMD1 est une protéine d'échafaudage principalement reconnue pour sa capacité à stabiliser ou déstabiliser l'interaction entre des E3 ubiquitine ligases et leurs substrats spécifiques. C'est notamment par ce type d'interaction qu'elle régule la voie de l'inflammation NF-κB.

CSN5 existe dans la cellule sous forme de monomère, de mini-complexes protéiques ou encore en tant que sous-unité du signalosome. Cette protéine est connue pour réguler deux voies pro-inflammatoires : la voie AP-1 et depuis peu la voie NF-κB.

1. La voie NF- κ B est anormalement activée dans les cellules CF

Les résultats des études des diverses équipes concernant l'inflammation sont assez disparates, et une vision synthétique est compliquée par la diversité des modèles et des *stimuli* pro-inflammatoires utilisés.

La voie NF- κ B est impliquée dans de nombreux processus cellulaires autres que l'inflammation, et peut être activée par de nombreux stimuli intracellulaires variant selon les cellules utilisées. Nous avons donc voulu nous affranchir de l'influence du fond génétique en utilisant des modèles isogéniques.

Les cellules **IB3-1** sont des cellules épithéliales bronchiques, immortalisées, issues d'un patient atteint de mucoviscidose et porteur du génotype CF [F508del]+[W1282X] (Zeitlin, et al., 1991). Deux lignées cellulaires de phénotype sauvage ont été générées à partir des IB3-1. Les cellules **C38** sont des cellules IB3-1 transfectées stablement avec de l'ADNc *CFTR*-wt délété d'une partie de sa boucle extracellulaire 1 (ECL1), la protéine CFTR résultante étant toutefois fonctionnelle. Les cellules **S9** sont des IB3-1 corrigées avec l'ADNc *CFTR*-wt complet. Toutefois, ces lignées bronchiques expriment très faiblement CFTR (Egan, et al., 1992; Eidelman, et al., 2001; Flotte, et al., 1993).

Nous disposons également au laboratoire de cellules **HeLa** stablement transfectées avec l'ADNc de *CFTR* (vecteur pTracer), wild-type ou porteur de diverses mutations, parmi lesquelles la mutation F508del (Clain, et al., 2001; Jungas, et al., 2002). Bien que ces cellules ne possèdent pas la même machinerie cellulaire que les cellules d'origine bronchique, elles expriment un taux très élevé de protéine CFTR, et sont donc appropriées pour étudier les mécanismes cellulaires propres à ce canal.

Afin d'évaluer le niveau d'activation relatif de la voie NF- κ B dans nos lignées cellulaires, nous avons mesuré l'activité luciférase d'un vecteur rapporteur dont la transcription dépend de NF- κ B *via* 5 éléments de liaison dans le promoteur (pNF- κ BLuc, Stratagene) (Figure 53).

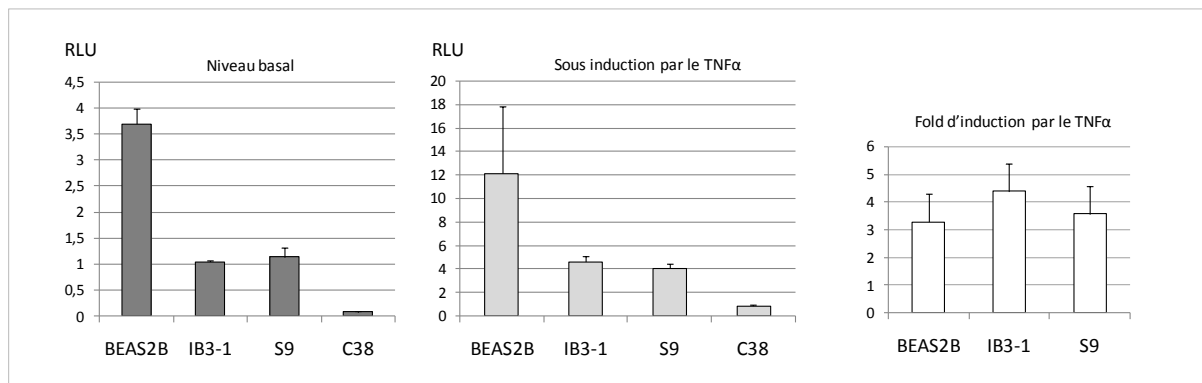


Figure 53. Evaluation de l'activité NF-κB dans différentes lignées bronchiques. Un vecteur luciférase répondant à NF-κB (pNF-κBLuc, Stratagene) et un plasmide de contrôle Renilla ont été co-transfectés dans les différentes lignées, en l'absence (niveau basal) ou en présence de TNFα (30ng/mL, 4h). Les résultats normalisés par l'activité Renilla sont exprimés en RLU (*Relative Luciferase Unit*). Les *fold*s d'induction sous TNF-α ont été calculés (RLU sous induction/basal) pour les cellules BEAS-2B, IB3-1 et S9. Ce *fold ratio* n'est pas représenté pour les cellules C38 : en effet, sa valeur très élevée de 9,6 fold est due à l'activité extrêmement faible de luciférase en condition basale, l'activité sous stimulation restant, malgré ce *fold ratio*, très faible. Résultats d'une seule expérience représentative en triplicat.

Les cellules **BEAS-2B** sont des cellules bronchiques avec un génotype *CFTR* normal. L'activité NF-κB semble beaucoup plus élevée dans ces cellules par rapport aux modèles plus souvent utilisés dans la mucoviscidose IB3-1, C38 et S9. Ceci peut notamment être attribué à un fond génétique différent. Ces cellules présentent d'ailleurs des différences morphologiques par rapports aux 3 autres lignées, se traduisant notamment *in vitro* par un étalement plus large en boîtes de culture. Comme rapporté dans de nombreuses études, les cellules non CF **C38** présentent un taux d'inflammation basal (<0,1 RLU) et sous stimulation par le TNF-α (<1 RLU) très inférieur aux cellules IB3-1 (1 et 4,6 RLU respectivement). Cependant, ce taux est également très inférieur à celui des autres cellules non CF S9. Les cellules **S9** présentent dans nos conditions une activité basale de NF-κB similaire à celle des cellules CF IB3-1. Néanmoins, une différence entre ces deux lignées est observable sous stimulation : la stimulation de l'activité NF-κB est plus importante dans les cellules IB3-1 (*fold ratio* d'environ 4,6) que dans les S9 (*fold ratio* proche de 3,5). Cette différence, qui peut sembler faible, est néanmoins reproductible, et d'autres expériences montrent qu'elle est statistiquement significative ($p < 0,005$). Les cellules S9 et C38 diffèrent par la présence ou non de la boucle extracellulaire 1 de *CFTR*-wt, qui pourrait jouer un rôle dans les signaux de transduction de l'inflammation. Nous avons choisi pour notre étude d'utiliser les cellules S9, qui sont plus proches des cellules IB3-1 que les C38.

La même expérience au niveau basal a été menée dans nos modèles de cellules HeLa exprimant stablement *CFTR* (Figure 54). L'activité transcriptionnelle de NF-κB dans les cellules exprimant *CFTR*-

wt est nettement plus basse que dans les cellules exprimant CFTR-F508del. Ceci est en accord avec l'hypothèse que la mutation F508del génère un état pro-inflammatoire par rapport à l'état sauvage. La comparaison des cellules exprimant le vecteur vide (PTracer) et CFTR-wt ne permettait pas de confirmer l'hypothèse que la protéine CFTR-wt aurait elle-même un potentiel anti-inflammatoire dans l'expérience présentée ici, choisie à cause de l'efficacité de transfection similaire dans les 3 types cellulaires. Des mises au point supplémentaires seraient nécessaires, nos cellules HeLa CFTR-wt présentant, dans nos conditions, un taux de mortalité augmenté par rapport aux cellules PTracer et CFTR-F508del.

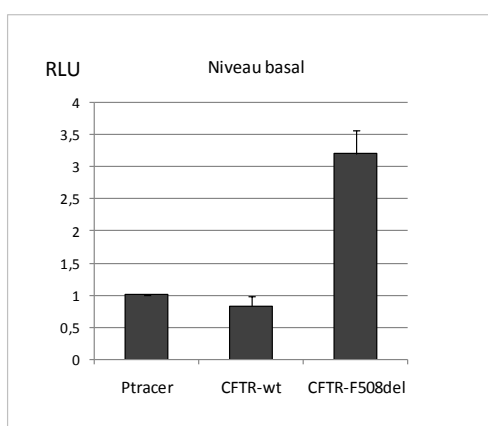


Figure 54. Evaluation de l'activité basale NF- κ B dans les cellules HeLa exprimant stablement CFTR-wt ou CFTR-F508del. Les cellules exprimant PTracer vide servent de contrôle. Résultats d'une expérience représentative réalisée en triplicat.

L'ensemble de ces résultats montre bien une augmentation de l'activité NF- κ B dans les cellules CF par rapport aux cellules non CF. Cette différence est très subtile entre les cellules IB3-1 et S9, ce qui s'explique probablement par le très faible taux d'expression de CFTR dans ces cellules par rapport à nos cellules HeLa stablement transfectées.

2. Etude de l'effet de COMMD1 sur l'inflammation pulmonaire dans la mucoviscidose.

Lors de l'étude du rôle cytoplasmique de COMMD1 dans le trafic de la protéine CFTR de l'appareil de Golgi vers le cytoplasme, une différence de répartition nucléo-cytoplasmique de cette protéine avait été observée, entre les modèles cellulaires CF et non CF. Les cellules utilisées alors étaient les cellules IB3-1 vs C38 obtenues directement de Pamela Zeitlin en 1998, et HeLa-CFTR-wt vs HeLa-

CFTR-F508del. La principale activité nucléaire de COMMD1 rapportée à ce jour étant l'inhibition de la transcription NF- κ B dépendante, nous nous sommes interrogés sur son activité anti-inflammatoire dans le contexte de la mucoviscidose.

L'activité inhibitrice de COMMD1 sur la transcription médiée par le facteur pro-inflammatoire NF- κ B a été montrée dans différentes lignées cellulaires, et principalement les cellules HEK, les cellules d'ostéosarcome U2OS de morphologie semblable aux cellules épithéliales, et les cellules HeLa.

Dans la mesure où un tel effet sur l'inflammation pourrait présenter une certaine tissu-spécificité, nous avons voulu confirmer l'effet anti-NF- κ B de COMMD1 dans les cellules épithéliales bronchiques, et évaluer l'intérêt de cette protéine dans le contrôle de l'inflammation exacerbée observée dans la mucoviscidose.

Une partie des résultats obtenus est présentée ici sous la forme d'un article qui sera bientôt soumis. Il fait état de l'activité anti-NF- κ B de COMMD1 dans les cellules IB3-1 et S9 au niveau basal ou sous stimulation par le TNF- α . La surexpression de COMMD1 dans ces cellules s'accompagne d'une très faible diminution de la production d'interleukine 8 (IL-8), la principale chemokine recrutant les polynucléaires neutrophiles et sécrétée par l'épithélium bronchique. Des résultats similaires obtenus sous stimulation par l'IL-1 β n'ont pas été inclus dans l'article en préparation mais sont présentés ici à sa suite.

2. 1. Article en préparation

Title Page

COMMD1 modulates the noxious inflammation in cystic fibrosis

Alix de Becdelièvre^{1,2,3}, Abdel Aissat^{1,2}, Loic Drévillon³, Jérémy Rocca^{1,2}, Alexandre
Hinzpeter^{1,2}, Agathe Tarze^{1,2} and Pascale Fanen^{1,2,3*}

¹ Inserm U955, Créteil, 94000, France ; ² Université Paris Est, Créteil, 94000, France ; ³
AP-HP; CHU H. Mondor, Génétique, Créteil, France.

*Corresponding author: Pascale Fanen, MD, PhD, INSERM U955, Equipe 11,
Hôpital Henri Mondor
Créteil, F-94010, France.
Tel: 33 1 49 81 28 54. Fax: 33 1 48 99 33 45.
E-mail: pascale.fanen@inserm.fr

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the *CFTR* gene, which encodes an epithelial anion channel. Morbidity is mainly due to the lung disease, characterized by a chronic neutrophilic inflammation. Deregulation of inflammatory pathways is observed in the airways of CF patients, as evidenced by an exaggerated AP-1 activity and NF- κ B response, causing an increase in the local release of pro-inflammatory cytokines such as IL-8. COMMD1 is a pleiotropic protein involved in the trafficking of CFTR but also in inflammatory processes. We studied the influence of COMMD1 overexpression on NF- κ B pathway in CF and non-CF bronchial epithelial cells (IB3-1 and S9 respectively). We show that COMMD1 inhibits NF- κ B dependant transcription and participate to decrease IL-8 secretion. Our results show for the first time the anti-inflammatory properties of COMMD1 in bronchial cells, which open new avenues for therapeutic approach

Introduction

Cystic fibrosis (CF) (MIM#219700) is one of the most common autosomal recessive diseases in Caucasians (Welsh, et al., 2001) caused by mutations in the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (*CFTR*) gene (OMIM*602421) encoding an epithelial c-AMP dependent chloride channel (Anderson, et al., 1991; Riordan, et al., 1989). The most life-threatening complication of CF is the chronic lung disease, characterized by recurrent bacterial infections and an excessive neutrophilic inflammation (Tirouvanziam, et al., 2002). The origin of this exaggerated inflammation is still discussed, and might be due to multiple factors such as the folding defect of the most frequent mutation, F508del, and the subsequent endogeneous cell stress (Thibodeau, et al., 2010), the defect of functional wt-CFTR channel which has been recently shown to have anti-inflammatory properties (Hunter, et al., 2010; Vij, et al., 2009) and chronic infection. Nevertheless, whatever the primary cause, it is a consensus that the inflammatory response to infection is dysregulated and excessive in CF, which could be attributed to an inappropriate activation of NF- κ B and AP-1 pathways (Jacquot, et al., 2008).

Airways epithelial cells participate to innate immune response and express chemokines and cytokines, resulting in recruitment and activation of polymorphonuclear neutrophils (PMN) (Elizur, et al., 2008). Benefit action of PMN in acute inflammation can turn pejorative in chronic situations. Indeed, these cells release cytokines, chemokines, reactive oxygen species (ROS) and proteases such as elastase, which amplify inflammation and lead to progressive irreversible parenchyma destruction (Downey, et al., 2009; Sampson, 2000). The most PMN chemoattractant secreted by airways epithelial cells is interleukin 8 (IL-8), of which the amount has been reported in numerous studies to be increased in CF airways fluids (Bonfield, et al., 1999; Muhlebach, et al., 2004).

NF- κ B is a dimeric transcription factor involved in the regulation of various biological processes including immune and inflammatory responses, as well as cellular differentiation, survival and proliferation (Gilmore, 2006; Hayden and Ghosh, 2011). In most cells, NF- κ B (mainly the RelA/p50 dimer) is present as an inactive complex, bound to its inhibitor I κ B in the cytoplasm. In response to various signals, I κ B is phosphorylated, ubiquitinated, and subsequently undergoes proteasomal degradation. This allows the translocation of NF- κ B to the nucleus where it binds *cis*-acting elements on the promoters of a subset of genes and regulates their transcription. IL-8 (CXCL8) belongs to such NF- κ B responsive genes, and is tightly regulated at the transcriptional level in reaction to inflammatory *stimuli*, through a NF- κ B binding element proximal to the TATA box within its promoter (Edwards, et al., 2005; Mukaida, et al., 1990).

COMM domain-containing 1 (COMMD1) is a pleiotropic factor involved in multiple pathways, as copper metabolism (Burstein, et al., 2004; de Bie, et al., 2007), sodium excretion (Biasio, et al., 2004), inflammatory responses (de Bie, et al., 2006; Ganesh, et al., 2003), and adaptation to hypoxia (van de Sluis, et al., 2010; van de Sluis, et al., 2007b). It mainly acts as a scaffold protein and stabilizes protein-protein interactions. Hence, it regulates the proteasomal degradation of various proteins in promoting their association with their specific E3 ubiquitin ligases (Ke, et al., 2010; Maine, et al., 2007; Mao, et al., 2011). We recently showed that COMMD1 promotes CFTR cell surface expression through regulation of its ubiquitination (Drevillon, et al., 2011). Though COMMD1 predominantly localizes in the cytoplasm, as a soluble protein or associated to intra-cellular membranes, a minor fraction of the protein has also been reported in the nucleus (Muller, et al., 2009). These two fractions of COMMD1 have been shown to inhibit NF- κ B pathway in various cell lines (Geng, et al., 2009; Maine, et al., 2007). In the cytoplasm, COMMD1 protects the NF- κ B inhibitor I κ B α from ubiquitination by the SCF ^{β -TrCP} complex, and from its subsequent degradation (Ganesh,

et al., 2003), and in the nucleus it recruits the ESC^{SOCS1} ubiquitin ligase to the NF- κ B/chromatin complex, leading to ubiquitination and degradation of the RelA NF- κ B subunit in various cell lines (Thoms, et al., 2010; van de Sluis, et al., 2007a).

In this study we investigated the ability of COMMD1 to restrain the abnormal inflammation observed in CF airways, and focused on the expression of the pro-inflammatory chemokine IL-8 in bronchial epithelial cells and showed that COMMD1 participates to the modulation of the exacerbated inflammation in cystic fibrosis.

Results

IL-8 transcription is NF- κ B and AP-1 dependent in bronchial epithelial cells

To study the role of COMMD1 in the pulmonary CF inflammation, we chose two bronchial epithelial cell lines. IB3-1 are compound heterozygous [F508del]+[W1282X] and are usually used as a cystic fibrosis model cell line (CF cells). S9 are IB3-1 cells corrected with a wild -type CFTR cDNA and are considered as non CF cells (Zeitlin, et al., 1991). We first assessed IL-8 promoter activity in response to two different inflammatory signals TNF α and RelA. Luciferase activity driven by IL-8 promoter was measured 24 hours after transfection in basal condition and under stimulation by TNF α (10 ng/ml, 4 hours) or RelA (co-transfection, 24h) (n=3) (Figure 1A). TNF α is known to induce a signalling cascade leading in part to I κ B degradation and nuclear translocation of the NF- κ B dimer, RelA (p65) and p50 being the main NF- κ B subunits. Co-transfection of the wild-type IL-8 promoter reporter vector with a RelA expression vector induced the production of luciferase as TNF α , indicating that at least a part of the observed TNF α stimulation could be mediated by NF- κ B. IL-8 promoter contains several binding sites for transcription factor related to inflammatory pathways (Figure 1B), a NF- κ B responsive element, a NF-IL6 site (C/EBP like factor) and an AP-1 site (Mukaida, et al., 1990). To investigate their respective role in the regulation of IL-8 promoter transcriptional activation in our inflammatory conditions and cell lines, we used a set of luciferase reporter vectors under the control of different IL-8 promoters, wild-type or mutated on one of each *cis*-acting site. Following transfection of the IL-8 promoter plasmids, IB3-1 and S9 cells were incubated for 4 hours with TNF α (10ng/ml). As expected, the wild-type IL-8 promoter transcriptional activity was increased by the pro-inflammatory peptide TNF α (Figure 1C). These results indicate that maximal activation of the IL-8 promoter required the integrity of the NF- κ B and the AP-1 binding sites. Indeed, mutation of the NF-IL6 site did not change the promoter transcriptional activity nor at the basal neither at the

stimulated level. By contrast, mutation of the NF- κ B binding site resulted in a dramatic decrease of the promoter activity and abolished the TNF α -mediated activation, underlining the major role of NF- κ B in IL-8 transcription in our conditions. Mutation of the AP-1 site also reduced IL-8 transcription, but TNF α -induced activation was maintained, probably due to the intact NF- κ B responsive element in this vector.

COMMD1 inhibits NF- κ B transcriptional activity in bronchial epithelial cells.

As the IL-8 transcription is NF- κ B dependent, and due to the previously described anti-NF- κ B activity of COMMD1, we sought to address whether COMMD1 could impact on IL-8 regulation. However, COMMD1 anti-inflammatory activity had never been assessed in pulmonary cells. Due to possible cell specificity, we evaluated as a first step the inhibition of NF- κ B transcriptional activity by COMMD1 in our model. We first performed immunoblotting of cellular extracts with an anti-COMMD1 antibody to confirm over-expression of COMMD1 and compared its level to endogeneous rate (Figure 2A). We then used a luciferase reporter plasmid containing five sequential NF- κ B binding sites upstream of a minimum promoter element, pNF- κ BLuc. Basal NF- κ B activity was similar in CF and non CF cells, and had a significant 40% inhibition when COMMD1 was over-expressed (Figure 2B). As expected, induction of inflammation by TNF α caused a higher NF- κ B activation in IB3-1 than in S9 cells, which reflected the hyper-inflammatory natural state of the CF cells. In both cell lines, induction of NF- κ B transcription activity was partially inhibited by over-expression of COMMD1, leading to a luciferase signal 20% lower. Interestingly, NF- κ B activity in stimulated IB3-1 over-expressing COMMD1 was not significantly different from NF- κ B activity in stimulated S9, suggesting that COMMD1 acts as a buffer to restrain the magnitude of rise of inflammation following a pro-inflammatory *stimulus*, whatever the CF or non CF status is.

IL-8 transcription is not affected by COMMD1-mediated NF- κ B transcriptional activity inhibition

After assessment of the anti-NF- κ B properties of COMMD1 in bronchial epithelial cell lines, we evaluated as a second step its effect on IL-8 modulation. Considering the importance of the NF- κ B binding site to conserve basal and stimulated activity of the IL-8 promoter, we addressed whether the observed COMMD1-mediated inhibition of NF- κ B transcriptional activity was associated with a decrease of IL-8 production. We first tested the influence of COMMD1 over-expression on IL-8 promoter activity by a luciferase assay. Despite its anti-NF- κ B activity, COMMD1 had no detectable effect on wild-type IL-8 promoter at the basal as well as the stimulated level (Figure 3A). COMMD1 has been reported to be involved in a variety of signalling pathways, including stabilization of other transcription factors (HIF), and we wanted to test the hypothesis that COMMD1 effect on NF- κ B binding site was masked by its influence on another promoter element. Therefore, we tested over-expression of COMMD1 on the promoter mutated on the κ B site, but as for the wt-promoter, no effect was observed (data not shown). Despite the evidence that COMMD1 did not modulate the -133 pb IL-8 promoter construct, we controlled this result by quantification of total IL-8 mRNA (Q-PCR) (Figure 3B). Although the results were not statistically significant, there seemed to be slight decline in IL-8 mRNA expression in COMMD1-over-expressing cells under TNF α stimulation. As a subtle change in mRNA can affect in a large manner variations in the protein traduction, we measured IL-8 secretion in the culture medium, in the same conditions (Figure 3C). The 4 hours long TNF α stimulation was efficient, as IL-8 secretion rose from less than 1 pg/ml/ μ g (10^3 cells) to over 15 pg/ml/ μ g (10^3 cells). While no effect was observed at the basal level (data not shown), secreted IL-8 amount had a 15 to 20% decrease when COMMD1 was overexpressed in IB3-1 and S9 in inflammatory conditions.

Discussion

Bronchoalveolar liquid of CF patients contains high levels of neutrophils and proinflammatory cytokines such as IL-8, IL-6, IL1- β (Jacquot, et al., 2008; Muhlebach, et al., 2004), and decreased level of the anti-inflammatory IL-10 cytokine (Saadane, et al., 2005; Soltys, et al., 2002), which have been attributed to deregulations of the NF- κ B and AP-1 pathways. Besides the chronic infection, the exaggerated noxious persistent NF- κ B activation has been directly related to the absence of functional CFTR and/or the production of a mutated channel (DiMango, et al., 1998; Hunter, et al., 2010; Thibodeau, et al., 2010; Vij, et al., 2009).

However, comparisons of pro-inflammatory genes expression can be complicated by the cells whole genetic backgrounds between CF and non CF cells, especially in primary cell lines. Therefore, we choose to use two immortalized cell lines derived from the same patient: the IB3-1 (F508del/W1282X) cells and the corrected S9 cells. We didn't employ the C38 line which are IB3-1 cells stably transfected by a wt-CFTR cDNA lacking the 1st extracellular loop and used S9 which are corrected by the entire wt-CFTR cDNA. In our experience and consistent with other data, C38 cells display very low levels and different patterns in secreted inflammatory markers and thus are more discriminant than S9 cells compared to the CF model IB3-1 (Fink, et al., 2003). In our model, although basal NF- κ B transcriptional activity was similar in IB3-1 and S9 cells, the amplitude of TNF α mediated NF- κ B activation was more important in IB3-1 cells, consistent with higher activation of NF- κ B in CF versus non-CF cells previously described (Eidelman, et al., 2001; Jacquot, et al., 2008; Kube, et al., 2001; Tabary, et al., 2006; Venkatakrishnan, et al., 2000). Recently, Bhattacharyya *et al.* found in IB3 cells an elevated ratio of the inflammatory kinase phospho-Akt/Akt suggesting a high NF- κ B pathway activation in CF bronchial epithelial cells (Bhattacharyya, et al., 2011). However, in our model, the increase in NF- κ B global transcriptional activity was not followed by a rise

in IL-8 expression in CFTR-defective IB3-1 cells as compared to S9. IL-8 expression responds to many *stimuli*, which activate various pathways, and its secretion in CF cells vs non CF varies according to the studies. For example, Boncoeur *et al* found an earlier mRNA increase in S9 cells which reached the same level as IB3-1 cells after 48h of hyperoxidative stress exposure (Boncoeur, et al., 2008).

After 4 hours of TNF α induction (10 ng/mL), IL-8 secretion stimulation was in part due to transcriptional activation of its encoding gene (*CXCL8*), as illustrated by mRNA quantification and promoter luciferase assays. The IL-8 promoter contains three major *cis*-regulating elements which can bind respectively AP-1, NF/IL6 and NF- κ B. The relative importance and the cooperation of these transcription factors on IL-8 expression seem to be cell and stimulus specific. In normal bronchial epithelial cells BEAS-2B, IL-1 β induced IL-8 promoter activation has been shown to be governed by NF- κ B and NF-IL6 (Edwards, et al., 2005), whereas all the three factors are necessary in case of hypersaline stimulus (Chan, et al., 2006), and the AP-1 pathway plays a central role in response to pneumococcal infection (Schmeck, et al., 2006). Our IL-8 transcriptional pattern in IB3-1 and S9 epithelial cells was similar to that described by Cigana *et al* in the other bronchial epithelial cell line 16HBE without any stimulation (Cigana, et al., 2006). In our conditions, NF- κ B appeared as a constitutive trans-activator, since mutation of its binding sequence abolished the basal luciferase expression as well as the TNF α stimulated expression. AP-1 pathway participated to this constitutive regulation, but was not essential to the stimulated expression in our reporter system. However, IL-8 may be also regulated by other NF- κ B target genes. Actually, decoy by oligodeoxynucleotide (ODN) specific of IL-8 NF- κ B binding element was less efficient to decrease mRNA of pro-inflammatory genes including IL-8 itself, than less specific NF- κ B ODNs in airway epithelial cells (Bezzetti, et al., 2008), suggesting that other *cis*-elements may be involved in IL-8 NF- κ B mediated expression.

COMMD1 is a widely expressed pleiotropic protein, which can bind a growing number of protein or lipid partners, including the other members of the COMMD family and the NF- κ B family, and PIP₂ involved in membrane complexes (Burkhead, et al., 2009; Burstein, et al., 2005; de Bie, et al., 2006). Given the huge variety of possible interactions, tissue-specific modulations could be expected. The anti-inflammatory activity of COMMD1 has been reported by others in various cell lines, mostly HEK and HeLa cells but also T lymphocytes, HT-29 intestinal cells and U2OS osteosarcoma cells with an epithelial morphology (Ganesh, et al., 2003; Maine and Burstein, 2007; Muller, et al., 2009), and to our knowledge we are the first to show a comparable effect in bronchial epithelial cells. Over-expression of COMMD1 inhibits the NF- κ B mediated transcription by stabilizing phospho-I κ B α in the cytoplasm (Ganesh, et al., 2003) and destabilizing the NF- κ B/chromatin complex in the nucleus (Maine, et al., 2007). Others underlying mechanisms should participate to this pathway, since the mRNA levels of NF- κ B target genes continue to accumulate after nuclear levels of RelA (p65) are back to baseline (Maine, et al., 2007). As visualized by immunofluorescence, RelA nuclear translocation in our conditions was transient, with a maximal amount after 30 minutes of TNF α stimulation (data not shown). After 4 hours, the time we chose to measure the luciferase reporters activities and IL-8 mRNA, RelA was down to baseline in the nucleus. In our conditions, NF- κ B inhibition was obtained without any significant variation in nuclear translocation of its main subunit RelA, concordant with a major nuclear mechanism. Unfortunately, we didn't notice a nuclear translocation of COMMD1 nor after 4h neither after 30 minutes of TNF stimulation. However, COMMD1 nuclear expression was low in our cell lines and nuclear fraction difficult to evaluate. Transient transfection was sufficient to obtain the anti-NF- κ B effect, although the total cellular amount was only increased by a two- to threefold. This accounts for an effect of the protein depending on very subtle quantity variations. Maine *et al.* have reported on the difficulty to transiently over-express COMMD1,

due to endogenous regulation (Maine, et al., 2009; Rowe, et al., 2005). Nevertheless, mutations in the two Nuclear Export Signals (NES) of COMMD1 are responsible of nuclear confinement of the protein and increase in the NF- κ B transcriptional activity (Muller, et al., 2009). Such a construction could be helpful in our case to further study the anti-inflammatory role of COMMD1.

In our model, COMMD1 mediated NF- κ B transcriptional inhibition did not impact on the IL-8 promoter activity of the reporter system. However, over-expression of COMMD1 was associated to a slight decreased in IL-8 endogenous mRNA amount and in IL-8 secreted protein under TNF α stimulation. In accordance with our results, COMMD1 has been shown to inhibit NF- κ B mediated transcription in a selective manner, as illustrated by the pronounced effect on the *ICAM1*, *BIRC3* (encoding c-IAP2) and *CXCL1* genes contrasting with the merely noticeable reduction of IL-8 expression in HEK cells (Maine, et al., 2007). In our model, although slight, the diminution of IL-8 protein was significant after 4 hours of TNF α stimulation. IL-8 is a potent PMN chemo-attractant, which participates to amplify the inflammatory reaction. Buffering its secretion in response to various *stimuli* could participate to limit in a significant manner the exacerbated inflammation, which characterizes CF and other chronic pulmonary diseases.

A main feature of CF is the abnormal balance between fluid and electrolyte transport, with a reduced chloride secretion and an increased sodium absorption in the pulmonary epithelium (Rowe, et al., 2005). The amiloride sensitive sodium channel ENaC (Epithelial sodium channel) is a key regulator of Na⁺ reabsorption at the apical membrane of the respiratory epithelium cells and participates to maintain isosmotic airway liquid in normal respiratory tract. ENaC is physiologically controlled by CFTR, and its increased activity worsened the airways liquid dehydration and the mucus thickening in CF. COMMD1 has been recognized as an inhibitor of ENaC, through regulation of ubiquitination and removing from the cell

membrane by endocytosis of the channel (Biasio, et al., 2004; Ke, et al., 2010). Moreover, we have recently shown that COMMD1 promotes cell surface expression of wt-CFTR through regulation of ubiquitination (Drevillon, et al., 2011). These two beneficial features add up to the inflammation buffering observed in the present study.

Reduced expression of COMMD1 has been described in the cancer field, including seminoma, pancreatic, ovarian and breast cancer. It is associated to increased tumor invasion and worse survival (van de Sluis, et al., 2010). Zoubeidi et al recently published about secretory Clusterin (sCLU), a stress activated chaperone protein which promotes endogenous COMMD1 degradation under inflammatory conditions and which is over-expressed in some cancers. A pharmacological sCLU inhibitor (OGX-011) is currently in phase II and phase III clinical trials in prostate, breast and lung cancer (Saad, et al., 2011). Considering the benefit potential of COMMD1 in CF airways, the therapeutic use of a COMMD1 modulator in another health field appears encouraging, however progress in the knowledge of COMMD1 in cystic fibrosis remains necessary.

Materials and methods

Cell lines and reagents. CF lung epithelial IB3-1 and CFTR-corrected lung S9 cell lines were purchased from ATCC. The IB3-1 cell line (CF cells) is an adeno-12-SV40-immortalized human bronchial epithelial cell line, CFTR-deficient, derived from a CF patient with the heterozygous F508del/W1282X mutations. The S9 cell line (corrected cells) was IB3-1 derived, stably expressing a transfected functional CFTR channel. Both cell types were maintained in LHC-8 medium (Invitrogen, France), supplemented by 10% foetal bovine serum in a humidified CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂) without any antibiotic.

Plasmid constructs and transient transfection. To over-express COMMD1 in IB3-1 and S9 cells, we used the entire coding sequence of the human COMMD1 cDNA subcloned into the plasmid pcDNA3.1/V5-His TOPO® (Invitrogen). The mock pcDNA3.1/V5-His vector was transfected as a negative control in the COMMD1 over-expression assays. To assay the transcriptional activity of NF-κB, we used pNF-κBLuc, a luciferase reporter plasmid containing five sequential NF-κB binding sites upstream of a minimum promoter element, NF-κB-Luc (Stratagene). The transcriptional activity of IL-8 promoter was evaluated with reporter constructs consisting of the IL-8 promoter (-133 bp relative to the transcription start site) wild type or mutated on *cis* -acting sites (NF-κB, AP1, NF-IL6 (C/EBP)) and fused to the *Luciferase* gene, kindly provided by Naofumi MUKAIDA. Cells were seeded in 12 well-dishes (1,2.10⁵ cells/well) and transfected with lipofectamine 2000 ® reagent (Invitrogen Life technologies) according to the manufacturer's protocol. To normalize transfection efficiency, a Renilla luciferase reporter vector (pRL-TK) was co-transfected with each of the firefly luciferase constructs. After 24h of transfection, cells were treated with TNFα (10ng/mL) (Sigma) for 4 hours.

Luciferase assay. Cells were lysed with the Passive Lysis Buffer (Promega) and luciferase activity in the cellular extracts was determined by the Dual Luciferase Assay System

(Promega) using a luminometer (Tristar; Berthold). The results were normalized in terms of those obtained for the Renilla luciferase reference plasmid used as transfection efficiency control, and the values were expressed as the relative luminometric intensity (Luciferase/Renilla). In each experiment, the results were compared to a control condition, to which the value of 1 RLU (RLU: Relative Luminetric unit) was attributed. Data shown are the means (SEM) of three independent experiments.

SDS-PAGE and immunoblotting. Equal amounts of total cell protein extracts were loaded on SDS-PAGE gels (12% acrylamide) and subjected to electrophoresis. Following transfer, PVDF membranes (GE Healthcare) were blocked in Tris-buffered saline with Tween (TBST) with 5% milk and probed with the appropriate antibodies. The primary antibodies used were rabbit anti-COMMD1 (Proteintech Group) 1:1500; mouse anti- α tubulin (12G10) 1:10000, rabbit anti-laminB1(Abcam) 1:2000, mouse anti-p65 (Santa-Cruz) 1:1500. The secondary antibody was a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (1:50000) or anti-rabbit (1:10000) IgG (Sigma). The signal was detected by the enhanced chemiluminescence with the ECL Advance kit (GE Healthcare).

RNA extraction and real-time qRT-PCR. Total mRNA from IB3-1 and S9 cells was extracted using the GeneJET™ RNA Purification Kit (Fermentas, France), as directed in the manufacturer's instructions. The eluted RNA was diluted in sterile RNase-free water. Quantity was evaluated by absorbance at 260 nm and quality by gel electrophoresis on a 1% agarose gel. First strand cDNA was synthesized in RT samples, using 1 μ g of total RNA isolated from cells, Quantitative PCR of *CXCL8* (IL-8) was performed with a SYBR Green I chemistry (Fast SYBR Master Mix from Applied Biosystems). Normalization was achieved by quantification of the expression of MBD4 mRNA chosen as control housekeeping gene (HKG) among four HKG tested because of their stable expression in the different conditions of the experiment, and/or its adequate expression level as compared with the IL-8 mRNA. All

PCR conditions were adjusted in order to obtain equivalent optimal amplification efficiency between the different assays. All PCR experiments were done in duplicate.

IL-8 immunoassay. IL-8 secretion into the supernatant of IB3-1 and S9 cells was evaluated employing IMMULITE 1000 Automated Analyser (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA), using the commercially available Immulite chemiluminescent enzyme immunometric assays (Immulite[®], DPC, Los Angeles, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Analytical sensitivity and intra-assay and between assay coefficients of variation were respectively 2 pg/ml, 3.8% and 7.4% for IL-8.

Statistical analysis. Data are presented as the means +/- SEM of at least three experiments. IL-8 concentrations, fold changes versus control cells, or values normalized for dual luciferase assay are given as indicated. Data were compared using the paired unilateral Student's t test. A value of $p < 0,05$ was considered statistically significant (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$).

Figures and legends to figures

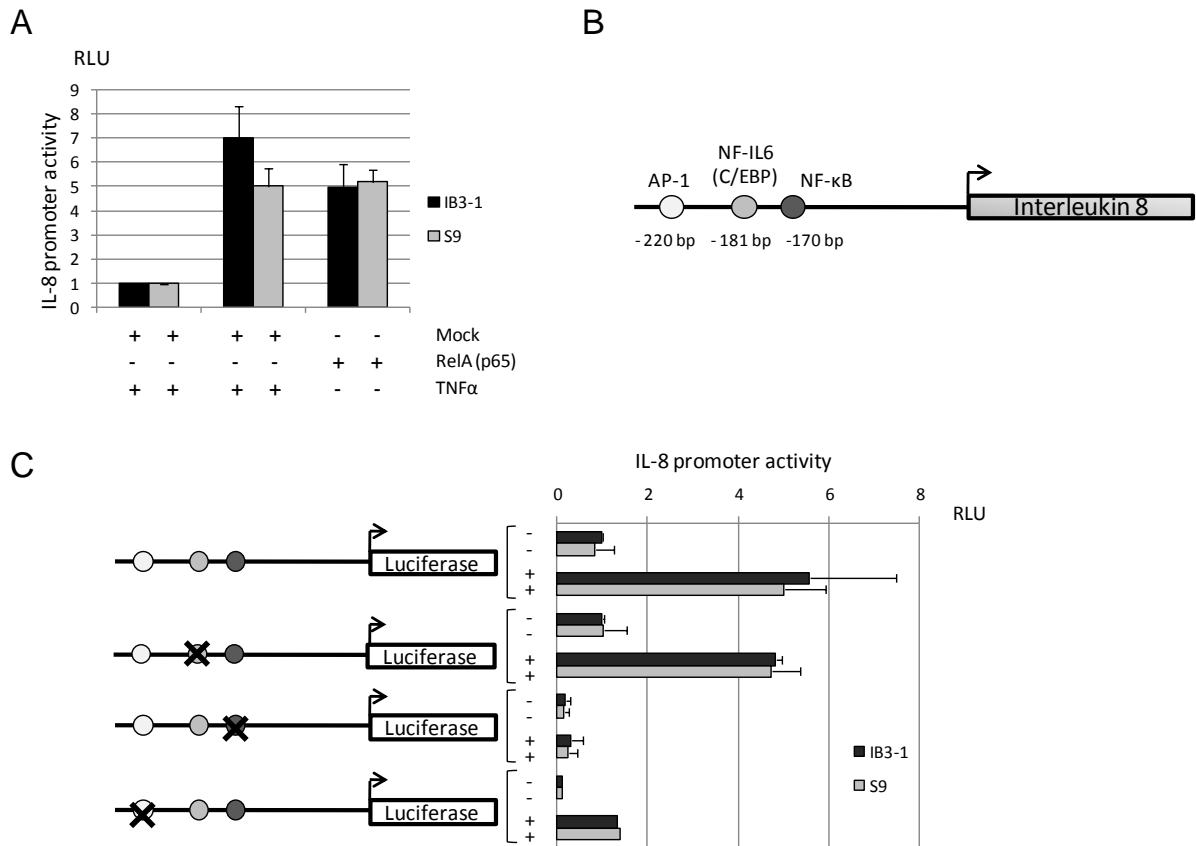


Figure 1. Transcriptional activity of interleukin 8 promoter in IB3-1 and S9 cells. A : IL-8 promoter activity in response to inflammatory signals. Luciferase activity driven by IL-8 promoter was measured 24h after transfection in basal condition and under stimulation by TNF α (10 ng/ml, 4 hours) or RelA (co-transfection, 24h) (n=3). B : IL-8 promoter contains binding sites for inflammatory related transcription factors. Positions are relative to the adenine of the translation codon at +1. C : Evaluation of the importance of three transcription factors binding sites (AP-1, NF-IL-6 and NF- κ B) in IL-8 promoter, in basal condition or after stimulation by TNF α (10ng/ml, 4 hours). Wild-type promoter (n=6), mutation in NF-IL6 binding site (n=2), mutation in κ B binding site (n=4) and mutation in AP1 binding site (n=1).

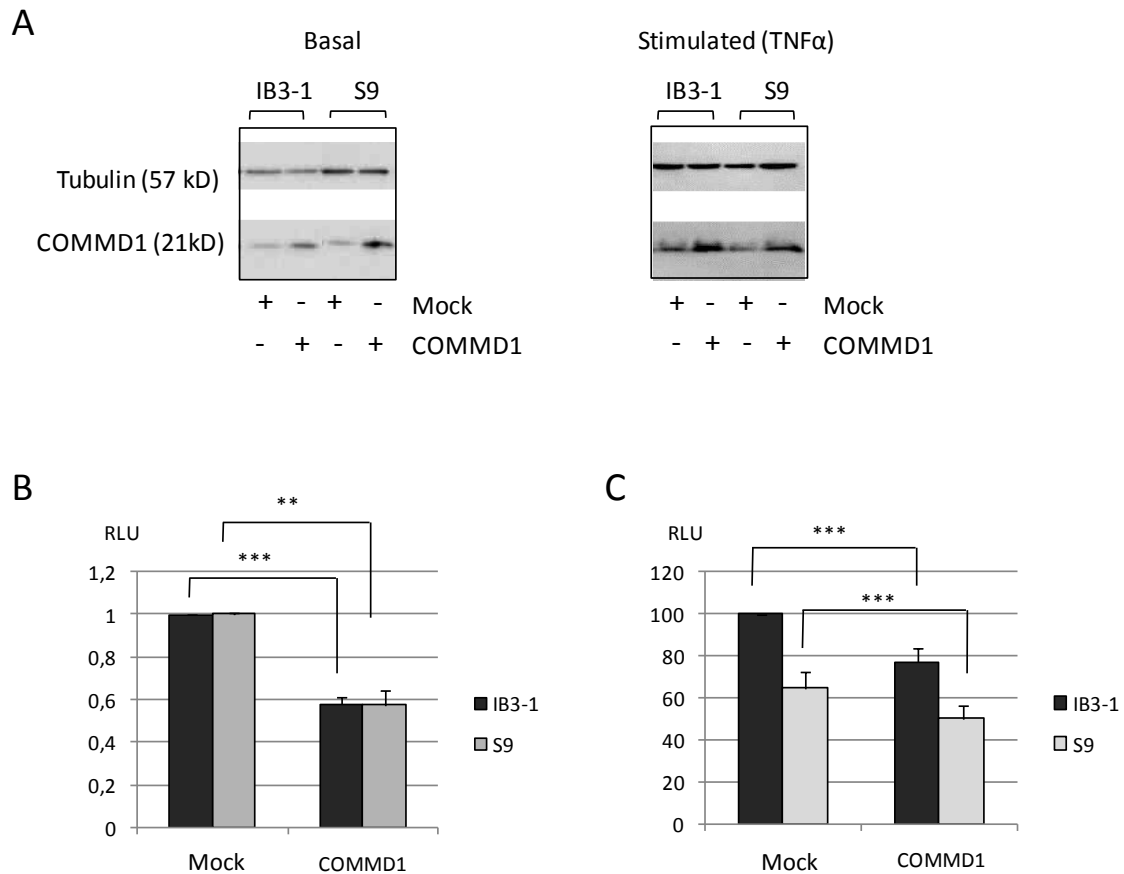


Figure 2. COMMD1 inhibits the NF- κ B transcriptional activity in bronchial epithelial cells.

IB3-1 and S9 cells were transfected with empty vector or expression vector encoding COMMD1 along with a 5 κ B-luciferase plasmid. 20 hours after transfection, cells were incubated with or without TNF- α (10ng/ml) for 4 hours. A. Immunoblotting of cellular extracts with an anti-COMMD1 antibody confirmed over-expression of COMMD1 as compared to endogenous rate. B. Luciferase activities in the lysates of unstimulated cells were measured and expressed as fold induction relative to empty-vector-transfected cells. C. Luciferase activities in the lysates of cells after 4h of TNF α exposure were measured and expressed as fold induction relative to IB3-1 transfected with the empty vector (100%). Results are means \pm S.D. for 6 independent experiments performed in triplicate. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$

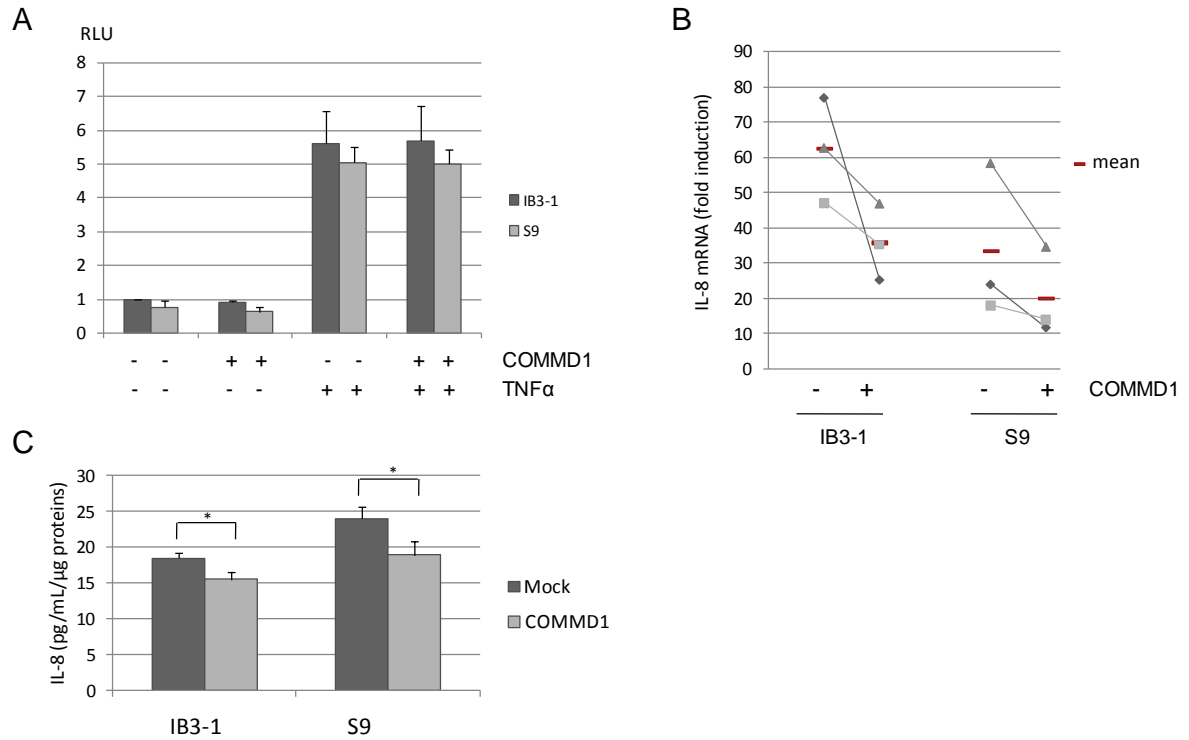


Figure 3. Evaluation of IL-8 promoter activity when COMMD1 is over-expressed. A. Over-expression of COMMD1 had no effect on IL-8 promoter activity in basal or inflammatory conditions. B: IL-8 mRNA quantification after stimulation by TNF α (10ng/ml, 4hours). Q-RT PCR (IL8/MBD4) were realized in three independent experiments. A slight decrease in IL-8 induction was observed when COMMD1 was over-expressed, but this effect was not statistically significant (unilateral paired t test : IB3 : $p=0,09$, S9 : $p=0,07$). C. Secreted IL-8 quantification in the cultured cells' supernatant after 4 hours of TNF α (10ng/mL) exposure. Results of 3 independent experiments, in means +SD; * $p<0,05$ (unilateral paired t test).

References

1. Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. 1991. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253(5016):202-5.
2. Bezzerri V, Borgatti M, Nicolis E, Lampronti I, Dehecchi MC, Mancini I, Rizzotti P, Gambari R, Cabrini G. 2008. Transcription factor oligodeoxynucleotides to NF-kappaB inhibit transcription of IL-8 in bronchial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39(1):86-96.
3. Bhattacharyya S, Balakathiresan NS, Dalgard C, Gutti U, Armistead D, Jozwik C, Srivastava M, Pollard HB, Biswas R. 2011. Elevated miR-155 promotes inflammation in cystic fibrosis by driving hyperexpression of interleukin-8. *J Biol Chem* 286(13):11604-15.
4. Biasio W, Chang T, McIntosh CJ, McDonald FJ. 2004. Identification of Murr1 as a regulator of the human delta epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 279(7):5429-34.
5. Boncoeur E, Criq VS, Bonvin E, Roque T, Henrion-Caude A, Gruenert DC, Clement A, Jacquot J, Tabary O. 2008. Oxidative stress induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in cystic fibrosis lung epithelial cells: Potential mechanism for excessive IL-8 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 40(3):432-46.
6. Bonfield TL, Konstan MW, Berger M. 1999. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 104(1):72-8.
7. Burkhead JL, Morgan CT, Shinde U, Haddock G, Lutsenko S. 2009. COMMD1 forms oligomeric complexes targeted to the endocytic membranes via specific interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 284(1):696-707.
8. Burstein E, Ganesh L, Dick RD, van De Sluis B, Wilkinson JC, Klomp LW, Wijmenga C, Brewer GJ, Nabel GJ, Duckett CS. 2004. A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *EMBO J* 23(1):244-54.
9. Burstein E, Hoberg JE, Wilkinson AS, Rumble JM, Csomos RA, Komarck CM, Maine GN, Wilkinson JC, Mayo MW, Duckett CS. 2005. COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J Biol Chem* 280(23):22222-32.
10. Chan MM, Chmura K, Chan ED. 2006. Increased NaCl-induced interleukin-8 production by human bronchial epithelial cells is enhanced by the DeltaF508/W1282X mutation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *Cytokine* 33(6):309-16.

11. Cigana C, Nicolis E, Pasetto M, Assael BM, Melotti P. 2006. Anti-inflammatory effects of azithromycin in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 350(4):977-82.
12. de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, Duran KJ, Berger R, Duckett CS, Wijmenga C, Klomp LW. 2006. Characterization of COMMD protein-protein interactions in NF-kappaB signalling. *Biochem J* 398(1):63-71.
13. de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, van de Berghe PV, Muller P, Berger R, Gitlin JD, Wijmenga C, Klomp LW. 2007. Distinct Wilson's disease mutations in ATP7B are associated with enhanced binding to COMMD1 and reduced stability of ATP7B. *Gastroenterology* 133(4):1316-26.
14. DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. 1998. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 101(11):2598-605.
15. Downey DG, Bell SC, Elborn JS. 2009. Neutrophils in cystic fibrosis. *Thorax* 64(1):81-8.
16. Drevillon L, Tanguy G, Hinzpeter A, Arous N, de Becdelievre A, Aissat A, Tarze A, Goossens M, Fanen P. 2011. COMMD1-mediated ubiquitination regulates CFTR trafficking. *PLoS One* 6(3):e18334.
17. Edwards MR, Mukaida N, Johnson M, Johnston SL. 2005. IL-1beta induces IL-8 in bronchial cells via NF-kappaB and NF-IL6 transcription factors and can be suppressed by glucocorticoids. *Pulm Pharmacol Ther* 18(5):337-45.
18. Eidelman O, Srivastava M, Zhang J, Leighton X, Murtie J, Jozwik C, Jacobson K, Weinstein DL, Metcalf EL, Pollard HB. 2001. Control of the proinflammatory state in cystic fibrosis lung epithelial cells by genes from the TNF-alphaR/NFkappaB pathway. *Mol Med* 7(8):523-34.
19. Elizur A, Cannon CL, Ferkol TW. 2008. Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest* 133(2):489-95.
20. Fink J, Steer JH, Joyce DA, McWilliam AS, Stewart GA. 2003. Pro-inflammatory effects of *Burkholderia cepacia* on cystic fibrosis respiratory epithelium. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38(3):273-82.
21. Ganesh L, Burstein E, Guha-Niyogi A, Louder MK, Mascola JR, Klomp LW, Wijmenga C, Duckett CS, Nabel GJ. 2003. The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature* 426(6968):853-7.

22. Geng H, Wittwer T, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Schmitz ML. 2009. Phosphorylation of NF-kappaB p65 at Ser468 controls its COMMD1-dependent ubiquitination and target gene-specific proteasomal elimination. *EMBO Rep* 10(4):381-6.
23. Gilmore TD. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25(51):6680-4.
24. Hayden MS, Ghosh S. 2011. NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* 21(2):223-44.
25. Hunter MJ, Treharne KJ, Winter AK, Cassidy DM, Land S, Mehta A. 2010. Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. *PLoS One* 5(7):e11598.
26. Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A. 2008. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40(9):1703-15.
27. Ke Y, Butt AG, Swart M, Liu YF, McDonald FJ. 2010. COMMD1 downregulates the epithelial sodium channel through Nedd4-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(6):F1445-56.
28. Kube D, Sontich U, Fletcher D, Davis PB. 2001. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(3):L493-502.
29. Maine GN, Burstein E. 2007. COMMD proteins and the control of the NF kappa B pathway. *Cell Cycle* 6(6):672-6.
30. Maine GN, Mao X, Komarck CM, Burstein E. 2007. COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *EMBO J* 26(2):436-47.
31. Maine GN, Mao X, Muller PA, Komarck CM, Klomp LW, Burstein E. 2009. COMMD1 expression is controlled by critical residues that determine XIAP binding. *Biochem J* 417(2):601-9.
32. Mao X, Gluck N, Chen B, Starokadomskyy P, Li H, Maine GN, Burstein E. 2011. COMMD1 (Copper Metabolism MURR1 Domain-containing Protein 1) Regulates Cullin RING Ligases by Preventing CAND1 (Cullin-associated Nedd8-dissociated Protein 1) Binding. *J Biol Chem* 286(37):32355-65.
33. Muhlebach MS, Reed W, Noah TL. 2004. Quantitative cytokine gene expression in CF airway. *Pediatr Pulmonol* 37(5):393-9.

34. Mukaida N, Mahe Y, Matsushima K. 1990. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 265(34):21128-33.
35. Muller PA, van de Sluis B, Groot AJ, Verbeek D, Vonk WI, Maine GN, Burstein E, Wijmenga C, Vooijs M, Reits E and others. 2009. Nuclear-cytosolic transport of COMMD1 regulates NF-kappaB and HIF-1 activity. *Traffic* 10(5):514-27.
36. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL and others. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922):1066-73.
37. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. 2005. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 352(19):1992-2001.
38. Saad F, Hotte S, North S, Eigl B, Chi K, Czaykowski P, Wood L, Pollak M, Berry S, Lattouf JB and others. 2011. Randomized Phase II Trial of Custirsen (OGX-011) in Combination with Docetaxel or Mitoxantrone as Second-line Therapy in Patients with Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer Progressing after First-line Docetaxel: CUOG Trial P-06c. *Clin Cancer Res* 17(17):5765-5773.
39. Saadane A, Soltys J, Berger M. 2005. Role of IL-10 deficiency in excessive nuclear factor-kappaB activation and lung inflammation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator knockout mice. *J Allergy Clin Immunol* 115(2):405-11.
40. Sampson AP. 2000. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 30 Suppl 1:22-7.
41. Schmeck B, Moog K, Zahlten J, van Laak V, N'Guessan PD, Opitz B, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. 2006. Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res* 7:98.
42. Soltys J, Bonfield T, Chmiel J, Berger M. 2002. Functional IL-10 deficiency in the lung of cystic fibrosis (cftr(-/-)) and IL-10 knockout mice causes increased expression and function of B7 costimulatory molecules on alveolar macrophages. *J Immunol* 168(4):1903-10.
43. Tabary O, Boncoeur E, de Martin R, Pepperkok R, Clement A, Schultz C, Jacquot J. 2006. Calcium-dependent regulation of NF-(kappa)B activation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Cell Signal* 18(5):652-60.

44. Thibodeau PH, Richardson JM, 3rd, Wang W, Millen L, Watson J, Mendoza JL, Du K, Fischman S, Senderowitz H, Lukacs GL and others. 2010. The cystic fibrosis-causing mutation deltaF508 affects multiple steps in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator biogenesis. *J Biol Chem* 285(46):35825-35.
45. Thoms HC, Loveridge CJ, Simpson J, Clipson A, Reinhardt K, Dunlop MG, Stark LA. 2010. Nucleolar targeting of RelA(p65) is regulated by COMMD1-dependent ubiquitination. *Cancer Res* 70(1):139-49.
46. Tirouvanziam R, Khazaal I, Peault B. 2002. Primary inflammation in human cystic fibrosis small airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(2):L445-51.
47. van de Sluis B, Groot AJ, Wijmenga C, Vooijs M, Klomp LW. 2007a. COMMD1: a novel protein involved in the proteolysis of proteins. *Cell Cycle* 6(17):2091-8.
48. van de Sluis B, Mao X, Zhai Y, Groot AJ, Vermeulen JF, van der Wall E, van Diest PJ, Hofker MH, Wijmenga C, Klomp LW and others. 2010. COMMD1 disrupts HIF-1alpha/beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion. *J Clin Invest* 120(6):2119-30.
49. van de Sluis B, Muller P, Duran K, Chen A, Groot AJ, Klomp LW, Liu PP, Wijmenga C. 2007b. Increased activity of hypoxia-inducible factor 1 is associated with early embryonic lethality in Commd1 null mice. *Mol Cell Biol* 27(11):4142-56.
50. Venkatakrishnan A, Stecenko AA, King G, Blackwell TR, Brigham KL, Christman JW, Blackwell TS. 2000. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23(3):396-403.
51. Vij N, Mazur S, Zeitlin PL. 2009. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS One* 4(2):e4664.
52. Welsh MJ, Ramsey BW, Accurso F, Cutting GR. 2001. Cystic fibrosis. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *Metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill. p 5121-5188.
53. Zeitlin PL, Lu L, Rhim J, Cutting G, Stetten G, Kieffer KA, Craig R, Guggino WB. 1991. A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4(4):313-9.

Les travaux exposés dans l'article en préparation ne représentent qu'une partie de nos explorations sur l'effet anti-inflammatoire de COMMD1 dans la mucoviscidose. Le même type de travail a notamment été mené sous stimulation par l'IL-1 β , mais pour des raisons matérielles les résultats moins complets ne permettaient pas de faire de tests statistiques.

2. 2. Etude de l'effet anti-inflammatoire de COMMD1 sous stimulation par l'IL-1 β

Le TNF α et l'IL-1 β sont tous deux des agents pro-inflammatoires activant notamment la voie NF- κ B, mais sont reconnus à la surface cellulaire par des récepteurs différents, entraînant des cascades de signalisation complexes et diverses. Concernant la sécrétion d'IL-8, par exemple, il a été montré que l'inhibition de NF- κ B par oligodecoy dans les cellules IB3-1 a moins d'effet en présence de TNF α qu'en présence d'IL-1 β (Bezzetti, et al., 2008).

2.2.1. COMMD1 inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- κ B sous IL-1 β

Comme dans les conditions décrites précédemment, l'activité transcriptionnelle de NF- κ B a été évaluée dans les cellules IB3-1 et S9 à l'aide de notre gène rapporteur *luciférase* pNF- κ BLuc. 24h après transfection, les cellules ont été soumises à un stress de 4h d'IL-1 β (0,5ng/mL). Sous stimulation IL-1 β , comme sous TNF α , l'activité NF- κ B est stimulée de manière légèrement plus importante dans les IB3-1 par rapport aux S9 ($p < 0,005$). En revanche, alors que sous TNF α COMMD1 montrait une activité anti-NF- κ B équivalente dans les cellules CF et non CF d'environ 20% ($p < 0,005$) (Figure 2, p.162), cet effet inhibiteur sous IL-1 β semble moins important dans les cellules IB3-1 (diminution d'environ 20%, mais statistiquement non significative, $p=0,095$) que dans les S9 (diminution d'environ 40%, significative ($p < 0,01$)) (Figure 55).

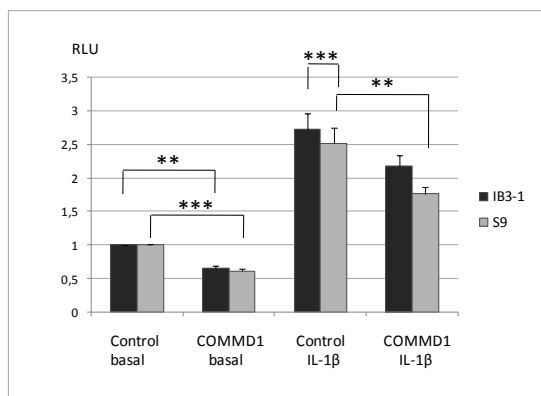


Figure 55. Mesure de l'activité anti-NF-κB de COMMD1 sous IL-1β (0,5ng/mL, 4 heures). La co-transfection de COMMD1 avec un plasmide rapporteur luciférase comportant un promoteur répondant à NF-κB (pNF-κBLuc, Stratagene) montre que COMMD1 diminue l'activité transcriptionnelle de NF-κB dans les cellules IB3-1 et S9 en condition basale et dans les S9 sous stimulation par l'IL-1β de manière significative. La diminution de l'activité NF-κB dans les IB3-1 sous stimulation n'était pas significative ($p=0,095$). Résultats de quatre expériences indépendantes, test unilatéral pairé de Student : ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

2.2.2. Effet de COMMD1 sur la production d'IL-8

Nous avons voulu étudier si l'inhibition de NF-κB médiée par COMMD1 sous IL-1β avait des répercussions sur la production d'IL8. Nous n'avons pas exploré l'activation transcriptionnelle du promoteur IL-8 sous IL-1β, mais avons directement mesuré la quantité d'ARNm d'IL-8 présente dans les cellules après 4h de stimulation (Figure 56). Bien que la quantité d'ARNm codant l'IL-8 semble plus importante dans les cellules CF sous IL-1β, la différence entre les IB3 et les S9 n'est pas significative ($p=0,07$) (Figure 56 A). Les trois expériences indépendantes de RT-PCR quantitative montrent une diminution de la quantité d'ARNm IL-8 lorsque COMMD1 est surexprimée. Cependant, cet effet n'est significatif que dans les cellules IB3-1 ($p=0,04$). La quantité d'IL-8 sécrétée dans le surnageant de culture est équivalente pour les IB3-1 et les S9, et il n'y a pas de différence significative entre les cellules sur-exprimant COMMD1 et les cellules contrôle (Figure 56 B). Cependant, sous IL-1β, la diminution moyenne est de 27% pour les IB3-1, et d'environ 15% pour les S9 avec une différence de réaction entre les deux lignées proche de la significativité statistique ($p=0,051$, test de Student pairé bilatéral). Nous allons donc répéter ces expériences pour voir si elles atteignent un seuil significatif.

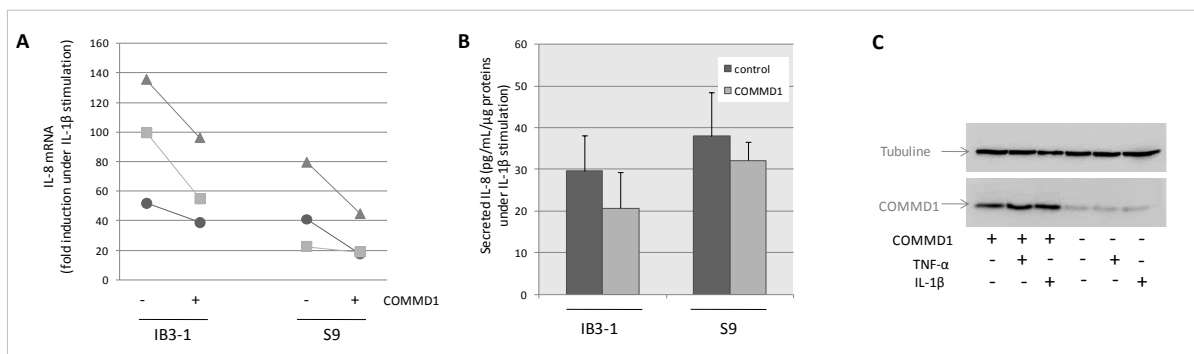


Figure 56. Effet de COMMD1 sur la production d'IL-8 dans les cellules IB3-1 et S9. (A) Evaluation par Q-PCR de la quantité de transcrits de l'IL-8 après 4h d'exposition à l'IL-1 β (0,5ng/mL). Présentation des mesures de 3 expériences indépendantes, amplifications en SYBR Green, expression rapportée au gène de ménage MBD4. La diminution de l'ARNm observée dans les cellules sur-exprimant COMMD1 est significative pour les cellules IB3-1. **(B)** Mesure par Immunoréaction de la quantité de protéine IL-8 présente dans le surnageant de culture, après stimulation par IL-1 β . Représentation de 3 expériences indépendantes, avec mesures par le kit Immulite 1000 IL-8. **(C)** Vérification de l'efficacité de la surexpression de COMMD1 en western-blot.

2.3. Mise en place des outils permettant d'étudier le mécanisme de l'activité anti-NF- κ B de COMMD1 sous stimulation

Nous voulions savoir, si, comme rapporté dans la littérature, le mécanisme principal d'inhibition de la transcription NF- κ B dépendante passait par la diminution de la stabilité du complexe NF- κ B/chromatine. L'observation de la cinétique de translocation nucléaire de RelA, principale sous unité de NF- κ B sous stimulation nous a permis d'observer que dans nos conditions, la translocation était maximale après environ 30 minutes de stimulation (Figure 57).

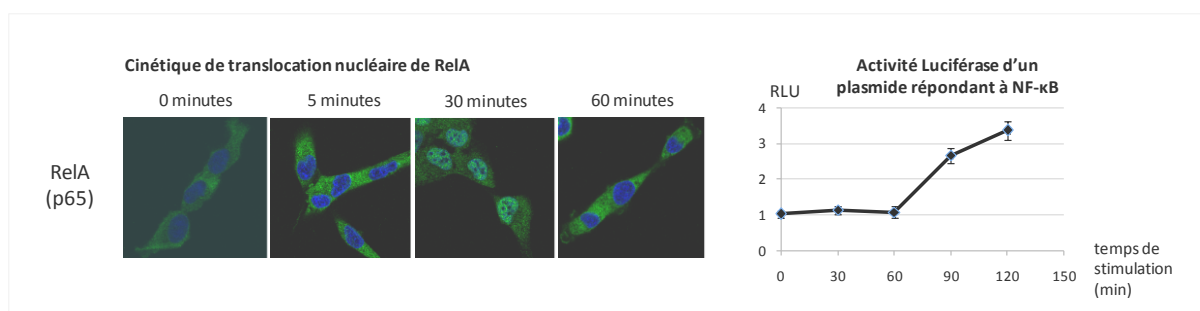


Figure 57. Cinétique d'activation de la voie NF- κ B sous TNF α (10ng/mL). Sous TNF α , la translocation nucléaire de RelA n'est pas visible avant 5 min. Un maximum de translocation est observé vers 30 min, puis la localisation de RelA redevient majoritairement cytoplasmique après 1h. Des résultats similaires ont été obtenus sous IL-1 β (0,5ng/mL) avec cependant une translocation apparemment moins uniforme à 30 minutes. L'effet transcriptionnel de NF- κ B se répercute sur l'activité luciférase à partir d'1h environ.

Nous avons donc choisi le temps de 30 minutes de stimulation TNF α pour étudier la liaison de NF- κ B à la chromatine par le système No-shift Transcription Factor Binding Assay qui permet l'évaluation par réaction colorimétrique de la quantité de facteur de transcription se liant à des sondes d'ADN dans un système en plaques 96 puits avec révélation par un anticorps secondaire marqué à l'HRP (*Horse Radish Peroxydase*). Actuellement, les outils ont été mis au point au laboratoire (Figure 58), mais les analyses en condition de surexpression de COMMD1 n'ont pas encore pu être réalisées, du fait de problèmes techniques.

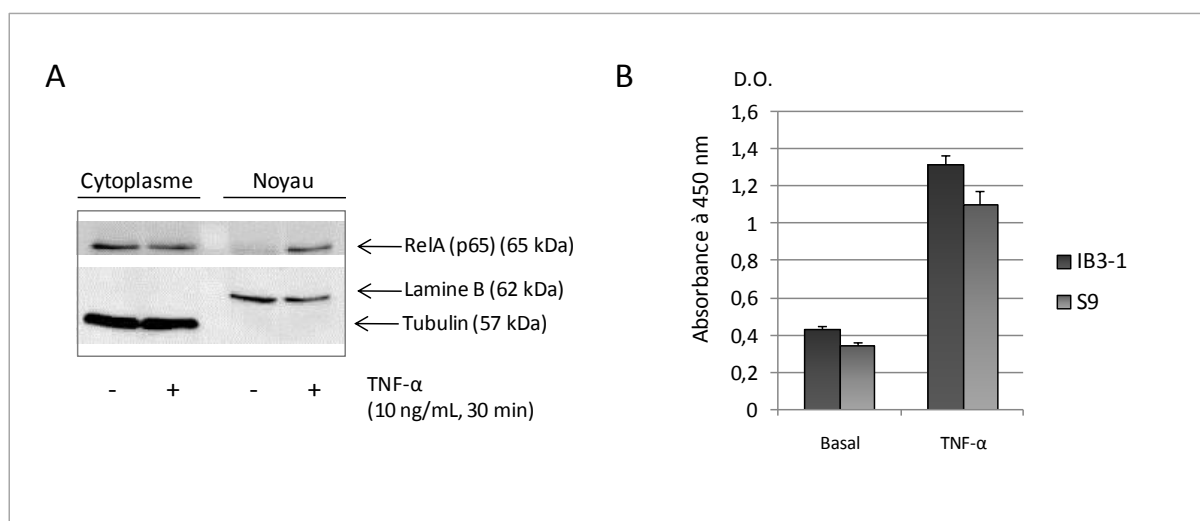


Figure 58. Mise au point des conditions d'étude de l'effet de COMMD1 sur la transcription médiée par RelA. (A) Observation de la translocation nucléaire de RelA. L'étude par western-blot d'enrichissements nucléaires et cytoplasmiques (ici de cellules IB3-1) montre après 30 minutes de stress par le TNF α la translocation nucléaire de RelA. **(B) Mesure de la capacité de liaison de RelA à la chromatine** après par le kit NoShift NF- κ B Assay. La capacité de liaison à des sondes spécifiques de RelA des extraits nucléaires obtenus avec ou sans stress TNF- α (n=2 expériences indépendantes). Des résultats similaires ont été obtenus sous stress par IL-1 β (0,5 ng/mL, 30 minutes).

Nous avons aussi voulu établir si, comme dans d'autres lignées cellulaires, COMMD1 transloque du cytoplasme vers le noyau en cas de stress inflammatoire. Pour cela, nous voulions tout d'abord observer le comportement de COMMD1 endogène. Des premières observations ne montrent pas de co-localisation apparente de COMMD1 avec RelA (Figure 59). Mais sur ces photos, la faible intensité du marquage de RelA peut rendre une co-localisation difficile à objectiver. D'une manière générale, COMMD1 apparaît dans les cellules IB3-1 et S9 majoritairement sous forme d'agrégats périnucléaires, alors que dans d'autres types cellulaires comme par exemple les HeLa, la répartition est plus diffuse, avec une localisation nucléaire plus marquée. D'après l'expérience du personnel de notre plate-forme d'imagerie microscopique, une fraction de COMMD1 est probablement localisée

dans le noyau, mais l'intensité de fluorescence émise par les agrégats périnucléaires dans nos cellules peut gêner l'observation d'un éventuel marquage nucléaire plus faible. Cependant, ces résultats semblent en accord avec nos analyses d'extraits nucléaires après traitement par le TNF α , qui montrent une proportion de COMMD1 nucléaire avant traitement extrêmement faible, sans translocation détectable de COMMD1 sous stimulus inflammatoire. La surexpression et l'observation du comportement d'une construction de COMMD1 étiquetée pourrait permettre de mieux résoudre la question.

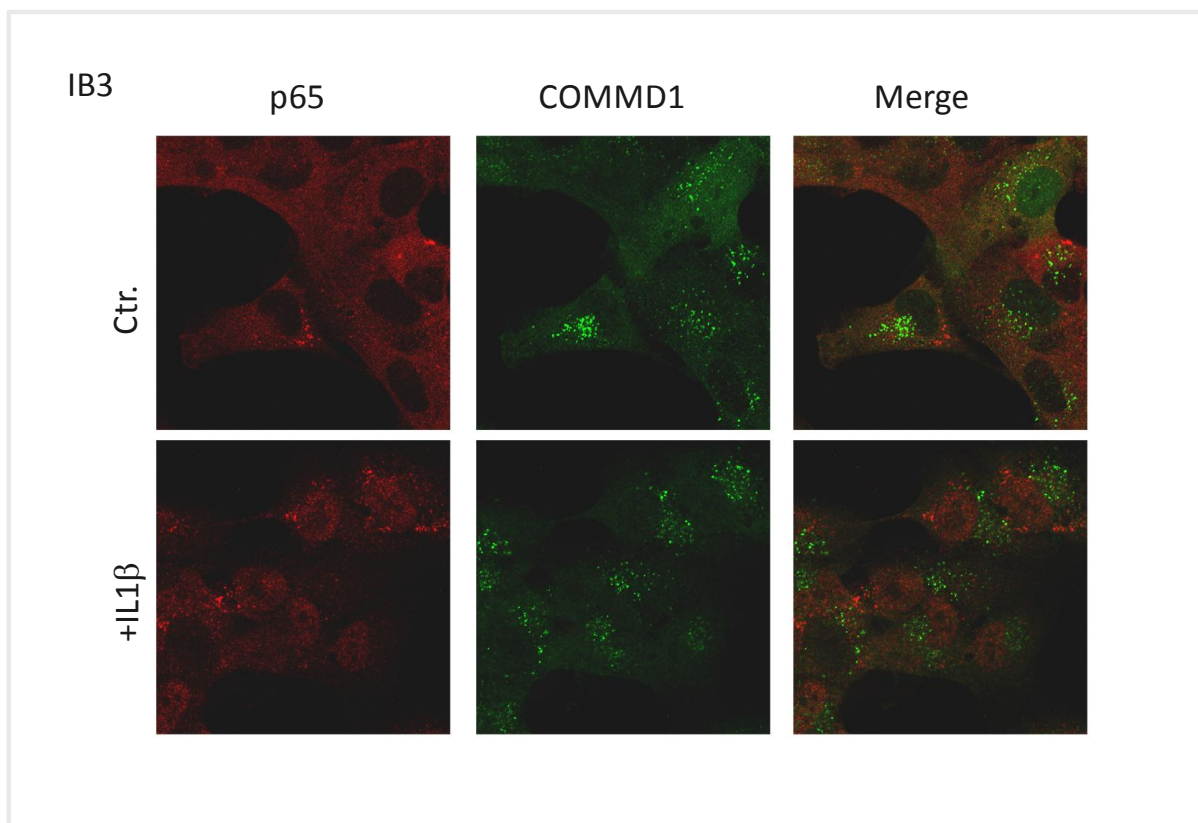


Figure 59. Observation de la localisation cellulaire de COMMD1 dans un contexte pro-inflammatoire, sous IL-1 β . Après 30 minutes de stress par IL-1 β , on observe une translocation nucléaire de RelA (p65) dans les cellules IB3-1. Aucune translocation de COMMD1 n'est observable. Des images similaires ont été obtenues pour les cellules S9. Images obtenues en microscopie confocale.

2.4.COMMD1, inflammation et promoteur CFTR

Il est admis que l'inflammation médiée par le TNF α ou l'IL-1 β augmente l'expression de *CFTR*, notamment par l'augmentation du taux d'ARNm de ce gène (Brouillard, et al., 2001; Cafferata, et al., 2001). Un site de fixation pour le dimère NF- κ B (RelA(p65)/p50) a été identifié il y a quelques années,

entre -1173 et -1163 pb (Brouillard, et al., 2001). COMMD1 est maintenant connu pour inhiber la transcription NF- κ B dépendante de certains gènes (Maine, et al., 2007), et nous avons retrouvé cet effet dans nos lignées cellulaires. D'un point de vue mécanistique, il apparaissait donc légitime d'étudier si COMMD1 était un régulateur indirect de la transcription de *CFTR*.

Promoteur CFTR et inflammation

Nous avons choisi pour cette étude les cellules HEK, dans lesquelles des variations d'activité du promoteur *CFTR*, d'activité assez faible, sont plus aisées à observer, car dans nos conditions le taux de transfection est meilleur que dans les cellules bronchiques. Par ailleurs, l'effet anti- NF- κ B de COMMD1 a été particulièrement documenté dans ces cellules.

Le TNF α et l'IL-1 β permettent d'activer la voie NF- κ B mais aussi d'autres voies de signalisation comme la voie AP-1. Pour nous affranchir de ces effets additionnels, nous avons choisi de stimuler nos cellules par co-transfection des principales sous-unités de NF- κ B (p65 et/ou p50+p65), afin d'observer l'effet direct de ce facteur de transcription sur le promoteur *CFTR*. Par mutagénèse dirigée, nous avons introduit dans notre construction du promoteur CFTR-Luciférase P-1260 (voir résultats, 1^{ère} partie, page 124) la mutation décrite précédemment par F. Brouillard (Brouillard, et al., 2001).

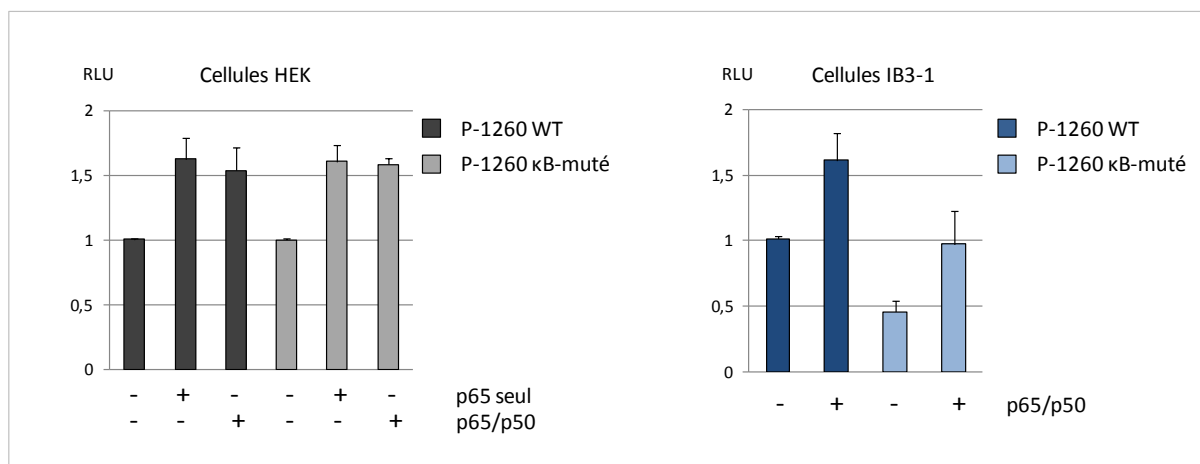


Figure 60. Comparaison de l'activation par NF- κ B du promoteur normal et du promoteur muté sur le site NF- κ B. les cellules ont été co-transfectées par le promoteur wt ou muté CFTR-Luciférase, RelA(p65) ou le mélange (p65/p50) et le plasmide contrôle Renilla. L'activité luciférase était mesurée après 24h. Cellules HEK n=6, IB3-1 n=3 expériences indépendantes.

Nous avons confirmés que le promoteur *CFTR* est activé par NF- κ B, avec, à quantité totale égale une stimulation équivalente par p65 seul ou par le mélange équimolaire p50/p65 (Figure 60). Même si le promoteur a été décrit comme répondant au dimère p50/p65, d'après des études *in silico* confirmées par EMSA (Brouillard, et al., 2001), la stimulation par p65 n'était pas inattendue dans la mesure où RelA(p65) est capable de s'homo-dimériser pour activer certains gènes cibles. En revanche, aucune différence dans l'intensité de la stimulation n'a été observée entre le promoteur wt et le promoteur muté sur son site κ B. Nous avons éliminé la présence d'un éventuel autre site répondant directement à NF- κ B par une nouvelle étude *in silico* du promoteur *CFTR*, et introduit sur ce site une autre mutation dont nous savions qu'elle abolit la transcription NF- κ B dépendante (séquence utilisée sur le mutant du promoteur IL-8, Figure 1, page 161). Les résultats obtenus étaient identiques à ceux observés avec le premier mutant du promoteur.

Si les profils transcriptionnels sont strictement identiques entre le promoteur muté et le promoteur wt dans les cellules HEK, une différence entre ces deux constructions est observable dans les cellules IB3-1. En effet, dans notre modèle bronchique, malgré la mutation du site κ B, la stimulation par (p65/p50) est conservée, mais l'activité basale du promoteur muté en dehors de toute stimulation est plus basse que celle du promoteur wt ($p < 0,05$). Deux hypothèses peuvent être émises : (i) dans notre modèle, NF- κ B endogène permet de moduler l'activité basale de *CFTR* grâce à son site de liaison. Sous stimulation, NF- κ B active des gènes dont l'expression précoce va permettre d'augmenter la transcription de *CFTR* via d'autres éléments *cis*-régulateurs, (ii) la mutagénèse du site entraîne la perte/le gain de liaison d'un autre facteur de transcription dans les cellules IB3-1. La stimulation par NF- κ B passe par d'autres sites inconnus.

Des expériences de stimulation par le mélange (p65/p50) montrent que dans les HEK, notre construction du promoteur la plus courte (P-340) est stimulable de manière équivalente à P-1260, laissant clairement penser que NF- κ B active des activateurs transcriptionnels agissant sur le promoteur minimal de *CFTR*. L'ensemble des résultats montrent une différence de régulation d'expression et du promoteur *CFTR* cellule-spécifique, entre les cellules HEK et IB3-1. Les cellules IB3-1 expriment peu de protéine CFTR, il serait donc intéressant d'étudier le comportement de ce promoteur dans des cellules l'exprimant plus fortement, comme les cellules Caco-2, HT-29 ou Calu-3.

COMMD1 et promoteur *CFTR*

Afin d'évaluer l'influence de l'effet anti-NF- κ B de COMMD1 sur l'activité transcriptionnelle de *CFTR*, nous avons co-transfecté une construction du promoteur CFTR-Luciférase avec un vecteur d'expression de COMMD1 wt ou délété de son domaine COMM indispensable à l'activité anti-NF- κ B

(Burstein, et al., 2005). La surexpression de la forme totale de COMMD1 entraîne une augmentation de plus de 40% de l'activité transcriptionnelle du promoteur contenant le site sensible à NF-κB P-1260 pb wt (Figure 61 A) et d'environ 23% de l'activité du promoteur P-904 ne contenant pas ce site (non montré). Cet effet activateur sur P-1260 est également observé avec la surexpression de COMMD1 délétée de son domaine COMM, qui est théoriquement dépourvue d'activité anti-NF-κB. La stimulation du promoteur par (p65/p50) entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur P-904, qui n'est pas abolie par COMMD1 (Figure 61 B). L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un effet activateur de COMMD1 sur la transcription de *CFTR*, indépendamment du facteur NF-κB.

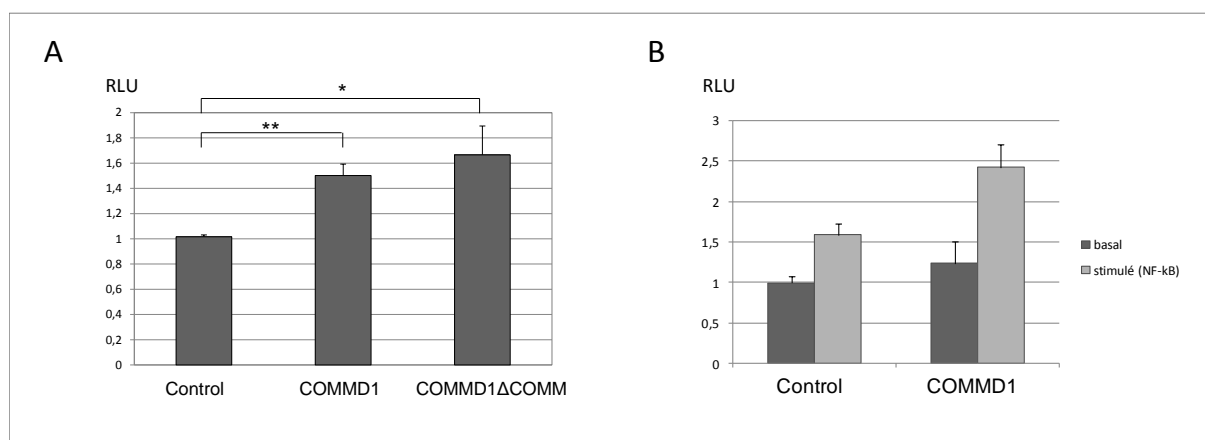


Figure 61. Effet de COMMD1 sur la régulation transcriptionnelle de *CFTR*. (A) La surexpression de COMMD1 augmente l'activité transcriptionnelle de *CFTR*, indépendamment du domaine COMM. La construction P-1260, contenant le site consensus de liaison de NF-κB a été co-transfecté avec un vecteur d'expression de COMMD1 wt, ou de COMMD1ΔCOMM délété du domaine COMM, dans des cellules HEK (n=3 expériences indépendantes). **(B) La surexpression de COMMD1 n'a pas d'effet sur la stimulation du promoteur *CFTR* par NF-κB.** Les cellules HEK ont été co-transfectées par le promoteur *CFTR* P-904 dépourvu du site consensus de liaison de NF-κB, COMMD1 ou son contrôle pcDNA3 et le mélange (p65/p50). Une seule expérience réalisée en quadruplicat.

2.5. Discussion

Propriétés anti-inflammatoires de COMMD1

Notre étude a permis d'observer l'activité anti-inflammatoire de COMMD1, effet qui pourrait être appliqué dans le contexte d'inflammation exacerbée classiquement décrit chez les patients atteints de mucoviscidose. Cet effet anti-inflammatoire se traduit par une inhibition de l'activité transcriptionnelle du facteur pro-inflammatoire NF-κB. D'autres études ont montré que COMMD1

inhibait de manière plus spécifique la transcription de certains, mais pas de tous les gènes cibles de NF- κ B. Ainsi, sous TNF α , dans les cellules U2OS, l'extinction stable de COMMD1 par ARN interférence était associée à une augmentation de la quantité d'ARNm *ICAM*, *BIRC3*, *CXCL1* et *CCL2*, alors que l'effet sur la quantité d'ARNm codant l'IL-8 et le TNF α était mineur (Maine, et al., 2007). Dans nos modèles de cellules épithéliales bronchiques IB3-1 (modèle CF) et S9 (modèle non CF), la surexpression de COMMD1 n'induit pas de variation basale de l'IL-8, mais elle est associée à une faible diminution de la transcription après 4h de stimulation par TNF α ou IL-1 β . En sus de la régulation transcriptionnelle, les régulations traductionnelle et post-traductionnelle ont un impact sur la quantité finale du produit d'un gène, et la quantité d'ARNm n'est pas forcément corrélée à l'expression protéique. C'est pourquoi nous avons dosé la protéine IL-8 sécrétée dans le surnageant de culture, et nous avons observé, en condition pro-inflammatoire, une légère diminution de la cytokine associée à la surexpression de COMMD1. Cette diminution était significative sous TNF α , mais pas sous IL-1 β .

Mécanisme de l'activité anti-inflammatoire de COMMD1

Nous n'avons pas encore élucidé le mécanisme par lequel COMMD1 diminue l'activité pro-inflammatoire de NF- κ B et la quantité d'ARNm d'IL-8. D'après les données de la littérature, nous pensons à un effet d'inhibition de la transcription des gènes cibles de NF- κ B. En effet, COMMD1 a été décrit comme agissant principalement au niveau nucléaire, en favorisant l'interaction de l'ubiquitine ligase ECS^{SOCs1} avec le complexe RelA(p65)/chromatine, entraînant ainsi la dégradation de RelA(p65) (Figure 62) (pour revue : (Ghosh and Hayden, 2008)). Ceci était d'autant plus vraisemblable que nous n'avons pas mis en évidence de variations du taux de RelA transloqué dans le noyau en réponse au TNF α , entre les cellules surexprimant COMMD1 et les cellules contrôle.

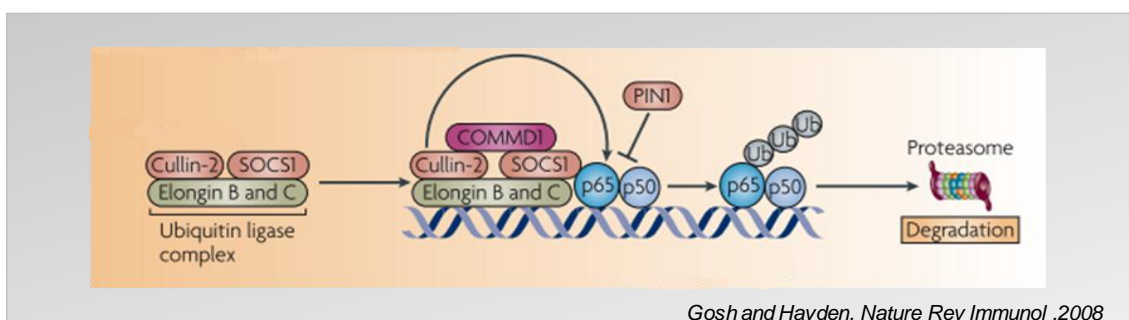


Figure 62. Principal mécanisme d'inhibition de la transcription NF- κ B dépendante par COMMD1. Le principal mécanisme d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B par COMMD1 réside dans le noyau : COMMD1 favorise l'interaction entre l'E3 ubiquitine ligase ECS^{SOCs1} et favorise ainsi l'ubiquitination de p65 (RelA) et sa dégradation au sein du nucléole.

Cependant, les analyses d'activité transcriptionnelle du promoteur IL-8 avec gène rapporteur luciférase n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse. Les expériences montrées ici ont été réalisées avec de constructions remontant 133 pb en amont de l'ATG initiateur de traduction. Étant donnée l'absence de modulation détectable, nous avons réalisé le même type d'analyse avec des constructions plus longues du promoteur (-1481 pb). Là non plus, la surexpression de COMMD1 n'entraînait pas de variation de la luciférase. Une des limites de ce modèle gène rapporteur luciférase est qu'il ne contient qu'une courte séquence de promoteur et ne reflète pas l'ensemble des interactions observées dans les cellules. L'activité des facteurs de transcription nécessite le plus souvent plusieurs sites *cis*-régulateurs rapprochés dans l'espace par des repliements chromatiniens (Ott, et al., 2009). Or tous les gènes cibles de NF- κ B ne sont pas réprimés de la même manière par COMMD1 (Maine, et al., 2007), laissant supposer l'existence d'autres sites *cis*-régulateurs permettant le recrutement de protéines spécifiques stabilisant l'échafaudage Ubiquitine-ligase/COMMD1/NF- κ B/chromatine. C'est pourquoi nous avons poursuivi l'étude par la quantification de l'ARNm IL-8 endogène. Les analyses réalisées ne nous permettent pas de savoir si la diminution observée est due à une augmentation de la transcription ou bien à une stabilisation de l'ARNm IL-8. Une mesure de la demi-vie par quantification de l'ARNm IL-8 en présence d'actinomycine D, qui bloque la transcription, pourrait participer à résoudre cette question.

Difficultés rencontrées liées au modèle cellulaire

Notre étude était basée à l'origine sur l'observation d'une différence de répartition nucléocytoplasmique de COMMD1 entre les cellules CF et non CF, avec une plus grande proportion nucléaire dans les modèles CF. Les modèles utilisés alors étaient les cellules HeLa exprimant stablement CFTR-wt ou CFTR-F508del, et des cellules IB3-1 et C38 qui nous avaient gracieusement été cédées par P. Zeitlin en 1998. Dans une volonté d'avoir les modèles les plus standardisés possibles, nous avons acheté de nouveaux clones de ces cellules IB3-1 et S9 (ATCC) en 2008. Sur ces nouvelles cellules IB3-1 et S9, je n'ai jamais retrouvé cette répartition nucléocytoplasmique différentielle de COMMD1 entre les 2 lignées, celle-ci paraissant aléatoire ou soumise à des événements non maîtrisés lors des différentes expériences d'enrichissement nucléocytoplasmique avec semi-quantification en western-blot. En immunofluorescence, la différence n'était pas non plus objectivable. Dans ces nouvelles cellules, l'expression nucléaire de COMMD1 apparaissait très faible,

et s'il y avait translocation nucléaire de COMMD1 en condition pro-inflammatoire, comme décrit par certains auteurs dans d'autres modèles cellulaires (Burstein, et al., 2005), celle-ci n'était pas observable dans nos conditions de culture et d'enrichissements nucléo-cytoplasmiques.

Comparaison des profils inflammatoires entre IB3-1 et S9

Les profils d'IL-8 semblaient comparables sous stimulation TNF α ou IL-1 β , avec cependant quelques différences dans la significativité statistique. En effet, dans les échantillons surexprimant COMMD1 par rapport aux échantillons contrôles, la faible diminution d'IL-8 sécrétée sous TNF α (en moyenne 11% pour les IB3-1 et 17% pour les S9) était significative, alors qu'elle ne l'était pas sous IL-1 β , probablement à cause de la dispersion des points de mesure. Sous IL-1 β , la diminution moyenne d'IL-8 induite par COMMD1 de 27% pour les IB3-1 paraissait plus importante que celle d'environ 15% observée pour les cellules S9 avec une différence de réaction entre les deux lignées proche de la significativité statistique ($p=0,051$, test de Student pairé bilatéral). Par ailleurs, alors que sous TNF α , la quantité d'ARNm IL-8 était corrélée à la quantité protéique, nous observions sous IL-1 β une dissociation de profil : l'ARNm IL-8 semblait en quantité moindre dans les cellules S9, mais la protéine en quantité supérieure, par rapport aux IB3-1. Des mesures supplémentaires permettraient peut-être d'obtenir une significativité statistique. Ces résultats préliminaires sont en faveur d'une différence de réaction selon le *stimulus* entre les IB3-1 et les S9, avec probablement sous IL-1 β une régulation post-transcriptionnelle différente entre les lignées CF et non CF. La régulation de l'IL-8 dans les cellules épithéliales bronchiques dépend à la fois de la voie NF- κ B et de la voie des MAPkinases (Li, et al., 2002; Roger, et al., 1998). Il a été montré par exemple que la voie p38 permet de diminuer la quantité de protéine IL-8, sans faire varier la quantité d'ARNm (Li, et al., 2002). Or, sous certains *stimuli*, des différences d'activation dans les voies de l'inflammation NF- κ B et AP-1, ont été montrées dans diverses études entre les cellules CF et non CF (Boncoeur, et al., 2008; Tabary, et al., 2001; Venkatakrishnan, et al., 2000; Verhaeghe, et al., 2007b). La différence apparente entre les IB3-1 et S9 dans notre étude sous IL-1 β pourrait être due à la différence d'équilibre entre ces deux voies selon le phénotype CF.

Effet transcriptionnel de COMMD1 sur le promoteur CFTR

Nos études préliminaires montrent que COMMD1, en plus de son activité anti-inflammatoire, pourrait activer la transcription de *CFTR* par un mécanisme indépendant de NF- κ B. Les expériences présentées ici ont cependant été réalisées dans les cellules HEK, un modèle cellulaire dans lequel le promoteur *CFTR* se comporte différemment par rapport aux cellules bronchiques. Notamment, nous

avons pu observer au laboratoire que la surexpression de HIF-1 α a un effet différent selon le type cellulaire sur la production de luciférase dépendant de la construction P-904 du promoteur *CFTR*: diminution de l'activité transcriptionnelle du promoteur dans les cellules bronchiques et augmentation dans les cellules HEK. Il est donc difficile de prédire l'impact que pourrait avoir une variation de COMMD1 sur la transcription globale du gène *CFTR* et *in fine* sur la quantité de protéine produite. Afin de mieux appréhender l'impact de COMMD1 sur la régulation de *CFTR* au niveau de l'ARNm, il serait appréciable de quantifier l'ARNm de *CFTR* endogène après surexpression de COMMD1. Une telle analyse a été tentée dans les cellules Calu-3, qui expriment naturellement *CFTR*, mais n'a pas été concluante, l'efficacité de transfection n'étant pas satisfaisante. Les conditions de transfection sont donc à mettre au point dans ce type cellulaire. Il serait également intéressant de réaliser de telles expériences dans des cellules bronchiques 16HBE (*CFTR*-wt) ou CFBE (*CFTR*-F508del) ou dans des cellules originaires d'autres tissus. Néanmoins, pour ce type d'analyse, se pose le problème du modèle cellulaire à utiliser : en effet, les cellules Calu-3 expriment *CFTR* à un taux très élevé, tandis que l'expression endogène de cette protéine est très faible dans les cellules 16HBE, cette différence illustrant l'utilisation de voies ou de seuils de régulation différents entre les lignées. L'emploi de cellules primaires bronchiques comme les cellules hAECB (Société Epithelix), en immersion ou bien en interface air-liquide pourrait être un bon compromis. Dans ce cas, pour des raisons pratiques, nous favoriserons l'extinction de COMMD1 afin d'étudier l'impact des variations quantitatives de cette protéine sur le taux de transcrits de *CFTR*.

3. Etude de l'effet anti-inflammatoire de CSN5 dans le contexte de la mucoviscidose

CSN5 est historiquement considéré dans le contexte de l'inflammation comme un potentiateur de la voie AP-1, notamment par stabilisation du complexe c-Jun/chromatine (Claret, et al., 1996), puis a été impliqué dans la réponse au TGF β (Kim, et al., 2004; Wan, et al., 2002). L'implication de cette protéine à travers le signalosome dans la régulation de la voie NF- κ B est beaucoup plus récente. En effet, il a fallu attendre les travaux des équipes de Schweitzer en 2007 puis d'Orel en 2009 qui ont montré que le signalosome permet de limiter l'activité NF- κ B en protégeant I κ B α de sa dégradation par la voie ubiquitine protéasome (Orel, et al., 2009; Schweitzer, et al., 2007). Des travaux préliminaires dans le laboratoire avaient montré dès 2007 une diminution de la quantité d'IL-8

secrétée dans les cellules IB3-1 en cas de surexpression de CSN5, ce qui nous a conduits à explorer cette piste.

3. 1. CSN5 diminue l'activité transcriptionnelle de NF-κB

L'activité anti-inflammatoire de la protéine CSN5 a été évaluée dans les cellules bronchiques IB3-1/S9 et les cellules HeLa exprimant stablement CFTR.

Dans les cellules épithéliales bronchiques, CSN5 inhibait la transcription médiée par NF-κB d'un vecteur pNF-κBLuc en condition basale. Bien que le nombre d'expériences (n=2) soit trop faible pour établir un risque statistique, cette activité anti-NF-κB semblait conservée sous stimulus proinflammatoire (TNFα) (Figure 63).

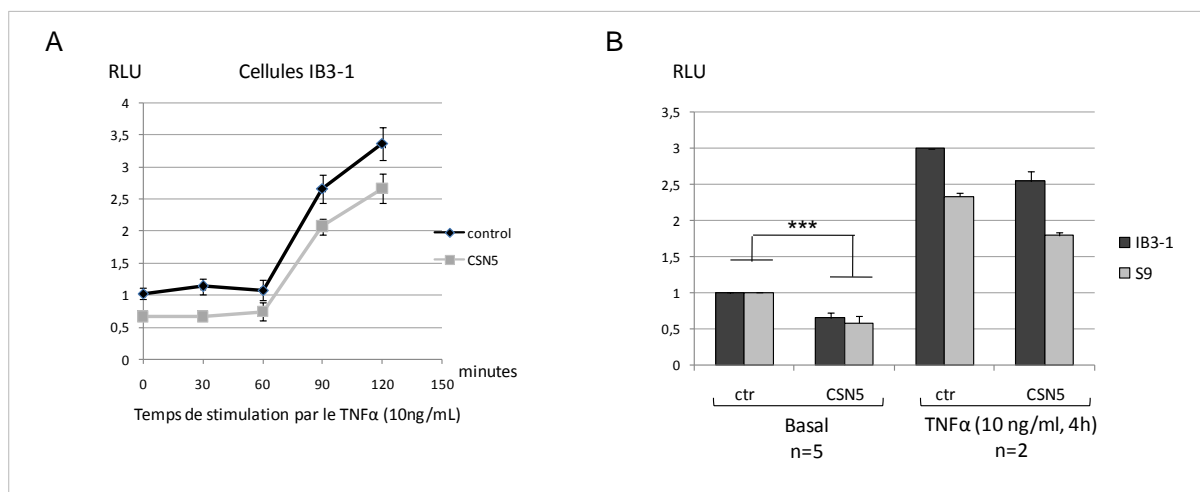


Figure 63. CSN5 inhibe l'activité transcriptionnelle de NF-κB dans les cellules épithéliales bronchiques. (A) Mesure de l'activité NF-κB sous stimulation par le TNFα entre 0 et 2h. Un plasmide pNF-κBLuc a été co-transfecté avec un plasmide Renilla et un vecteur d'expression de CSN5 ou son contrôle pCDNA3. 24h après transfection, les cellules ont été soumises à un stress par le TNFα pendant des périodes croissantes, avant d'être lysées pour mesure de l'activité luciférase. Résultats d'une expérience réalisée en quadruplicat. **(B) Mesure de l'effet de CSN5 sur l'activité transcriptionnelle de NF-κB dans les cellules IB3-1 et S9, en condition basale (n=5) ou après 4h de stimulation par le TNFα (10ng/mL) (n=2).** Le faible nombre d'expériences ne permet pas de faire de calcul statistique sous TNFα. *** p<0,005 (test unilatéral pairé de Student).

Le même type d'expérience a été réalisé sur les cellules HeLa (Figure 64). Les résultats tout à fait préliminaires présentés ici n'ont pas encore pu être reproduits dans des conditions de validation technique acceptable (notamment Renilla stable dans toutes les conditions), et nécessitent encore des mises au point. Cependant, les résultats comparés de la surexpression et de l'extinction de CSN5,

ainsi que la diminution de l'inflammation dose dépendante de l'inflammation observée dans les cellules CFTR-F508del en conditions basales permettent de penser que CSN5 a bien un effet anti-NF- κ B dans nos cellules HeLa stables. En effet, dans les 3 lignées (pTracer, CFTR-wt et CFTR-F508del), la surexpression transitoire de CSN5 est associée à une légère diminution de l'activité NF- κ B. Cet effet, peu marqué dans la première expérience, semble dose dépendant dans les cellules HeLa CFTR-F508del en l'absence de stimulation. Les résultats sont plus difficilement interprétables sous TNF α , la stimulation dans les différents puits de culture générant de grands écarts d'activité NF- κ B. Au-delà de la dose de 0,6 μ g de plasmide CSN5/puits (plaque de 24 puits), on observait de la mortalité cellulaire. La dose dépendance n'a pas été testée dans les autres lignées. Les expériences d'extinction par siRNA montrent une augmentation de l'activité NF- κ B dans les HeLa stables, quelque soit la construction.

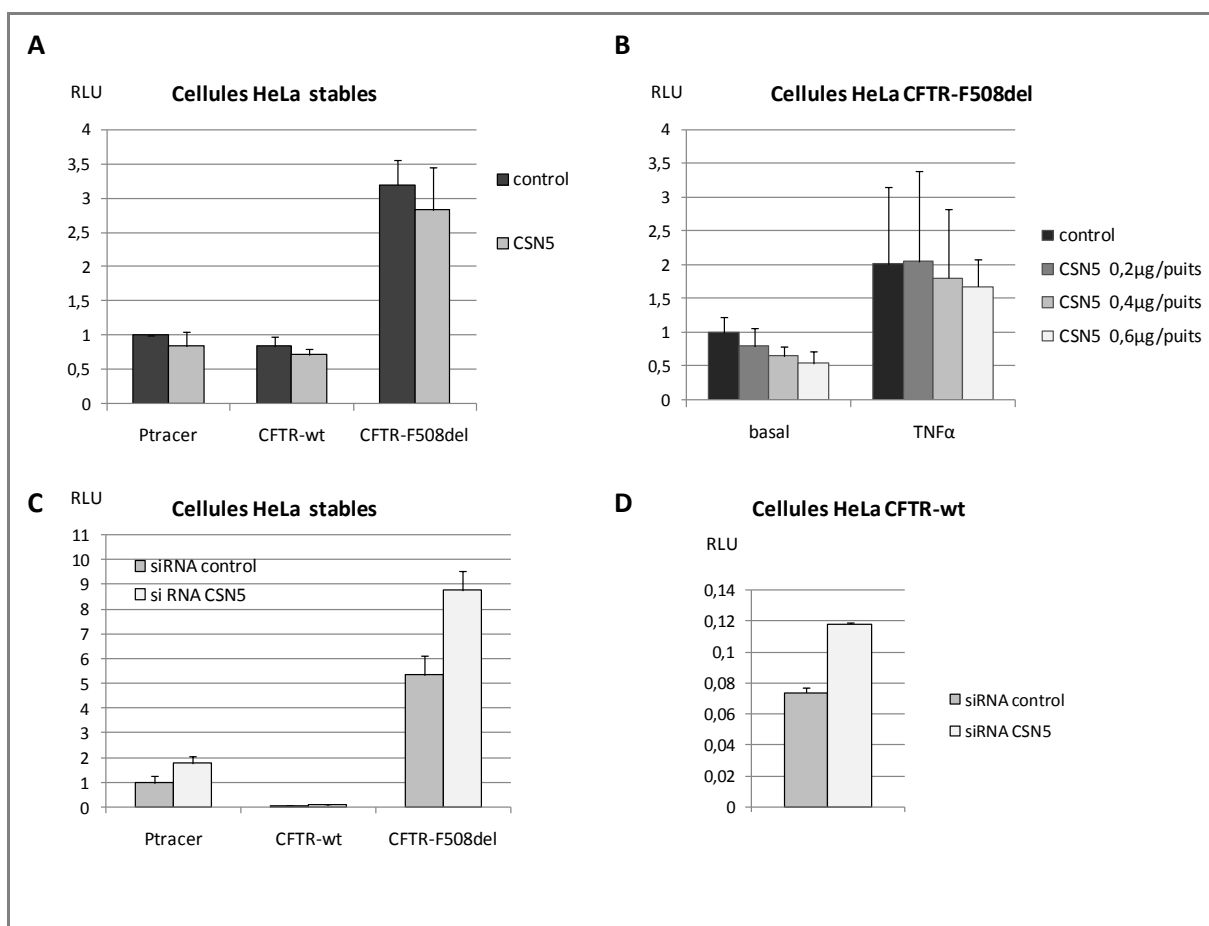


Figure 64. CSN5 inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- κ B dans les cellules HeLa exprimant stablement CFTR. (A) Mesure de l'activité basale du plasmide pNF- κ BLuc dans les cellules HeLa exprimant stablement CFTR-wt, CFTR-F508del ou pTracer (contrôle) en condition de surexpression de CSN5. (B) Mesure de l'effet dose-dépendant de CSN5 sur l'activité transcriptionnelle de NF- κ B (pNF- κ BLuc) dans les cellules HeLa exprimant stablement CFTR-F508del, en condition basale ou après 4h de stimulation par le TNF α (10ng/mL). (C) Mesure de l'activité de pNF- κ BLuc en condition d'extinction de CSN5. (D) Focus sur la mesure d'activité de pNF- κ BLuc de l'expérience (C) réalisée dans les cellules HeLa CFTR-wt.

L'inhibition de la voie NF- κ B par CSN5 est connue pour être médiée par le signalosome et ses kinases associées, qui régulent la phosphorylation d'I κ B α . Or les expériences de surexpression par transfection de CSN5 montrent essentiellement une augmentation de CSN5 monomérique ou des petits complexes, mais pas du signalosome. L'extinction par siRNA de CSN5 touche aussi en premier lieu les formes libres, mais si l'extinction est suffisante, une diminution de la quantité de signalosome est observée. C'est pourquoi nous avons choisi de poursuivre l'étude du potentiel anti-inflammatoire de CSN5 avec des expériences d'extinction.

3. 2. CSN5 et IL-8

Nous avons voulu savoir si cette inhibition de l'inflammation pouvait influencer sur la sécrétion d'interleukine 8 par les HeLa, et si une différence était observée entre les cellules CF et non CF. 48h après extinction de CSN5 par RNA interférence, les cellules ont été soumises ou non à un stress TNF α (10 ng/mL), puis l'IL-8 sécrétée dans le milieu de culture a été dosée. Étonnamment, en condition basale, l'IL-8 sécrétée était plus basse dans les cellules contenant moins de CSN5 (sur deux expériences indépendantes) (Figures 65).

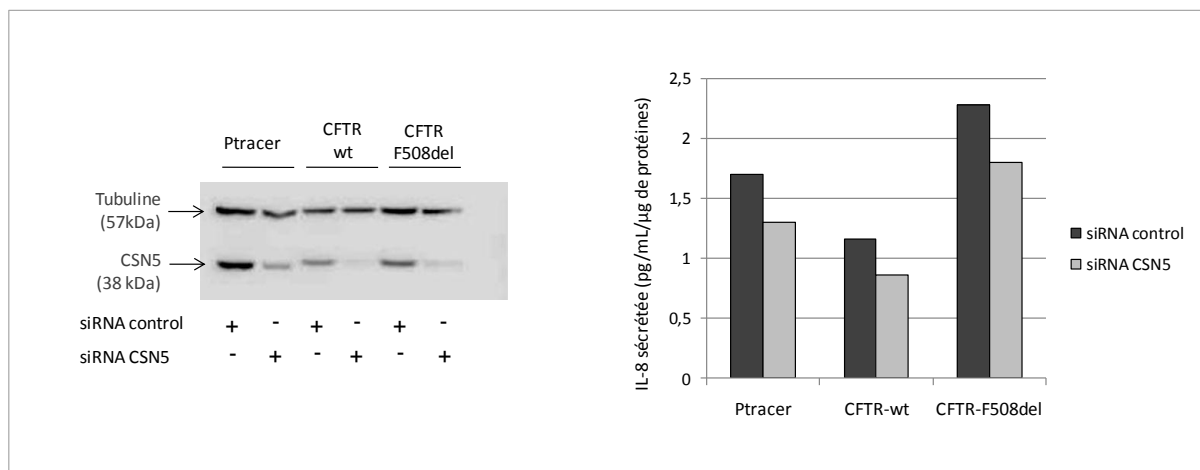


Figure 65. Etude de l'effet de l'extinction de CSN5 sur la sécrétion de l'interleukine 8 par les cellules HeLa en condition basale. 48h après transfection de siRNAs dirigés contre CSN5 (ON-TARGETplus SMARTpool (COPS5), Dharmacon), à raison de 50 pmol/1,5.10⁵ cellules, le surnageant de culture a été prélevé et immédiatement congelé à -20°C. Les cellules ont été lysées et les lysats (20μg) ont été analysés en western-blot L'IL-8 dans le surnageant a été dosée par immuno-réaction par le système Immulite1000, et rapportée à la concentration de protéines dans chaque puits de culture.

Le dosage d'IL-8 sécrétée sous stimulation n'a été réalisé que lors d'une expérience, qui doit donc être reproduite (Figure 66). J'ai néanmoins choisi de les montrer ici : ils sont en faveur d'une augmentation de l'IL-8 médiée par la sous-expression de CSN5, après 24h et 48h de stimulation par le TNF α . L'absence d'augmentation d'IL-8 dans les cellules CFTR-wt est difficile à interpréter avant d'avoir reproduit ces résultats : il peut s'agir d'un « incident de manipulation », ou bien d'un effet masqué par un autre évènement, comme par exemple la modulation de l'inflammation par CFTR-wt qui a été récemment décrit par l'équipe d'Anil Mehta (Hunter, et al., 2010).

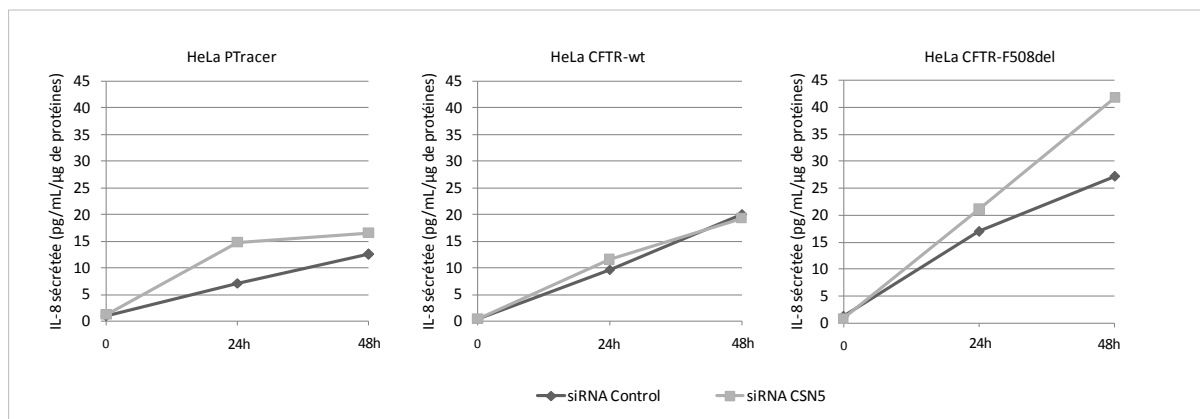


Figure 66. Etude de l'effet de l'extinction de CSN5 sur la sécrétion de l'interleukine 8 sous stimulation par le TNF α . 48h après transfection du siRNA, les cellules ont été soumises à un stress par TNF α (10ng/mL) pour une durée de 24 ou 48h. L'IL-8 sécrétée a été dosée par le système Immulite1000.

3.3. Discussion

Toutes ces expériences préliminaires concordent cependant à démontrer le rôle anti-inflammatoire de CSN5. CSN5 est un co-activateur connu du facteur pro-inflammatoire AP-1, et nous avons pu vérifier cette action par co-transfection de CSN5 avec un vecteur luciférase dont le promoteur contient des éléments de réponse à AP-1 (AP1-Luc). D'après les données de la littérature, nous pensons à l'origine que l'effet anti-IL-8 médiée par CSN5 était dépendant d'AP-1, sans bien en comprendre le mécanisme. C'est un peu par hasard, en utilisant le vecteur d'expression de CSN5 comme contrôle dans une expérience avec pNF- κ B-Luc que nous avons observé au laboratoire l'inhibition de la transcription NF- κ B dépendante par CSN5. Ces résultats d'inhibition de la voie NF- κ B sont en accord avec des données récentes de la littérature (Orel, et al., 2009; Schweitzer, et al., 2007). L'action anti-NF- κ B, comme l'action pro-AP-1, seraient dépendantes du signalosome ou de petits complexes contenant CSN5 plutôt que de CSN5 à l'état monomérique.

Un certain nombre d'études rapportent des différences dans l'activation des voies NF- κ B et AP-1 dans les cellules CF par rapport aux cellules non CF. Ces différences peuvent donc concourir à la régulation de la sécrétion de l'IL-8 par différentes molécules telles COMMD1 mais également CSN5 qui agit sur les deux voies. Le mode d'action de ces régulations reste à explorer car les effets de CSN5 sont complexes, à la fois transcriptionnels, comme le suggèrent les résultats ci-dessus, mais aussi post-traductionnels, comme le démontre notre étude sur CFTR et d'autres molécules telles HIF-1 α (Wei TIBS 2010).

Discussion générale et Perspectives

L'ensemble de cette thèse a été réalisé pendant une période de 4 ans d'assistantat-hospitalo-universitaire. A l'image de mes fonctions durant cette période, ce travail se place à l'interface entre recherche clinique et fondamentale.

Le spectre clinique de la mucoviscidose est extrêmement large, allant des formes sévères multisystémiques aux pathologies CFTR monosymptomatiques. Il est très important de faire la distinction entre ces formes cliniques, ainsi que la distinction entre la sévérité des mutations qui en sont responsables, afin que le meilleur conseil génétique possible puisse être dispensé aux patients et à leurs familles. C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'étudier les relations génotype-phénotype chez les fœtus présentant des anomalies digestives à l'échographie, et que nous avons mis en place de nouveaux outils pour évaluer la pathogénicité des mutations de régulation.

D'une manière tout à fait indépendante, je me suis intéressée à deux protéines, COMMD1 et CSN5, qui avaient été identifiées dans le laboratoire comme partenaires cytoplasmiques de CFTR et dont l'activité anti-inflammatoire a été documentée récemment. L'inflammation pulmonaire est le facteur de morbidité majeur chez les patients atteints de mucoviscidose, et la régulation de cette inflammation anormale fait actuellement partie des cibles thérapeutiques (Nichols, et al., 2008). Nos travaux montrent l'intérêt de ces deux partenaires de CFTR dans la régulation de l'inflammation et de la sécrétion d'interleukine 8. Néanmoins, les études de CSN5 sont très préliminaires, et seule la discussion concernant COMMD1 sera développée ici.

1. Apport aux corrélations génotype-phénotype

Concernant le diagnostic prénatal de mucoviscidose, notre étude rétrospective des cas de suspicion de la maladie sur signes d'appel échographique a permis d'objectiver l'importance des différentes anomalies digestives fœtales dans la stratégie diagnostique. L'apport de cette étude est son uniformisation pour les corrélations génotypes-phénotype. En effet, du point de vue du génotypage, tous les échantillons d'ADN ont été analysés dans notre laboratoire, et la recherche de larges remaniements pour les plus anciens qui n'en avaient pas bénéficié, a été réalisée de manière rétrospective lorsque cela nous paraissait justifié. Du point de vue du phénotype, toutes les anomalies échographiques décrites dans les dossiers ont été prises en considération. Même si ces informations étaient parfois incomplètes, cela nous a permis de déterminer des profils de signes d'appels plus évocateurs que d'autres. La prise en compte de ces signes, dont la force diagnostique a pour la première fois été caractérisée par un score statistique, devrait permettre d'améliorer les prescriptions en évitant les analyses non pertinentes (hyperéchogénicité faible, calcifications isolées...), de mieux cibler les analyses à réaliser (recherche de remaniement, surtout si les signes

sont très évocateurs), et en cas de résultats négatifs de mieux rassurer les couples. Cependant, le petit nombre de fœtus atteints ne nous a pas permis d'établir un risque résiduel *a priori* en fonction des anomalies digestives. Pour établir de telles statistiques, une étude de plus grande envergure, ou la mise en commun de données de plusieurs cohortes, serait nécessaire. Néanmoins, la mise en évidence de profils d'anomalies plus particulièrement retrouvés chez les fœtus CF nous pousse à proposer une révision des recommandations françaises et européennes pour le diagnostic moléculaire de la mucoviscidose sur signes d'appel échographiques.

Parmi les cas atteints de mucoviscidose dans cette étude, les réarrangements du gène *CFTR* représentait une grande proportion des mutations identifiées (au moins 10%, selon les groupes de patients considérés), beaucoup plus importante que dans la population générale des patients CF (1,5-2%). De tels remaniements peuvent créer des décalages du cadre de lecture et la création de codons stop prématurés. Les mécanismes sous-jacents liant ces larges remaniements aux anomalies digestives observables à l'échographie ne sont pas clairs, mais il pourrait être intéressant d'étudier si des mutations entraînant une diminution de l'ARNm par NMD (*Non-sens Mediated Decay*) sont particulièrement associées aux anomalies digestives fœtales. En effet, la présence de certains transcrits semble intervenir dans la maturation pulmonaire fœtale, et on pourrait imaginer un phénomène similaire lors du développement de l'appareil digestif (Mouchel, et al., 2003).

Ces dernières années, l'analyse moléculaire de l'ARNm *CFTR* a été mise en place au laboratoire de diagnostic. Ce type d'analyses, à partir d'ARNm issu de cellules épithéliales nasales est réalisé chez les patients pour lesquels une seule ou aucune mutation causale n'est identifiée, et présentant un phénotype compatible avec une insuffisance fonctionnelle de *CFTR*. L'analyse qualitative permet de mettre en évidence des anomalies d'épissage (Costa, et al., 2011). Le plus souvent, les analyses quantitatives de *CFTR* sont plutôt basées sur des quantifications relatives d'un allèle par rapport à l'autre. L'analyse quantitative absolue de *CFTR* est peu documentée, sans doute du fait de la difficulté d'obtenir ces prélèvements d'ARNm chez des témoins normaux. Des premières analyses de quantification chez des patients et des témoins nous ont permis d'observer des variations du taux de *CFTR*. En cas d'anomalie, le séquençage du promoteur et, le cas échéant, l'analyse fonctionnelle de la mutation identifiée par gène rapporteur pourra nous permettre (i) de proposer la recherche de cette mutation aux apparentés si la pathologie associée est sévère, (ii) de mieux comprendre les mécanismes de régulation d'expression de ce gène. Les variations fines d'expression du taux de *CFTR* paraissent particulièrement intéressantes dans les cas de formes frustes de la maladie ou des *CFTR*-RD.

2. Effets bénéfiques de COMMD1 dans le contexte de la mucoviscidose

Parmi les effets recherchés en thérapeutique dans la mucoviscidose, on peut citer : l'augmentation de CFTR à la membrane apicale (par des « correcteurs »), la diminution de l'absorption sodique excessive au niveau de l'épithélium respiratoire par inhibition du canal ENaC, et la diminution de l'inflammation dérégulée au niveau pulmonaire (Figure 67).

La protéine COMMD1 est une protéine pléiotrope impliquée dans de nombreux processus cellulaires, principalement par un mécanisme de stabilisation d'interactions protéiques. Elle est impliquée dans trois voies thérapeutiques : modulation de CFTR, restauration du liquide de surface des voies aériennes et inhibition de l'inflammation. En effet, nous l'avons identifié dans le laboratoire comme partenaire de CFTR, et avons montré qu'elle augmente l'expression de CFTR mature à la membrane plasmique (Drevillon, et al., 2011). Elle a été décrite par une autre équipe comme un modulateur négatif du canal amilorido-sensible ENaC qui est anormalement activé dans la mucoviscidose (Biasio, et al., 2004; Ke, et al., 2010) et nous avons montré ici son activité anti-inflammatoire dans ce contexte (Figure 68).

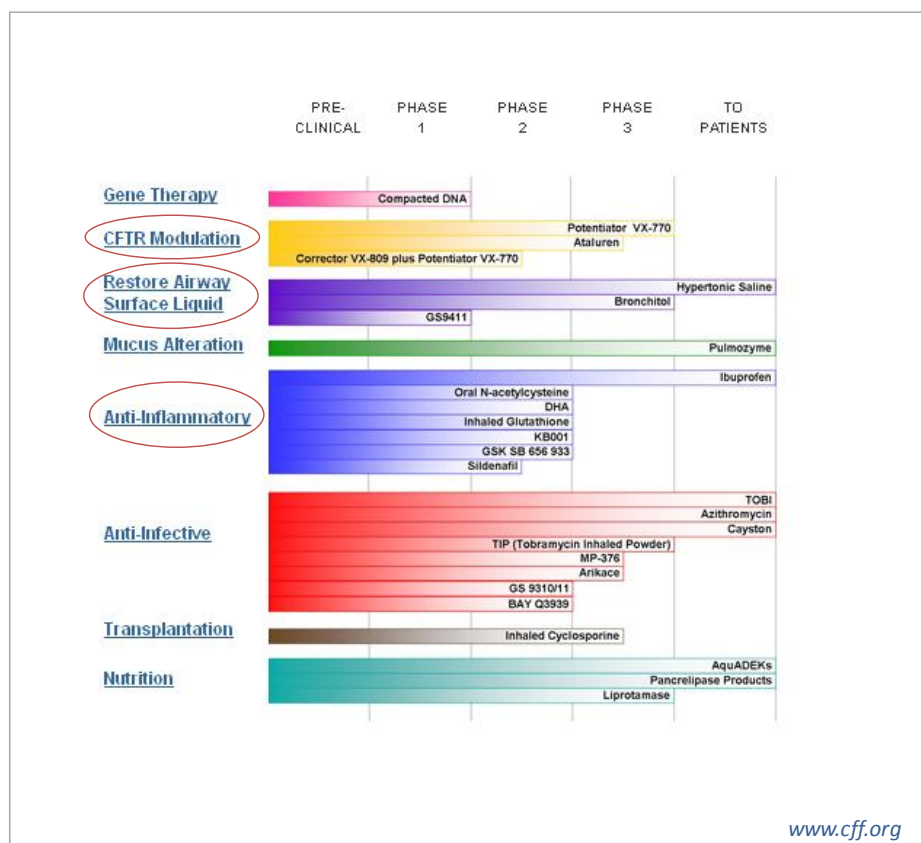


Figure 67. Liste des traitements de la mucoviscidose en cours de développement au 1^{er} Juillet 2011, d'après www.cff.org. COMMD1 interagit avec les voies entourées en rouge.

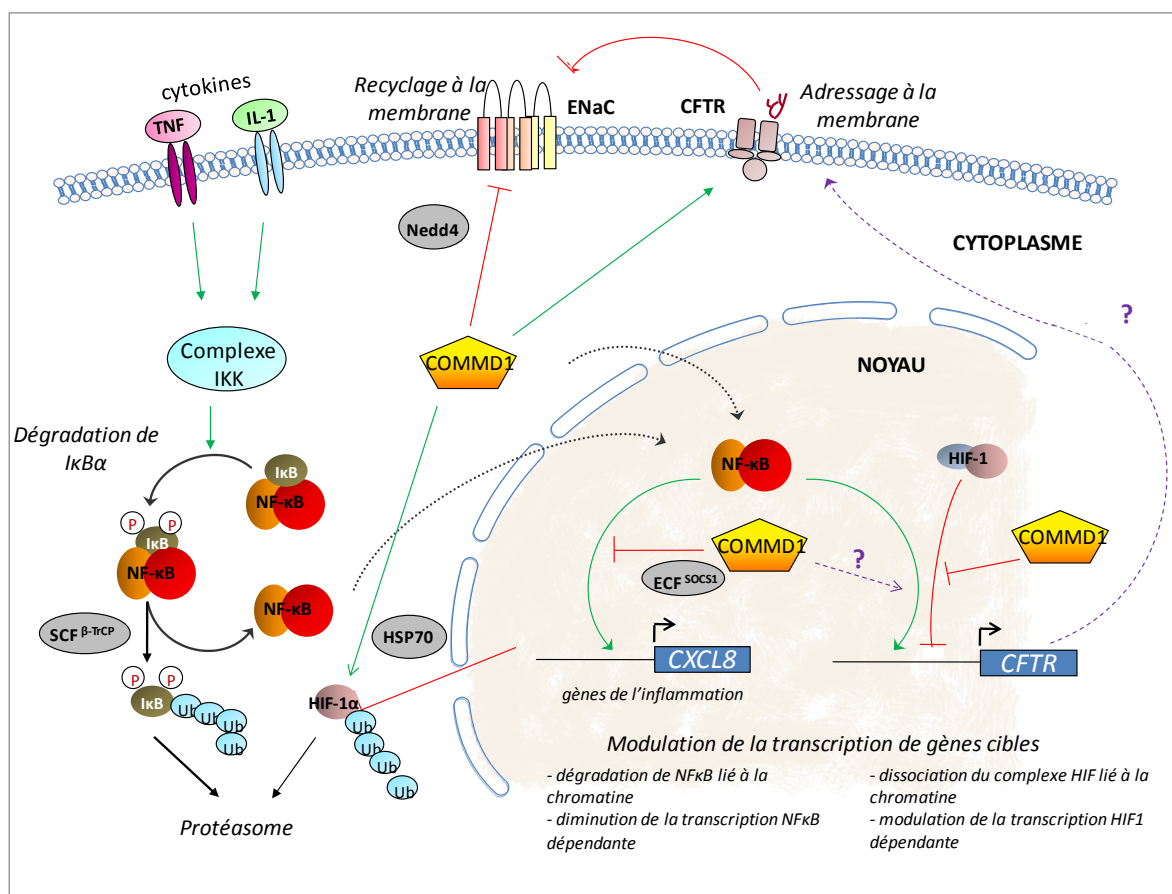


Figure 68. Schéma récapitulatif du rôle de COMMD1 dans le contexte de la mucoviscidose. Dans le cytoplasme, COMMD1 inhibe l'activation de la voie NF-κB en diminuant l'ubiquitination d'IκBα, il favorise la dégradation de HIF-1α, il augmente le routage de la protéine CFTR vers la membrane plasmique et diminue l'expression membranaire d'ENaC. Dans le noyau, COMMD1 inhibe l'activité transcriptionnelle de NF-κB sur certains de ses gènes cibles, parmi lesquels le gène *CXCL8* codant l'IL-8. En dissociant le complexe HIF-1/chromatine, COMMD1 inhibe la répression de la transcription de *CFTR*. Par ailleurs, le promoteur du gène *CFTR* contient également des éléments de réponse à l'inflammation, qui pourraient être inhibés par COMMD1. L'effet global de COMMD1 sur la transcription de *CFTR* n'est pas encore connu.

Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à la production d'interleukine 8, qui est un marqueur caractéristique de l'inflammation et est très augmentée dans les voies respiratoires des patients atteints de la mucoviscidose. Cette chemokine, sécrétée en partie par les cellules épithéliales bronchiques, participe au recrutement en masse dans le tissu de polynucléaires neutrophiles qui libèrent sur le site un arsenal de molécules de défense, parmi lesquelles des protéases. Lorsque ces molécules présentent un taux trop élevé, elles provoquent la dégradation du parenchyme pulmonaire.

Selon les connaissances actuelles, l'action régulatrice de COMMD1 dans l'inflammation se situe essentiellement au niveau de l'activité transcriptionnelle du facteur pro-inflammatoire majeur NF-κB (Ghosh and Hayden, 2008). Nous avons montré dans des modèles de cellules IB3-1 (CF) et S9 (CF corrigées) l'inhibition partielle de l'activité NF-κB médiée par COMMD1, indiquant le rôle tampon

dans l'inflammation de cette protéine. Bien que d'après d'autres études, l'interleukine 8 ne soit pas une cible privilégiée de la modulation transcriptionnelle par *COMMD1*, nous avons montré dans les cellules bronchiques une diminution modérée de l'ARNm codant l'IL-8, associée à une diminution de la sécrétion de cette chemokine. Parmi les autres molécules à étudier pour mieux documenter l'activité anti-inflammatoire de *COMMD1*, il serait intéressant de tester l'expression de l'Interleukine-6, dont le gène est une cible transcriptionnelle de NF- κ B. La cytokine anti-inflammatoire IL-10 qui inhibe la voie NF- κ B et la sécrétion d'IL-8 (Tabary, et al., 2003) est anormalement diminuée dans les sécrétions respiratoires des patients CF (Bonfield, et al., 1999). Certaines études montrent une libération d'IL-10 par les cellules épithéliales bronchiques *in vitro* (Bonfield, et al., 1999; Fueki, et al., 2007), mais comme d'autres auteurs (Lim, et al., 2004), nous n'avons pas réussi à détecter cette cytokine dans nos surnageant de culture, en condition basale ou sous TNF α , et aucune expression de l'ARNm codant l'IL-10 n'était détectable par Q-RT-PCR.

Les effets de la surexpression de *COMMD1* sur l'expression génique des cellules bronchiques sont étudiés actuellement dans notre laboratoire par Abdel Aissat, étudiant en thèse. L'ARN de cellules IB3-1 et S9 surexprimant de manière transitoire *COMMD1* en dehors de tout *stimulus* inflammatoire a été extrait en vue d'une analyse par puce d'expression *4x44 Whole Human Genome* (Agilent, société Miltenyi Biotec). Son travail d'analyse bioinformatique a déjà permis d'observer une modulation différentielle entre les cellules CF et non CF de certains réseaux d'interactions, touchant notamment l'inflammation. Lorsque tous ces résultats auront été validés par Q-RT-PCR, leurs répercussions au niveau protéique pourront être testées, notamment par des méthodes immunologiques.

Nous avons également voulu tester l'hypothèse que *COMMD1* soit un gène modificateur de la mucoviscidose. En effet, le gène *COMMD1* a déjà été étudié dans le contexte de la maladie de Wilson, mais aucune liaison ou modification du phénotype avec les différents polymorphismes du gène n'a pu être clairement établie (Weiss, et al., 2006; Wu, et al., 2006b). Dans le contexte de la mucoviscidose, des gènes intervenant dans les processus inflammatoires, comme ceux codant le TGF β et IFRD1 ont été désignés comme gènes modificateurs de la sévérité de l'atteinte pulmonaire. A notre connaissance, aucune étude de cohorte n'a montré actuellement de liaison entre la région contenant *COMMD1* et la variabilité phénotypique de cette maladie. Cependant, il pourrait être intéressant de rechercher si certains variants de ce gène sont associés à des traits phénotypiques particuliers, par séquençage du gène dans une grande cohorte de patients. Comme nous le montre la Figure 69, la structure simple de ce gène rendra cette étude relativement aisée, et une stagiaire L3 (3^{ème} année de Licence) a d'ores et déjà mis les outils nécessaires en place.

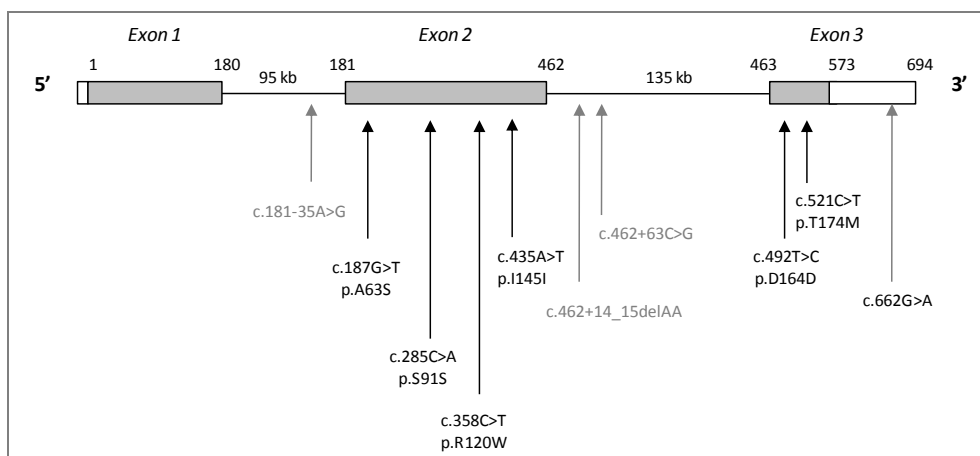


Figure 69. Principales variations de séquence rapportées dans le gène *COMMD1*

COMMD1 est une protéine étudiée actuellement dans le contexte du cancer, notamment les cancers du pancréas, de l'ovaire et du sein. Une diminution de son expression est associée à un mauvais pronostic avec une augmentation de l'invasion tumorale (van de Sluis, et al., 2010). Il a été montré récemment que sous un *stimulus* proinflammatoire comme le TNF α , la clusterine sécrétoire, une protéine chaperonne activée par le stress, favorise la dégradation de COMMD1 (Zoubeydi, et al., 2010). Le custirsén (OGX011, OncoGenex), un inhibiteur pharmacologique de la clusterine, est actuellement en essais de phase II et III dans différents cancers (prostate, sein, poumon) (Saad, et al., 2011), avec des résultats encourageants. Des premiers essais au laboratoire par A. Aissat montrent que l'extinction de la clusterine entraîne une augmentation de COMMD1. Compte-tenu des actions bénéfiques de COMMD1 dans le contexte de la mucoviscidose, et bien que des études complémentaires soient nécessaires pour mieux comprendre son mode d'action et sa toxicité éventuelle dans cette pathologie, l'utilisation en thérapeutique humaine d'une molécule modulant COMMD1 est très encourageante, et renforce l'intérêt clinique de nos travaux.

Bibliographie

A

- Abramowicz MJ, Dessars B, Sevens C, Goossens M, Girodon-Boulandet E. 2000. Fetal bowel hyperechogenicity may indicate mild atypical cystic fibrosis: a case associated with a complex CFTR allele. *J Med Genet* 37(8):E15.
- Abriel H, Loffing J, Rebhun JF, Pratt JH, Schild L, Horisberger JD, Rotin D, Staub O. 1999. Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* 103(5):667-73.
- Adler AS, Lin M, Horlings H, Nuyten DS, van de Vijver MJ, Chang HY. 2006. Genetic regulators of large-scale transcriptional signatures in cancer. *Nat Genet* 38(4):421-30.
- Adler AS, Littlepage LE, Lin M, Kawahara TL, Wong DJ, Werb Z, Chang HY. 2008. CSN5 isopeptidase activity links COP9 signalosome activation to breast cancer progression. *Cancer Res* 68(2):506-15.
- Ainbinder E, Revach M, Wolstein O, Moshonov S, Diamant N, Dikstein R. 2002. Mechanism of rapid transcriptional induction of tumor necrosis factor alpha-responsive genes by NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 22(18):6354-62.
- Akata D, Akhan O. 2007. Liver manifestations of cystic fibrosis. *Eur J Radiol* 61(1):11-7.
- Aleksandrov AA, Aleksandrov LA, Riordan JR. 2007. CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel. *Pflugers Arch* 453(5):693-702.
- Amaral MD, Kunzelmann K. 2007. Molecular targeting of CFTR as a therapeutic approach to cystic fibrosis. *Trends Pharmacol Sci* 28(7):334-41.
- Andersen DH. 1938. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease. *Am J Dis Child* 56:344-399.
- Andersen DH, Hodges RG. 1946. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. *Am J Dis Child* 72:62-80.
- Angel P, Hattori K, Smeal T, Karin M. 1988. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55(5):875-85.
- Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M. 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49(6):729-39.
- Angel P, Karin M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072(2-3):129-57.
- Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. 2001. Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 20(19):2413-23.
- Antigny F, Norez C, Becq F, Vandebrouck C. 2008. Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. *Cell Calcium* 43(2):175-83.
- Armstrong DS, Hook SM, Jansen KM, Nixon GM, Carzino R, Carlin JB, Robertson CF, Grimwood K. 2005. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol* 40(6):500-10.
- Audrezet MP, Chen JM, Raguene O, Chuzhanova N, Giteau K, Le Marechal C, Quere I, Cooper DN, Ferec C. 2004. Genomic rearrangements in the CFTR gene: extensive allelic heterogeneity and diverse mutational mechanisms. *Hum Mutat* 23(4):343-57.
- Audrezet MP, Dabricot A, Le Marechal C, Ferec C. 2008. Validation of high-resolution DNA melting analysis for mutation scanning of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *J Mol Diagn* 10(5):424-34.

B

- Bae MK, Ahn MY, Jeong JW, Bae MH, Lee YM, Bae SK, Park JW, Kim KR, Kim KW. 2002. Jab1 interacts directly with HIF-1 α and regulates its stability. *J Biol Chem* 277(1):9-12.
- Baeuerle PA, Baltimore D. 1988. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* 242(4878):540-6.
- Balamayooran G, Batra S, Fessler MB, Happel KI, Jeyaseelan S. 2009. Mechanisms of neutrophil accumulation in the lungs against bacteria. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43(1):5-16.
- Bardin R, Danon D, Tor R, Mashiach R, Vardimon D, Meizner I. 2009. Reference values for gamma-glutamyl-transferase in amniotic fluid in normal pregnancies. *Prenat Diagn* 29(7):703-6.
- Bartlett JR, Friedman KJ, Ling SC, Pace RG, Bell SC, Bourke B, Castaldo G, Castellani C, Cipolli M, Colombo C and others. 2009. Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA* 302(10):1076-83.
- Bartling TR, Drumm ML. 2009. Loss of CFTR results in reduction of histone deacetylase 2 in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(1):L35-43.
- Bartoszewski R, Rab A, Jurkuvenaite A, Mazur M, Wakefield J, Collawn JF, Bebok Z. 2008. Activation of the unfolded protein response by deltaF508 CFTR. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39(4):448-57.
- Basseres DS, Baldwin AS. 2006. Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 25(51):6817-30.
- Basu S, Fenton MJ. 2004. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(5):L887-92.
- Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeeasingh M, Riordan JR. 1992. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* 68(4):809-18.
- Beauchamp M, Lands LC. 2005. Sweat-testing: a review of current technical requirements. *Pediatr Pulmonol* 39(6):507-11.
- Bebok Z, Tousson A, Schwiebert LM, Venglarik CJ. 2001. Improved oxygenation promotes CFTR maturation and trafficking in MDCK monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(1):C135-45.
- Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W. 2001. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J* 20(7):1630-9.
- Bech-Otschir D, Seeger M, Dubiel W. 2002. The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Cell Sci* 115(Pt 3):467-73.
- Bemis L, Chan DA, Finkielstein CV, Qi L, Sutphin PD, Chen X, Stenmark K, Giaccia AJ, Zundel W. 2004. Distinct aerobic and hypoxic mechanisms of HIF- α regulation by CSN5. *Genes Dev* 18(7):739-44.
- Ben-Neriah Y, Schmitz ML. 2004. Of mice and men. *EMBO Rep* 5(7):668-73.
- Berlin BM, Norton ME, Sugarman EA, Tsipis JE, Allitto BA. 1999. Cystic fibrosis and chromosome abnormalities associated with echogenic fetal bowel. *Obstet Gynecol* 94(1):135-8.
- Berrou E, Bryckaert M. 2001. Platelet-derived growth factor inhibits smooth muscle cell adhesion to fibronectin by ERK-dependent and ERK-independent pathways. *J Biol Chem* 276(42):39303-9.
- Besancon F, Przewlocki G, Baro I, Hongre AS, Escande D, Edelman A. 1994. Interferon-gamma downregulates CFTR gene expression in epithelial cells. *Am J Physiol* 267(5 Pt 1):C1398-404.
- Bezzetti V, Borgatti M, Nicolis E, Lampronti I, Dececchi MC, Mancini I, Rizzotti P, Gambari R, Cabrini G. 2008. Transcription factor oligodeoxynucleotides to NF-kappaB inhibit transcription of IL-8 in bronchial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39(1):86-96.
- Biasio W, Chang T, McIntosh CJ, McDonald FJ. 2004. Identification of Murr1 as a regulator of the human delta epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 279(7):5429-34.

- Biennvenu T, Lacronique V, Raymondjean M, Cazeneuve C, Hubert D, Kaplan JC, Beldjord C. 1995. Three novel sequence variations in the 5' upstream region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene: two polymorphisms and one putative molecular defect. *Hum Genet* 95(6):698-702.
- Blanchard E, Marie S, Riffault L, Bonora M, Tabary O, Clement A, Jacquot J. 2011. Reduced expression of Tis7/IFRD1 protein in murine and human cystic fibrosis airway epithelial cell models homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 411(3):471-6.
- Blattner C, Kannouche P, Litfin M, Bender K, Rahmsdorf HJ, Angulo JF, Herrlich P. 2000. UV-Induced stabilization of c-fos and other short-lived mRNAs. *Mol Cell Biol* 20(10):3616-25.
- Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM. 2002. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 19(6):575-606.
- Bodas M, Vij N. 2010. The NF-kappaB signaling in cystic fibrosis lung disease: pathophysiology and therapeutic potential. *Discov Med* 9(47):346-56.
- Bomberger JM, Barnaby RL, Stanton BA. 2009. The deubiquitinating enzyme USP10 regulates the post-endocytic sorting of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelial cells. *J Biol Chem* 284(28):18778-89.
- Bombieri C, Claustres M, De Boeck K, Derichs N, Dodge J, Girodon E, Sermet I, Schwarz M, Tzetis M, Wilschanski M and others. 2011. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *J Cyst Fibros* 10 Suppl 2:S86-102.
- Boncoeur E, Criq VS, Bonvin E, Roque T, Henrion-Caude A, Gruenert DC, Clement A, Jacquot J, Tabary O. 2008. Oxidative stress induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase in cystic fibrosis lung epithelial cells: Potential mechanism for excessive IL-8 expression. *Int J Biochem Cell Biol* 40(3):432-46.
- Bonfield TL, Konstan MW, Berger M. 1999. Altered respiratory epithelial cell cytokine production in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 104(1):72-8.
- Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR, Cantley L, Gatzky JT. 1986. Na⁺ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *J Clin Invest* 78(5):1245-52.
- Bours V, Franzoso G, Azarenko V, Park S, Kanno T, Brown K, Siebenlist U. 1993. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell* 72(5):729-39.
- Brambati B, Tului L, Fattore S. 1993. First-trimester fetal screening of cystic fibrosis in low-risk population. *Lancet* 342(8871):624.
- Bremer LA, Blackman SM, Vanscoy LL, McDougal KE, Bowers A, Naughton KM, Cutler DJ, Cutting GR. 2008. Interaction between a novel TGFB1 haplotype and CFTR genotype is associated with improved lung function in cystic fibrosis. *Hum Mol Genet* 17(14):2228-37.
- Brouillard F, Bouthier M, Leclerc T, Clement A, Baudouin-Legros M, Edelman A. 2001. NF-kappa B mediates up-regulation of CFTR gene expression in Calu-3 cells by interleukin-1beta. *J Biol Chem* 276(12):9486-91.
- Bruick RK, McKnight SL. 2001. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294(5545):1337-40.
- Burkhead JL, Morgan CT, Shinde U, Haddock G, Lutsenko S. 2009. COMMD1 forms oligomeric complexes targeted to the endocytic membranes via specific interactions with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 284(1):696-707.
- Burstein E, Hoberg JE, Wilkinson AS, Rumble JM, Csomos RA, Komarck CM, Maine GN, Wilkinson JC, Mayo MW, Duckett CS. 2005. COMMD proteins, a novel family of structural and functional homologs of MURR1. *J Biol Chem* 280(23):22222-32.
- Busch R. 1990. On the history of cystic fibrosis. *Acta Univ Carol Med (Praha)* 36(1-4):13-5.

C

- Cafferata EG, Guerrico AM, Pivetta OH, Santa-Coloma TA. 2001. NF-kappaB activation is involved in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) by interleukin-1beta. *J Biol Chem* 276(18):15441-4.
- Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. 1994. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367(6462):463-7.
- Cardozo T, Pagano M. 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9):739-51.
- Carmody RJ, Chen YH. 2007. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol* 4(1):31-41.
- Carrabino S, Carpani D, Livraghi A, Di Cicco M, Costantini D, Copreni E, Colombo C, Conese M. 2006. Dysregulated interleukin-8 secretion and NF-kappaB activity in human cystic fibrosis nasal epithelial cells. *J Cyst Fibros* 5(2):113-9.
- Carroll VA, Ashcroft M. 2005. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med* 7(6):1-16.
- Caspi B, Blickstein I, Appelman Z. 1992. The accuracy of the assessment of normal fetal intestinal echogenicity--electro-optical densitometry versus the ultrasonographer's eye. *Gynecol Obstet Invest* 33(1):26-30.
- Castellani C, Cuppens H, Macek M, Jr., Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, Tullis E, Assael BM, Bombieri C, Brown A and others. 2008. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 7(3):179-96.
- Chamovitz DA, Glickman M. 2002. The COP9 signalosome. *Curr Biol* 12(7):R232.
- Chan DA, Sutphin PD, Denko NC, Giaccia AJ. 2002. Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 277(42):40112-7.
- Chang EC, Schwechheimer C. 2004. ZOMES III: the interface between signalling and proteolysis. Meeting on The COP9 Signalosome, Proteasome and eIF3. *EMBO Rep* 5(11):1041-5.
- Chen EY, Bartlett MC, Loo TW, Clarke DM. 2004. The DeltaF508 mutation disrupts packing of the transmembrane segments of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 279(38):39620-7.
- Chen YQ, Sengchanthalangsy LL, Hackett A, Ghosh G. 2000. NF-kappaB p65 (RelA) homodimer uses distinct mechanisms to recognize DNA targets. *Structure* 8(4):419-28.
- Chinenov Y, Kerppola TK. 2001. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20(19):2438-52.
- Chmiel JF, Davis PB. 2003. State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res* 4:8.
- Choi JY, Muallem D, Kiselyov K, Lee MG, Thomas PJ, Muallem S. 2001. Aberrant CFTR-dependent HCO₃-transport in mutations associated with cystic fibrosis. *Nature* 410(6824):94-7.
- Chou JL, Rozmahel R, Tsui LC. 1991. Characterization of the promoter region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem* 266(36):24471-6.
- Chrisman HR, Tindall DJ. 2003. Identification and characterization of a consensus DNA binding element for the zinc finger transcription factor TIEG/EGRalpha. *DNA Cell Biol* 22(3):187-99.
- Clain J, Fritsch J, Lehmann-Che J, Bali M, Arous N, Goossens M, Edelman A, Fanen P. 2001. Two mild cystic fibrosis-associated mutations result in severe cystic fibrosis when combined in cis and reveal a residue important for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing and function. *J Biol Chem* 276(12):9045-9.
- Claret FX, Hibi M, Dhut S, Toda T, Karin M. 1996. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* 383(6599):453-7.

- Collaco JM, Cutting GR. 2008. Update on gene modifiers in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 14(6):559-66.
- Cope GA, Deshaies RJ. 2006. Targeted silencing of Jab1/Csn5 in human cells downregulates SCF activity through reduction of F-box protein levels. *BMC Biochem* 7:1.
- Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, Deshaies RJ. 2002. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science* 298(5593):608-11.
- Corteville JE, Gray DL, Langer JC. 1996. Bowel abnormalities in the fetus--correlation of prenatal ultrasonographic findings with outcome. *Am J Obstet Gynecol* 175(3 Pt 1):724-9.
- Corvol H, Beucher J, Boelle PY, Busson PF, Muselet-Charlier C, Clement A, Ratjen F, Grasemann H, Laki J, Palmer CN and others. 2011. Ancestral haplotype 8.1 and lung disease severity in European cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*.
- Costa C, Pruliere-Escabasse V, de Becdelievre A, Gameiro C, Golmard L, Guittard C, Bassinet L, Bienvenu T, Georges MD, Epaud R and others. 2011. A recurrent deep-intronic splicing CF mutation emphasizes the importance of mRNA studies in clinical practice. *J Cyst Fibros*.
- Costes B, Girodon E, Ghanem N, Flori E, Jardin A, Soufir JC, Goossens M. 1995. Frequent occurrence of the CFTR intron 8 (TG)_n 5T allele in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Eur J Hum Genet* 3(5):285-93.
- Cotten JF, Welsh MJ. 1997. Covalent modification of the regulatory domain irreversibly stimulates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 272(41):25617-22.
- Cowell IG. 2002. E4BP4/NFIL3, a PAR-related bZIP factor with many roles. *Bioessays* 24(11):1023-9.
- Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, Gatter KC, Harris A, Higgins CF. 1991. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(20):9262-6.
- Cuppens H, Cassiman JJ. 2004. CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *Int J Androl* 27(5):251-6.
- Cutting GR. 2005. Modifier genetics: cystic fibrosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6:237-60.
- Cutting GR. 2010. Modifier genes in Mendelian disorders: the example of cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 1214:57-69.
- Cyr DM. 2005. Arrest of CFTR Δ F508 folding. *Nat Struct Mol Biol* 12(1):2-3.

D

- Dakin CJ, Numa AH, Wang H, Morton JR, Vertyas CC, Henry RL. 2002. Inflammation, infection, and pulmonary function in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 165(7):904-10.
- Danks DM, Allan J, Anderson CM. 1965. A genetic study of fibrocystic disease of the pancreas. *Annals of Human Genetics* 28:323.
- Darling RC, Disant'Agnese PA, Perera GA, Andersen DH. 1953. Electrolyte abnormalities of the sweat in fibrocystic disease of the pancreas. *Am J Med Sci* 225(1):67-70.
- Davidson DJ, Dorin JR. 2001. The CF mouse: an important tool for studying cystic fibrosis. *Expert Rev Mol Med* 2001:1-27.
- Davies WL, Vandenberg JI, Sayeed RA, Trezise AE. 2004. Cardiac expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator involves novel exon 1 usage to produce a unique amino-terminal protein. *J Biol Chem* 279(16):15877-87.
- Davis PB. 2006. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med* 173(5):475-82.
- de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, Duran KJ, Berger R, Duckett CS, Wijmenga C, Klomp LW. 2006. Characterization of COMMD protein-protein interactions in NF- κ B signalling. *Biochem J* 398(1):63-71.

- de Bie P, van de Sluis B, Burstein E, van de Berghe PV, Muller P, Berger R, Gitlin JD, Wijmenga C, Klomp LW. 2007. Distinct Wilson's disease mutations in ATP7B are associated with enhanced binding to COMMD1 and reduced stability of ATP7B. *Gastroenterology* 133(4):1316-26.
- de Bie P, van de Sluis B, Klomp L, Wijmenga C. 2005. The many faces of the copper metabolism protein MURR1/COMMD1. *J Hered* 96(7):803-11.
- De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M. 2006. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax* 61(7):627-35.
- De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Aubin G, Simard F. 1998. Is meconium ileus genetically determined or associated with a more severe evolution of cystic fibrosis? *J Med Genet* 35(3):262-3.
- de Haan W. 2010. A marker associated with increased risk for severe liver disease in cystic fibrosis. *Clin Genet* 77(5):434-5.
- De Lisle RC. 2009. Pass the bicarb: the importance of HCO₃⁻ for mucin release. *J Clin Invest* 119(9):2535-7.
- Dehecchi MC, Nicolis E, Norez C, Bezzerri V, Borgatti M, Mancini I, Rizzotti P, Ribeiro CM, Gambari R, Becq F and others. 2008. Anti-inflammatory effect of miglustat in bronchial epithelial cells. *J Cyst Fibros* 7(6):555-65.
- Deng XW, Dubiel W, Wei N, Hofmann K, Mundt K. 2000. Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet* 16(7):289.
- Dequeker E, Stuhmann M, Morris MA, Casals T, Castellani C, Claustres M, Cuppens H, des Georges M, Ferec C, Macek M and others. 2009. Best practice guidelines for molecular genetic diagnosis of cystic fibrosis and CFTR-related disorders—updated European recommendations. *Eur J Hum Genet* 17(1):51-65.
- Deshaies RJ. 1999. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:435-67.
- Dessau M, Halimi Y, Erez T, Chomsky-Hecht O, Chamovitz DA, Hirsch JA. 2008. The Arabidopsis COP9 signalosome subunit 7 is a model PCI domain protein with subdomains involved in COP9 signalosome assembly. *Plant Cell* 20(10):2815-34.
- Di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. 1953. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 12(5):549-63.
- DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. 1998. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 101(11):2598-605.
- Diwakar V, Pearson L, Beath S. 2001. Liver disease in children with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 2(4):340-9.
- Dorfman R, Li W, Sun L, Lin F, Wang Y, Sandford A, Pare PD, McKay K, Kayserova H, Piskackova T and others. 2009. Modifier gene study of meconium ileus in cystic fibrosis: statistical considerations and gene mapping results. *Hum Genet* 126(6):763-78.
- Doring G, Parameswaran IG, Murphy TF. 2010. Differential adaptation of microbial pathogens to airways of patients with cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *FEMS Microbiol Rev* 35(1):124-46.
- Drevillon L, Tanguy G, Hinzpeter A, Arous N, de Becdelievre A, Aissat A, Tarze A, Goossens M, Fanen P. 2011. COMMD1-mediated ubiquitination regulates CFTR trafficking. *PLoS One* 6(3):e18334.
- Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM and others. 2005. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 353(14):1443-53.
- Du M, Jones JR, Lanier J, Keeling KM, Lindsey JR, Tousson A, Bebok Z, Whitsett JA, Dey CR, Colledge WH and others. 2002. Aminoglycoside suppression of a premature stop mutation in a *Cftr*^{-/-} mouse carrying a human CFTR-G542X transgene. *J Mol Med* 80(9):595-604.
- Du M, Liu X, Welch EM, Hirawat S, Peltz SW, Bedwell DM. 2008. PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6):2064-9.

Dudez T, Borot F, Huang S, Kwak BR, Bacchetta M, Ollero M, Stanton BA, Chanson M. 2008. CFTR in a lipid raft-TNFR1 complex modulates gap junctional intercellular communication and IL-8 secretion. *Biochim Biophys Acta* 1783(5):779-88.

Durie PR, Kent G, Phillips MJ, Ackerley CA. 2004. Characteristic multiorgan pathology of cystic fibrosis in a long-living cystic fibrosis transmembrane regulator knockout murine model. *Am J Pathol* 164(4):1481-93.

E-F

Edwards MR, Bartlett NW, Clarke D, Birrell M, Belvisi M, Johnston SL. 2009. Targeting the NF-kappaB pathway in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Ther* 121(1):1-13.

Eferl R, Wagner EF. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3(11):859-68.

Egan M, Flotte T, Afione S, Solow R, Zeitlin PL, Carter BJ, Guggino WB. 1992. Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature* 358(6387):581-4.

Eidelman O, Srivastava M, Zhang J, Leighton X, Murtie J, Jozwik C, Jacobson K, Weinstein DL, Metcalf EL, Pollard HB. 2001. Control of the proinflammatory state in cystic fibrosis lung epithelial cells by genes from the TNF-alpha/NFkappaB pathway. *Mol Med* 7(8):523-34.

Ellgaard L, Helenius A. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(3):181-91.

Engelhardt JF, Zepeda M, Cohn JA, Yankaskas JR, Wilson JM. 1994. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J Clin Invest* 93(2):737-49.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A and others. 2001. *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107(1):43-54.

Fakhry J, Reiser M, Shapiro LR, Schechter A, Pait LP, Glennon A. 1986. Increased echogenicity in the lower fetal abdomen: a common normal variant in the second trimester. *J Ultrasound Med* 5(9):489-92.

Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. 1936. Das coeli-akiesyndrom bei angeborener zystischer pankreas-fibromatose und bronchiectasien. *Wien Klin Wochenschr* 86:753.

Fanen P, Ghanem N, Vidaud M, Besmond C, Martin J, Costes B, Plassa F, Goossens M. 1992. Molecular characterization of cystic fibrosis: 16 novel mutations identified by analysis of the whole cystic fibrosis conductance transmembrane regulator (CFTR) coding regions and splice site junctions. *Genomics* 13(3):770-6.

Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, Durie PR, Legrys VA, Massie J, Parad RB and others. 2008. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr* 153(2):S4-S14.

Ferriman EL, Mason G, Ellis L. 1999. Risk of cystic fibrosis with prenatally detected echogenic bowel. *Prenat Diagn* 19(12):1177.

Fisher JT, Zhang Y, Engelhardt JF. 2011. Comparative biology of cystic fibrosis animal models. *Methods Mol Biol* 742:311-34.

Flotte TR, Afione SA, Solow R, Drumm ML, Markakis D, Guggino WB, Zeitlin PL, Carter BJ. 1993. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 268(5):3781-90.

Fonteca JAydlRd. 1606. *Diez Privilegios para Mugerres Preñadas*. Henares, Spain: Alcalç de Henares.

Foulkes AG, Harris A. 1993. Localization of expression of the cystic fibrosis gene in human pancreatic development. *Pancreas* 8(1):3-6.

Freedman SD, Kern HF, Scheele GA. 2001. Pancreatic acinar cell dysfunction in CFTR(-/-) mice is associated with impairments in luminal pH and endocytosis. *Gastroenterology* 121(4):950-7.

Fuchs SY, Fried VA, Ronai Z. 1998. Stress-activated kinases regulate protein stability. *Oncogene* 17(11 Reviews):1483-90.

Fueki N, Sagara H, Akimoto K, Ota M, Okada T, Sugiyama K, Fueki M, Makino S, Fukuda T. 2007. Interleukin-10 regulates transforming growth factor-beta signaling in cultured human bronchial epithelial cells. *Respiration* 74(4):454-9.

Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D. 1993. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes Dev* 7(7B):1354-63.

Fukumoto A, Ikeda N, Sho M, Tomoda K, Kanehiro H, Hisanaga M, Tsurui Y, Tsutsumi M, Kato JY, Nakajima Y. 2004. Prognostic significance of localized p27Kip1 and potential role of Jab1/CSN5 in pancreatic cancer. *Oncol Rep* 11(2):277-84.

Fukumoto A, Tomoda K, Kubota M, Kato JY, Yoneda-Kato N. 2005. Small Jab1-containing subcomplex is regulated in an anchorage- and cell cycle-dependent manner, which is abrogated by ras transformation. *FEBS Lett* 579(5):1047-54.

G

Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC, Stutts MJ. 1993. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363(6426):263-8.

Gadsby DC, Vergani P, Csanady L. 2006. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440(7083):477-83.

Galiotta LJ, Folli C, Marchetti C, Romano L, Carpani D, Conese M, Zegarra-Moran O. 2000. Modification of transepithelial ion transport in human cultured bronchial epithelial cells by interferon-gamma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278(6):L1186-94.

Ganesh L, Burstein E, Guha-Niyogi A, Louder MK, Mascola JR, Klomp LW, Wijmenga C, Duckett CS, Nabel GJ. 2003. The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature* 426(6968):853-7.

Gelman MS, Kannegaard ES, Kopito RR. 2002. A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 277(14):11709-14.

Ghose I, Mason GC, Martinez D, Harrison KL, Evans JA, Ferriman EL, Stringer MD. 2000. Hyperechogenic fetal bowel: a prospective analysis of sixty consecutive cases. *BJOG* 107(3):426-9.

Ghosh S, Hayden MS. 2008. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 8(11):837-48.

Gibson LE, Cooke RE. 1959. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 23(3):545-9.

Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168(8):918-51.

Gilmore TD. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25(51):6680-4.

Greene WC. 2004. How resting T cells deMURR HIV infection. *Nat Immunol* 5(1):18-9.

Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, Drapkin R, Kisselev AF, Tanaka K, Nakatani Y. 2003. The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* 113(3):357-67.

Gu Y, Harley IT, Henderson LB, Aronow BJ, Vietor I, Huber LA, Harley JB, Kilpatrick JR, Langefeld CD, Williams AH and others. 2009. Identification of IFRD1 as a modifier gene for cystic fibrosis lung disease. *Nature* 458(7241):1039-42.

Gusmaroli G, Figueroa P, Serino G, Deng XW. 2007. Role of the MPN subunits in COP9 signalosome assembly and activity, and their regulatory interaction with Arabidopsis Cullin3-based E3 ligases. *Plant Cell* 19(2):564-81.

H

- Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. 1999. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 274(31):21873-7.
- Hacker H, Karin M. 2006. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006(357):re13.
- Hai T, Curran T. 1991. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(9):3720-4.
- Hallows KR, Fitch AC, Richardson CA, Reynolds PR, Clancy JP, Dagher PC, Witters LA, Kolls JK, Pilewski JM. 2006. Up-regulation of AMP-activated kinase by dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in cystic fibrosis airway epithelial cells mitigates excessive inflammation. *J Biol Chem* 281(7):4231-41.
- Harari-Steinberg O, Cantera R, Denti S, Bianchi E, Oron E, Segal D, Chamovitz DA. 2007. COP9 signalosome subunit 5 (CSN5/Jab1) regulates the development of the Drosophila immune system: effects on Cactus, Dorsal and hematopoiesis. *Genes Cells* 12(2):183-95.
- Harari-Steinberg O, Chamovitz DA. 2004. The COP9 signalosome: mediating between kinase signaling and protein degradation. *Curr Protein Pept Sci* 5(3):185-9.
- Harris A, Chalkley G, Goodman S, Coleman L. 1991. Expression of the cystic fibrosis gene in human development. *Development* 113(1):305-10.
- Harris WT, Muhlebach MS, Oster RA, Knowles MR, Noah TL. 2009. Transforming growth factor-beta(1) in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 44(11):1057-64.
- Hatada EN, Krappmann D, Scheidereit C. 2000. NF-kappaB and the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12(1):52-8.
- Hatada EN, Naumann M, Scheidereit C. 1993. Common structural constituents confer I kappa B activity to NF-kappa B p105 and I kappa B/MAD-3. *EMBO J* 12(7):2781-8.
- Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 24(1):29-70.
- Hayden MS, Ghosh S. 2011. NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* 21(2):223-44.
- Hayden MS, West AP, Ghosh S. 2006. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25(51):6758-80.
- Hentze MW, Kulozik AE. 1999. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96(3):307-10.
- Herrmann U, Dockter G, Lammert F. 2010. Cystic fibrosis-associated liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24(5):585-92.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117(Pt 25):5965-73.
- Hetfeld BK, Helfrich A, Kapelari B, Scheel H, Hofmann K, Guterman A, Glickman M, Schade R, Kloetzel PM, Dubiel W. 2005. The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol* 15(13):1217-21.
- Himmel B, Nagel G. 2004. Protein kinase-independent activation of CFTR by phosphatidylinositol phosphates. *EMBO Rep* 5(1):85-90.
- Hinzpeter A, Aissat A, Sondo E, Costa C, Arous N, Gameiro C, Martin N, Tarze A, Weiss L, de Beudellievre A and others. 2010. Alternative splicing at a NAGNAG acceptor site as a novel phenotype modifier. *PLoS Genet* 6(10).
- Hofmann K, Bucher P. 1998. The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci* 23(6):204-5.
- Hon WC, Wilson MI, Harlos K, Claridge TD, Schofield CJ, Pugh CW, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Stuart DI, Jones EY. 2002. Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 alpha by pVHL. *Nature* 417(6892):975-8.

- Hong X, Xu L, Li X, Zhai Z, Shu H. 2001. CSN3 interacts with IKKgamma and inhibits TNF- but not IL-1-induced NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 499(1-2):133-6.
- Howe KL, Wang A, Hunter MM, Stanton BA, McKay DM. 2004. TGFbeta down-regulation of the CFTR: a means to limit epithelial chloride secretion. *Exp Cell Res* 298(2):473-84.
- Huang G, Shi LZ, Chi H. 2009. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine* 48(3):161-9.
- Huang TT, Kudo N, Yoshida M, Miyamoto S. 2000. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3):1014-9.
- Huang X, Hetfeld BK, Seifert U, Kahne T, Kloetzel PM, Naumann M, Bech-Otschir D, Dubiel W. 2005. Consequences of COP9 signalosome and 26S proteasome interaction. *FEBS J* 272(15):3909-17.
- Hull J, Shackleton S, Harris A. 1993. Abnormal mRNA splicing resulting from three different mutations in the CFTR gene. *Hum Mol Genet* 2(6):689-92.
- Hung IH, Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD, Gitlin JD. 1997. Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272(34):21461-6.
- Hunter MJ, Treharne KJ, Winter AK, Cassidy DM, Land S, Mehta A. 2010. Expression of wild-type CFTR suppresses NF-kappaB-driven inflammatory signalling. *PLoS One* 5(7):e11598.

I-J

- Ikeda K, Kawakami K. 1995. DNA binding through distinct domains of zinc-finger-homeodomain protein AREB6 has different effects on gene transcription. *Eur J Biochem* 233(1):73-82.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. 2001. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292(5516):464-8.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ and others. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292(5516):468-72.
- Jacobs MD, Harrison SC. 1998. Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* 95(6):749-58.
- Jacquot J, Tabary O, Le Rouzic P, Clement A. 2008. Airway epithelial cell inflammatory signalling in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 40(9):1703-15.
- Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR. 1995. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* 83(1):129-35.
- Ji HL, Chalfant ML, Jovov B, Lockhart JP, Parker SB, Fuller CM, Stanton BA, Benos DJ. 2000. The cytosolic termini of the beta- and gamma-ENaC subunits are involved in the functional interactions between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 275(36):27947-56.
- Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. 1996a. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271(30):17771-8.
- Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. 1996b. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 271(4 Pt 1):C1172-80.
- Jungas T, Motta I, Duffieux F, Fanen P, Stoven V, Ojcius DM. 2002. Glutathione levels and BAX activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* 277(31):27912-8.
- Junttila MR, Li SP, Westermarck J. 2008. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J* 22(4):954-65.

K

- Kamata H, Tsuchiya Y, Asano T. 2010. I κ B is a positive and negative regulator of NF- κ B activity during inflammation. *Cell Res* 20(11):1178-80.
- Kanai A, Suzuki K, Tanimoto K, Mizushima-Sugano J, Suzuki Y, Sugano S. 2011. Characterization of STAT6 Target Genes in Human B Cells and Lung Epithelial Cells. *DNA Res.*
- Karin M. 1999. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18(49):6867-74.
- Karin M, Ben-Neriah Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-63.
- Kataoka K, Noda M, Nishizawa M. 1994. Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol* 14(1):700-12.
- Kawasaki H, Schiltz L, Chiu R, Itakura K, Taira K, Nakatani Y, Yokoyama KK. 2000. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature* 405(6783):195-200.
- Ke Y, Butt AG, Swart M, Liu YF, McDonald FJ. COMMD1 downregulates the epithelial sodium channel through Nedd4-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(6):F1445-56.
- Ke Y, Butt AG, Swart M, Liu YF, McDonald FJ. 2010. COMMD1 downregulates the epithelial sodium channel through Nedd4-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 298(6):F1445-56.
- Kerbiriou M, Le Drevo MA, Ferec C, Trouve P. 2007. Coupling cystic fibrosis to endoplasmic reticulum stress: Differential role of Grp78 and ATF6. *Biochim Biophys Acta* 1772(11-12):1236-49.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245(4922):1073-80.
- Kerem E. 2005. Pharmacological induction of CFTR function in patients with cystic fibrosis: mutation-specific therapy. *Pediatr Pulmonol* 40(3):183-96.
- Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, Tsui LC, Durie P. 1990. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (Δ F508). *N Engl J Med* 323(22):1517-22.
- Kerem E, Kerem B. 1995. The relationship between genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 1(6):450-6.
- Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. 1995. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151(4):1075-82.
- Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamoto Y, Hanazawa S, Yasui T, Hasegawa K. 2005. Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF- κ B in human gingival fibroblasts. *Cytokine* 29(4):159-68.
- Kim BC, Lee HJ, Park SH, Lee SR, Karpova TS, McNally JG, Felici A, Lee DK, Kim SJ. 2004. Jab1/Csn5, a component of the COP9 signalosome, regulates transforming growth factor beta signaling by binding to Smad7 and promoting its degradation. *Mol Cell Biol* 24(6):2251-62.
- Kim JH, Choi JK, Cinghu S, Jang JW, Lee YS, Li YH, Goh YM, Chi XZ, Lee KS, Wee H and others. 2009. Jab1/Csn5 induces the cytoplasmic localization and degradation of RUNX3. *J Cell Biochem* 107(3):557-65.
- Kim W, Kaelin WG, Jr. 2003. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 13(1):55-60.
- Kirchner KK, Wagener JS, Khan TZ, Copenhaver SC, Accurso FJ. 1996. Increased DNA levels in bronchoalveolar lavage fluid obtained from infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154(5):1426-9.
- Kitamura M. 2011. Control of NF- κ B and inflammation by the unfolded protein response. *Int Rev Immunol* 30(1):4-15.

- Klomp AE, van de Sluis B, Klomp LW, Wijmenga C. 2003. The ubiquitously expressed MURR1 protein is absent in canine copper toxicosis. *J Hepatol* 39(5):703-9.
- Knorre A, Wagner M, Schaefer HE, Colledge WH, Pahl HL. 2002. DeltaF508-CFTR causes constitutive NF-kappaB activation through an ER-overload response in cystic fibrosis lungs. *Biol Chem* 383(2):271-82.
- Koh J, Sferra TJ, Collins FS. 1993. Characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator promoter region. Chromatin context and tissue-specificity. *J Biol Chem* 268(21):15912-21.
- Kube D, Sontich U, Fletcher D, Davis PB. 2001. Proinflammatory cytokine responses to *P. aeruginosa* infection in human airway epithelial cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(3):L493-502.
- Kulka M, Dery R, Nahirney D, Duszyk M, Befus AD. 2005. Differential regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by interferon gamma in mast cells and epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 315(2):563-70.
- Kunzelmann K, Kiser GL, Schreiber R, Riordan JR. 1997. Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* 400(3):341-4.

L

- Lai E, Teodoro T, Volchuk A. 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 22:193-201.
- Lamph WW, Wamsley P, Sassone-Corsi P, Verma IM. 1988. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. *Nature* 334(6183):629-31.
- Le Marechal C, Audrezet MP, Quere I, Ragueneas O, Langonne S, 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. *Hum Genet* 108(4):290-8.
- Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, Chapoval SP, Lee PJ, Noble PW, Yehualaeshet T, Lu B, Flavell RA, Milbrandt J and others. 2004. Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 200(3):377-89.
- Lee IH, Dinudom A, Sanchez-Perez A, Kumar S, Cook DI. 2007. Akt mediates the effect of insulin on epithelial sodium channels by inhibiting Nedd4-2. *J Biol Chem* 282(41):29866-73.
- Lee W, Haslinger A, Karin M, Tjian R. 1987. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 325(6102):368-72.
- Lee YH, Judge AD, Seo D, Kitade M, Gomez-Quiroz LE, Ishikawa T, Andersen JB, Kim BK, Marquardt JU, Raggi C and others. 2011. Molecular targeting of CSN5 in human hepatocellular carcinoma: a mechanism of therapeutic response. *Oncogene*.
- Legendre C, Mooij MJ, Adams C, O'Gara F. 2011. Impaired expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in cystic fibrosis airway epithelial cells - a role for HIF-1 in the pathophysiology of CF? *J Cyst Fibros* 10(4):286-90.
- LeGrys VA. 1996. Sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis: practical considerations. *J Pediatr* 129(6):892-7.
- Legssyer R, Huaux F, Lebacq J, Delos M, Marbaix E, Lebecque P, Lison D, Scholte BJ, Wallemacq P, Leal T. 2006. Azithromycin reduces spontaneous and induced inflammation in DeltaF508 cystic fibrosis mice. *Respir Res* 7:134.
- Lewandowska MA, Costa FF, Bischof JM, Williams SH, Soares MB, Harris A. 2009. Multiple mechanisms influence regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene promoter. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43(3):334-41.
- Li J, Kartha S, Iasovskaia S, Tan A, Bhat RK, Manaligod JM, Page K, Brasier AR, Hershenson MB. 2002. Regulation of human airway epithelial cell IL-8 expression by MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(4):L690-9.
- Li Q, Verma IM. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2(10):725-34.

- Li S, Aufiero B, Schiltz RL, Walsh MJ. 2000. Regulation of the homeodomain CCAAT displacement/cut protein function by histone acetyltransferases p300/CREB-binding protein (CBP)-associated factor and CBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13):7166-71.
- Li S, Moy L, Pittman N, Shue G, Aufiero B, Neufeld EJ, LeLeiko NS, Walsh MJ. 1999. Transcriptional repression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, mediated by CCAAT displacement protein/cut homolog, is associated with histone deacetylation. *J Biol Chem* 274(12):7803-15.
- Li X, Stark GR. 2002. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 30(4):285-96.
- Lim S, Caramori G, Tomita K, Jazrawi E, Oates T, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. 2004. Differential expression of IL-10 receptor by epithelial cells and alveolar macrophages. *Allergy* 59(5):505-14.
- Linsdell P, Hanrahan JW. 1998. Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 275(1 Pt 1):C323-6.
- Liu Y, Shah SV, Xiang X, Wang J, Deng ZB, Liu C, Zhang L, Wu J, Edmonds T, Jambor C and others. 2009. COP9-associated CSN5 regulates exosomal protein deubiquitination and sorting. *Am J Pathol* 174(4):1415-25.
- Loussouarn G, Demolombe S, Mohammad-Panah R, Escande D, Baro I. 1996. Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am J Physiol* 271(5 Pt 1):C1565-73.
- Lukacs GL, Mohamed A, Kartner N, Chang XB, Riordan JR, Grinstein S. 1994. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J* 13(24):6076-86.
- Lyapina S, Cope G, Shevchenko A, Serino G, Tsuge T, Zhou C, Wolf DA, Wei N, Deshaies RJ. 2001. Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* 292(5520):1382-5.

M

- Macleod D, Charlton J, Mullins J, Bird AP. 1994. Sp1 sites in the mouse *aprt* gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev* 8(19):2282-92.
- Maine GN, Burstein E. 2007a. COMMD proteins and the control of the NF kappa B pathway. *Cell Cycle* 6(6):672-6.
- Maine GN, Burstein E. 2007b. COMMD proteins: COMMMing to the scene. *Cell Mol Life Sci* 64(15):1997-2005.
- Maine GN, Mao X, Komarck CM, Burstein E. 2007. COMMD1 promotes the ubiquitination of NF-kappaB subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *EMBO J* 26(2):436-47.
- Malek S, Huxford T, Ghosh G. 1998. Ikappa Balpha functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF-kappaB. *J Biol Chem* 273(39):25427-35.
- Marais A, Ji Z, Child ES, Krause E, Mann DJ, Sharrocks AD. 2010. Cell cycle-dependent regulation of the forkhead transcription factor FOXK2 by CDK.cyclin complexes. *J Biol Chem* 285(46):35728-39.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399(6733):271-5.
- McCarthy VA, Harris A. 2005. The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr Pulmonol* 40(1):1-8.
- McDonald RA, Matthews RP, Idzerda RL, McKnight GS. 1995. Basal expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene is dependent on protein kinase A activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16):7560-4.
- McNicholas CM, Nason MW, Jr., Guggino WB, Schwiebert EM, Hebert SC, Giebisch G, Egan ME. 1997. A functional CFTR-NBF1 is required for ROMK2-CFTR interaction. *Am J Physiol* 273(5 Pt 2):F843-8.
- Melhuish TA, Chung DD, Bjerke GA, Wotton D. 2010. Tgif1 represses apolipoprotein gene expression in liver. *J Cell Biochem* 111(2):380-90.
- Mennie ME, Gilfillan A, Compton M, Curtis L, Liston WA, Pullen I, Whyte DA, Brock DJ. 1992. Prenatal screening for cystic fibrosis. *Lancet* 340(8813):214-6.

- Menon S, Chi H, Zhang H, Deng XW, Flavell RA, Wei N. 2007. COP9 signalosome subunit 8 is essential for peripheral T cell homeostasis and antigen receptor-induced entry into the cell cycle from quiescence. *Nat Immunol* 8(11):1236-45.
- Mikus P, Zundel W. 2005. COPing with hypoxia. *Semin Cell Dev Biol* 16(4-5):462-73.
- Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Jr., Pavletich NP. 2002. Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296(5574):1886-9.
- Miranda M, Sorkin A. 2007. Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv* 7(3):157-67.
- Miyauchi Y, Kato M, Tokunaga F, Iwai K. 2008. The COP9/signalosome increases the efficiency of von Hippel-Lindau protein ubiquitin ligase-mediated hypoxia-inducible factor- α ubiquitination. *J Biol Chem* 283(24):16622-31.
- Miyayama T, Hiraoka D, Kawaji F, Nakamura E, Suzuki N, Ogra Y. 2010. Roles of COMM-domain-containing 1 in stability and recruitment of the copper-transporting ATPase in a mouse hepatoma cell line. *Biochem J* 429(1):53-61.
- Moran A, Becker D, Casella SJ, Gottlieb PA, Kirkman MS, Marshall BC, Slovis B. 2010. Epidemiology, pathophysiology, and prognostic implications of cystic fibrosis-related diabetes: a technical review. *Diabetes Care* 33(12):2677-83.
- Mouchel N, Broackes-Carter F, Harris A. 2003. Alternative 5' exons of the CFTR gene show developmental regulation. *Hum Mol Genet* 12(7):759-69.
- Mouchel N, Henstra SA, McCarthy VA, Williams SH, Phylactides M, Harris A. 2004. HNF1 α is involved in tissue-specific regulation of CFTR gene expression. *Biochem J* 378(Pt 3):909-18.
- Muhlebach MS, Reed W, Noah TL. 2004. Quantitative cytokine gene expression in CF airway. *Pediatr Pulmonol* 37(5):393-9.
- Muhlebach MS, Stewart PW, Leigh MW, Noah TL. 1999. Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med* 160(1):186-91.
- Mulivor RA, Cook D, Muller F, Boue A, Gilbert F, Mennuti M, Pergament E, Potier M, Nadler H, Punnett H and others. 1987. Analysis of fetal intestinal enzymes in amniotic fluid for the prenatal diagnosis of cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 40(2):131-46.
- Muller F, Simon-Bouy B, Girodon E, Monnier N, Malinge MC, Serre JL. 2002. Predicting the risk of cystic fibrosis with abnormal ultrasound signs of fetal bowel: results of a French molecular collaborative study based on 641 prospective cases. *Am J Med Genet* 110(2):109-15.
- Muller PA, van de Sluis B, Groot AJ, Verbeek D, Vonk WI, Maine GN, Burstein E, Wijmenga C, Vooijs M, Reits E and others. 2009. Nuclear-cytosolic transport of COMMD1 regulates NF- κ B and HIF-1 activity. *Traffic* 10(5):514-27.
- Munck A, Dhondt JL, Sahler C, Roussey M. 2008. Implementation of the French nationwide cystic fibrosis newborn screening program. *J Pediatr* 153(2):228-33, 233 e1.
- Munck A, Gerardin M, Alberti C, Ajzenman C, Lebourgeois M, Aigrain Y, Navarro J. 2006. Clinical outcome of cystic fibrosis presenting with or without meconium ileus: a matched cohort study. *J Pediatr Surg* 41(9):1556-60.
- Munck A, Roussey M. 2008. [The French nationwide cystic fibrosis newborn screening program: strategy and results]. *Arch Pediatr* 15 Suppl 1:S1-6.

N-O

- Nabetani A, Hatada I, Morisaki H, Oshimura M, Mukai T. 1997. Mouse U2af1-rs1 is a neomorphic imprinted gene. *Mol Cell Biol* 17(2):789-98.

- Nanua S, Sajjan U, Keshavjee S, Hershenson MB. 2006. Absence of typical unfolded protein response in primary cultured cystic fibrosis airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343(1):135-43.
- Narindrasorasak S, Kulkarni P, Deschamps P, She YM, Sarkar B. 2007. Characterization and copper binding properties of human COMMD1 (MURR1). *Biochemistry* 46(11):3116-28.
- Naumann M, Bech-Otschir D, Huang X, Ferrell K, Dubiel W. 1999. COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J Biol Chem* 274(50):35297-300.
- Nichols DP, Konstan MW, Chmiel JF. 2008. Anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis-related lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 35(3):135-53.
- Niel F, Martin J, Dastot-Le Moal F, Costes B, Boissier B, Delattre V, Goossens M, Girodon E. 2004. Rapid detection of CFTR gene rearrangements impacts on genetic counselling in cystic fibrosis. *J Med Genet* 41(11):e118.
- Nuthall HN, Moulin DS, Huxley C, Harris A. 1999. Analysis of DNase-I-hypersensitive sites at the 3' end of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR). *Biochem J* 341 (Pt 3):601-11.
- Oca F, Dreux S, Gerard B, Simon-Bouy B, de Becdelievre A, Ferec C, Girodon E, Muller F. 2009. Amniotic fluid digestive enzyme analysis is useful for identifying CFTR gene mutations of unclear significance. *Clin Chem* 55(12):2214-7.
- Oh W, Lee EW, Sung YH, Yang MR, Ghim J, Lee HW, Song J. 2006a. Jab1 induces the cytoplasmic localization and degradation of p53 in coordination with Hdm2. *J Biol Chem* 281(25):17457-65.
- Oh W, Yang MR, Lee EW, Park KM, Pyo S, Yang JS, Lee HW, Song J. 2006b. Jab1 mediates cytoplasmic localization and degradation of West Nile virus capsid protein. *J Biol Chem* 281(40):30166-74.
- Ohh M, Kim WY, Moslehi JJ, Chen Y, Chau V, Read MA, Kaelin WG, Jr. 2002. An intact NEDD8 pathway is required for Cullin-dependent ubiquitylation in mammalian cells. *EMBO Rep* 3(2):177-82.
- Opar A. 2011. Excitement mounts for first disease-modifying cystic fibrosis drugs. *Nat Rev Drug Discov* 10(7):479-80.
- Oppenheimer EA, Case AL, Esterly JR, Rothberg RM. 1970. Cervical mucus in cystic fibrosis: a possible cause of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 108:673-674.
- Oppenheimer EH, Esterly JR. 1969. Observations on cystic fibrosis of the pancreas. V. Developmental changes in the male genital system. *J Pediatr* 75(5):806-11.
- Orel L, Neumeier H, Hochrainer K, Binder BR, Schmid JA. 2009. Crosstalk between the NF-kappaB activating IKK-complex and the CSN signalosome. *J Cell Mol Med* 14(6B):1555-68.
- Osika E, Cavaillon JM, Chadelat K, Boule M, Fitting C, Tournier G, Clement A. 1999. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *Eur Respir J* 14(2):339-46.
- Ostedgaard LS, Meyerholz DK, Chen JH, Pezzulo AA, Karp PH, Rokhlina T, Ernst SE, Hanfland RA, Reznikov LR, Ludwig PS and others. 2011. The DeltaF508 mutation causes CFTR misprocessing and cystic fibrosis-like disease in pigs. *Sci Transl Med* 3(74):74ra24.
- Ott CJ, Blackledge NP, Leir SH, Harris A. 2009. Novel regulatory mechanisms for the CFTR gene. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 4):843-8.

P

- Pan ZQ, Kentsis A, Dias DC, Yamoah K, Wu K. 2004. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene* 23(11):1985-97.
- Panattoni M, Sanvito F, Basso V, Doglioni C, Casorati G, Montini E, Bender JR, Mondino A, Pardi R. 2008. Targeted inactivation of the COP9 signalosome impairs multiple stages of T cell development. *J Exp Med* 205(2):465-77.

- Parad RB, Comeau AM. 2005. Diagnostic dilemmas resulting from the immunoreactive trypsinogen/DNA cystic fibrosis newborn screening algorithm. *J Pediatr* 147(3 Suppl):S78-82.
- Parulekar SG. 1991. Sonography of normal fetal bowel. *J Ultrasound Med* 10(4):211-20.
- Pascual G, Glass CK. 2006. Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression. *Trends Endocrinol Metab* 17(8):321-7.
- Paul T, Li S, Khurana S, Leleiko NS, Walsh MJ. 2007. The epigenetic signature of CFTR expression is co-ordinated via chromatin acetylation through a complex intronic element. *Biochem J* 408(3):317-26.
- Penna L, Bower S. 2000. Hyperechogenic bowel in the second trimester fetus: a review. *Prenat Diagn* 20(11):909-13.
- Perez A, Issler AC, Cotton CU, Kelley TJ, Verkman AS, Davis PB. 2007. CFTR inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(2):L383-95.
- Perkett EA, Ornatowski W, Poschet JF, Deretic V. 2006. Chloroquine normalizes aberrant transforming growth factor beta activity in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Pediatr Pulmonol* 41(8):771-8.
- Peth A, Berndt C, Henke W, Dubiel W. 2007a. Downregulation of COP9 signalosome subunits differentially affects the CSN complex and target protein stability. *BMC Biochem* 8:27.
- Peth A, Boettcher JP, Dubiel W. 2007b. Ubiquitin-dependent proteolysis of the microtubule end-binding protein 1, EB1, is controlled by the COP9 signalosome: possible consequences for microtubule filament stability. *J Mol Biol* 368(2):550-63.
- Petroski MD, Deshaies RJ. 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1):9-20.
- Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, Ross BM, Kaplan JH, Gilliam TC. 1994. Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Hum Mol Genet* 3(9):1647-56.
- Phylactides M, Rowntree R, Nuthall H, Ussery D, Wheeler A, Harris A. 2002. Evaluation of potential regulatory elements identified as DNase I hypersensitive sites in the CFTR gene. *Eur J Biochem* 269(2):553-9.
- Pierucci-Alves F, Akoyev V, Stewart JC, 3rd, Wang LH, Janardhan KS, Schultz BD. 2011. Swine models of cystic fibrosis reveal male reproductive tract phenotype at birth. *Biol Reprod* 85(3):442-51.
- Pitt TL, MacDougall J, Penketh AR, Cooke EM. 1986. Polyagglutinating and non-typable strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 21(2):179-86.
- Pittman N, Shue G, Leleiko NS, Walsh MJ. 1995. Transcription of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator requires a CCAAT-like element for both basal and cAMP-mediated regulation. *J Biol Chem* 270(48):28848-57.
- Potthoff MJ, Olson EN. 2007. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 134(23):4131-40.
- Proud D, Leigh R. 2011. Epithelial cells and airway diseases. *Immunol Rev* 242(1):186-204.
- Pruliere-Escabasse V, Fanen P, Dazy AC, Lechapt-Zalcman E, Rideau D, Edelman A, Escudier E, Coste A. 2005. TGF-beta 1 downregulates CFTR expression and function in nasal polyps of non-CF patients. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288(1):L77-83.
- Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353(6345):670-4.

Q-R

- Qu BH, Strickland E, Thomas PJ. 1997. Cystic fibrosis: a disease of altered protein folding. *J Bioenerg Biomembr* 29(5):483-90.

- Rab A, Bartoszewski R, Jurkuvenaite A, Wakefield J, Collawn JF, Bebok Z. 2007. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response regulate genomic cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(2):C756-66.
- Radpour R, Gourabi H, Dizaj AV, Holzgreve W, Zhong XY. 2008. Genetic investigations of CFTR mutations in congenital absence of vas deferens, uterus, and vagina as a cause of infertility. *J Androl* 29(5):506-13.
- Ratjen F, Doring G. 2003. Cystic fibrosis. *Lancet* 361(9358):681-9.
- Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A. 2000. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* 14(1):34-44.
- Registre. 2007. Registre Français de la Mucoviscidose, Bilan des données 2007.
- Rene C, Taulan M, Iral F, Doudement J, L'Honore A, Gerbon C, Demaille J, Claustres M, Romey MC. 2005. Binding of serum response factor to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator CARG-like elements, as a new potential CFTR transcriptional regulation pathway. *Nucleic Acids Res* 33(16):5271-90.
- Riordan JR. 2008. CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* 77:701-26.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL and others. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245(4922):1066-73.
- Robertson JM, Friedman EM, Rubin BK. 2008. Nasal and sinus disease in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* 9(3):213-9.
- Rochholz EL. 1857. Alemannisches Kinderlied und Kinderspiel aus der Schweiz Gesammelt. J. J. Weber.
- Rochwerger L, Buchwald M. 1993. Stimulation of the cystic fibrosis transmembrane regulator expression by estrogen in vivo. *Endocrinology* 133(2):921-30.
- Rochwerger L, Dho S, Parker L, Foskett JK, Buchwald M. 1994. Estrogen-dependent expression of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in a novel uterine epithelial cell line. *J Cell Sci* 107 (Pt 9):2439-48.
- Roger T, Out T, Mukaida N, Matsushima K, Jansen H, Lutter R. 1998. Enhanced AP-1 and NF-kappaB activities and stability of interleukin 8 (IL-8) transcripts are implicated in IL-8 mRNA superinduction in lung epithelial H292 cells. *Biochem J* 330 (Pt 1):429-35.
- Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Ostedgaard LS, Rokhlina T, Taft PJ, Rogan MP, Pezzulo AA, Karp PH, Itani OA and others. 2008. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* 321(5897):1837-41.
- Romey MC, Guittard C, Carles S, Demaille J, Claustres M, Ramsay M. 1999. First putative sequence alterations in the minimal CFTR promoter region. *J Med Genet* 36(3):263-4.
- Romey MC, Pallares-Ruiz N, Mange A, Mettling C, Peytavi R, Demaille J, Claustres M. 2000. A naturally occurring sequence variation that creates a YY1 element is associated with increased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression. *J Biol Chem* 275(5):3561-7.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N and others. 1989a. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245(4922):1059-65.
- Rommens JM, Zengerling-Lentes S, Kerem B, Melmer G, Buchwald M, Tsui LC. 1989b. Physical localization of two DNA markers closely linked to the cystic fibrosis locus by pulsed-field gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 45(6):932-41.
- Rosenfeld M, Gibson RL, McNamara S, Emerson J, Burns JL, Castile R, Hiatt P, McCoy K, Wilson CB, Inglis A and others. 2001. Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 32(5):356-66.
- Rosenstein BJ, Cutting GR. 1998. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr* 132(4):589-95.

- Rota M, Nguyen-Khoa T, Marchand M, Feldmann D, Dumont J, Khalfon D, Vassault A, Borgard JP. 2008. [Sweat testing: review of technical requirements]. *Ann Biol Clin (Paris)* 66(2):221-7.
- Rottner M, Freyssinet JM, Martinez MC. 2009. Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir Res* 10:23.
- Rowntree RK, Harris A. 2003. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 67(Pt 5):471-85.
- Rowntree RK, Vassaux G, McDowell TL, Howe S, McGuigan A, Phylactides M, Huxley C, Harris A. 2001. An element in intron 1 of the CFTR gene augments intestinal expression in vivo. *Hum Mol Genet* 10(14):1455-64.
- Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, Rottapel R, Yamaoka S, Lu KP. 2003. Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* 12(6):1413-26.

S

- Saad F, Hotte S, North S, Eigl B, Chi K, Czaykowski P, Wood L, Pollak M, Berry S, Lattouf JB and others. 2011. Randomized Phase II Trial of Custirsen (OGX-011) in Combination with Docetaxel or Mitoxantrone as Second-line Therapy in Patients with Metastatic Castrate-Resistant Prostate Cancer Progressing after First-line Docetaxel: CUOG Trial P-06c. *Clin Cancer Res* 17(17):5765-5773.
- Saccani S, Marazzi I, Beg AA, Natoli G. 2004. Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response. *J Exp Med* 200(1):107-13.
- Sakamoto K, Maeda S. 2010. Targeting NF-kappaB for colorectal cancer. *Expert Opin Ther Targets* 14(6):593-601.
- Scheel H, Hofmann K. 2005. Prediction of a common structural scaffold for proteasome lid, COP9-signalosome and eIF3 complexes. *BMC Bioinformatics* 6:71.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30(12):e57.
- Schwechheimer C. 2004. The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3):45-54.
- Schwechheimer C, Deng XW. 2001. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol* 11(10):420-6.
- Schwechheimer C, Serino G, Callis J, Crosby WL, Lyapina S, Deshaies RJ, Gray WM, Estelle M, Deng XW. 2001. Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* 292(5520):1379-82.
- Schweitzer K, Bozko PM, Dubiel W, Naumann M. 2007. CSN controls NF-kappaB by deubiquitinylation of I-kappaBalpha. *Embo J* 26(6):1532-41.
- Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME, Guggino WB. 1998. Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(5):2674-9.
- Scotet V, De Braekeleer M, Audrezet MP, Quere I, Mercier B, Dugueperoux I, Andrieux J, Blayau M, Ferec C. 2002. Prenatal detection of cystic fibrosis by ultrasonography: a retrospective study of more than 346 000 pregnancies. *J Med Genet* 39(6):443-8.
- Scotet V, Dugueperoux I, Audrezet MP, Audebert-Bellanger S, Muller M, Blayau M, Ferec C. 2010. Focus on cystic fibrosis and other disorders evidenced in fetuses with sonographic finding of echogenic bowel: 16-year report from Brittany, France. *Am J Obstet Gynecol* 203(6):592 e1-6.
- Sebkova L, Pellicano A, Monteleone G, Grazioli B, Guarnieri G, Imeneo M, Pallone F, Lizza F. 2004. Extracellular signal-regulated protein kinase mediates interleukin 17 (IL-17)-induced IL-8 secretion in *Helicobacter pylori*-infected human gastric epithelial cells. *Infect Immun* 72(9):5019-26.

- Seeger M, Kraft R, Ferrell K, Bech-Otschir D, Dumdey R, Schade R, Gordon C, Naumann M, Dubiel W. 1998. A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J* 12(6):469-78.
- Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, Roussel D, Fritsch J, Hanssens L, Hirawat S and others. 2010a. 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* 182(10):1262-72.
- Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Sands D, Stremmler N, Vavrova V, Deneuille E, Reix P, Bui S, Huet F, Lebourgeois M and others. 2010b. Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport. *Am J Respir Crit Care Med* 182(7):929-36.
- Sermet-Gaudelus I, Munck A, Rota M, Roussey M, Feldmann D, Nguyen-Khoa T. 2010c. [French guidelines for sweat test practice and interpretation for cystic fibrosis neonatal screening]. *Arch Pediatr* 17(9):1349-58.
- Shackelford TJ, Claret FX. JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer. *Cell Div* 5:26.
- Shackelford TJ, Claret FX. 2010. JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer. *Cell Div* 5:26.
- Sharon M, Mao H, Boeri Erba E, Stephens E, Zheng N, Robinson CV. 2009. Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality. *Structure* 17(1):31-40.
- Shaulian E, Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4(5):E131-6.
- Shi PP, Cao XR, Sweezer EM, Kinney TS, Williams NR, Husted RF, Nair R, Weiss RM, Williamson RA, Sigmund CD and others. 2008. Salt-sensitive hypertension and cardiac hypertrophy in mice deficient in the ubiquitin ligase Nedd4-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 295(2):F462-70.
- Simon-Bouy B, Satre V, Ferec C, Malinge MC, Girodon E, Denamur E, Leporrier N, Lewin P, Forestier F, Muller F. 2003. Hyperechogenic fetal bowel: a large French collaborative study of 682 cases. *Am J Med Genet A* 121A(3):209-13.
- Singh H, Sen R, Baltimore D, Sharp PA. 1986. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. *Nature* 319(6049):154-8.
- Sitia R, Braakman I. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426(6968):891-4.
- Smeal T, Binetruy B, Mercola DA, Birrer M, Karin M. 1991. Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73. *Nature* 354(6353):494-6.
- Smith AN, Barth ML, McDowell TL, Moulin DS, Nuthall HN, Hollingsworth MA, Harris A. 1996. A regulatory element in intron 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem* 271(17):9947-54.
- Smith AN, Wardle CJ, Harris A. 1995. Characterization of DNASE I hypersensitive sites in the 120kb 5' to the CFTR gene. *Biochem Biophys Res Commun* 211(1):274-81.
- Smith DJ, Nuthall HN, Majetti ME, Harris A. 2000. Multiple potential intragenic regulatory elements in the CFTR gene. *Genomics* 64(1):90-6.
- Snyder PM, Olson DR, McDonald FJ, Bucher DB. 2001. Multiple WW domains, but not the C2 domain, are required for inhibition of the epithelial Na⁺ channel by human Nedd4. *J Biol Chem* 276(30):28321-6.
- Solban N, Jia HP, Richard S, Tremblay S, Devlin AM, Peng J, Gossard F, Guo DF, Morel G, Hamet P and others. 2000. HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J Biol Chem* 275(41):32234-43.
- Sommerhalter M, Zhang Y, Rosenzweig AC. 2007. Solution structure of the COMMD1 N-terminal domain. *J Mol Biol* 365(3):715-21.
- Sosnay PR, Castellani C, Corey M, Dorfman R, Zielenski J, Karchin R, Penland CM, Cutting GR. 2011. Evaluation of the disease liability of CFTR variants. *Methods Mol Biol* 742:355-72.
- Southern KW. 2007. Cystic fibrosis and formes frustes of CFTR-related disease. *Respiration* 74(3):241-51.

- Stockley RA. 1999. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med* 160(5 Pt 2):S49-52.
- Stoltz DA, Meyerholz DK, Pezzulo AA, Ramachandran S, Rogan MP, Davis GJ, Hanfland RA, Wohlford-Lenane C, Dohrn CL, Bartlett JA and others. 2010. Cystic fibrosis pigs develop lung disease and exhibit defective bacterial eradication at birth. *Sci Transl Med* 2(29):29ra31.
- Sturgess J, Imrie J. 1982. Quantitative evaluation of the development of tracheal submucosal glands in infants with cystic fibrosis and control infants. *Am J Pathol* 106(3):303-11.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G and others. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16):6062-7.
- Sun X, Sui H, Fisher JT, Yan Z, Liu X, Cho HJ, Joo NS, Zhang Y, Zhou W, Yi Y and others. 2010. Disease phenotype of a ferret CFTR-knockout model of cystic fibrosis. *J Clin Invest* 120(9):3149-60.
- Sun Y, Wilson MP, Majerus PW. 2002. Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1. *J Biol Chem* 277(48):45759-64.
- Super M, Schwarz MJ, Malone G, Roberts T, Haworth A, Dermody G. 1994. Active cascade testing for carriers of cystic fibrosis gene. *BMJ* 308(6942):1462-7.
- Suyang H, Phillips R, Douglas I, Ghosh S. 1996. Role of unphosphorylated, newly synthesized I kappa B beta in persistent activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 16(10):5444-9.

T

- Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Jacquot J. 1999. Genistein inhibits constitutive and inducible NFkappaB activation and decreases IL-8 production by human cystic fibrosis bronchial gland cells. *Am J Pathol* 155(2):473-81.
- Tabary O, Escotte S, Couetil JP, Hubert D, Dusser D, Puchelle E, Jacquot J. 2001. Relationship between IkappaBalpha deficiency, NFkappaB activity and interleukin-8 production in CF human airway epithelial cells. *Pflugers Arch* 443 Suppl 1:S40-4.
- Tabary O, Muselet C, Escotte S, Antonicelli F, Hubert D, Dusser D, Jacquot J. 2003. Interleukin-10 inhibits elevated chemokine interleukin-8 and regulated on activation normal T cell expressed and secreted production in cystic fibrosis bronchial epithelial cells by targeting the I(k)B kinase alpha/beta complex. *Am J Pathol* 162(1):293-302.
- Tabary O, Zahm JM, Hinnrasky J, Couetil JP, Cornillet P, Guenounou M, Gaillard D, Puchelle E, Jacquot J. 1998. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 153(3):921-30.
- Tan NY, Khachigian LM. 2009. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. *Mol Cell Biol* 29(10):2483-8.
- Tanaka T, Grusby MJ, Kaisho T. 2007. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. *Nat Immunol* 8(6):584-91.
- Tanguy G, Drevillon L, Arous N, Hasnain A, Hinzpeter A, Fritsch J, Goossens M, Fanen P. 2008. CSN5 binds to misfolded CFTR and promotes its degradation. *Biochim Biophys Acta* 1783(6):1189-99.
- Tao TY, Liu F, Klomp L, Wijmenga C, Gitlin JD. 2003. The copper toxicosis gene product Murr1 directly interacts with the Wilson disease protein. *J Biol Chem* 278(43):41593-6.
- Taulan M, Girardet A, Guittard C, Altieri JP, Templin C, Beroud C, des Georges M, Claustres M. 2007a. Large genomic rearrangements in the CFTR gene contribute to CBAVD. *BMC Med Genet* 8:22.
- Taulan M, Lopez E, Guittard C, Rene C, Baux D, Altieri JP, DesGeorges M, Claustres M, Romey MC. 2007b. First functional polymorphism in CFTR promoter that results in decreased transcriptional activity and Sp1/USF binding. *Biochem Biophys Res Commun* 361(3):775-81.

- Thauvin-Robinet C, Munck A, Huet F, Genin E, Bellis G, Gautier E, Audrezet MP, Ferec C, Lalau G, Georges MD and others. 2009. The very low penetrance of cystic fibrosis for the R117H mutation: a reappraisal for genetic counselling and newborn screening. *J Med Genet* 46(11):752-8.
- Thoms HC, Loveridge CJ, Simpson J, Clipson A, Reinhardt K, Dunlop MG, Stark LA. 2010. Nucleolar targeting of RelA(p65) is regulated by COMMD1-dependent ubiquitination. *Cancer Res* 70(1):139-49.
- Tirouvanziam R, Khazaal I, Peault B. 2002. Primary inflammation in human cystic fibrosis small airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(2):L445-51.
- Tomoda K, Kato JY, Tatsumi E, Takahashi T, Matsuo Y, Yoneda-Kato N. 2005. The Jab1/COP9 signalosome subcomplex is a downstream mediator of Bcr-Abl kinase activity and facilitates cell-cycle progression. *Blood* 105(2):775-83.
- Tomoda K, Kubota Y, Arata Y, Mori S, Maeda M, Tanaka T, Yoshida M, Yoneda-Kato N, Kato JY. 2002. The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem* 277(3):2302-10.
- Tomoda K, Kubota Y, Kato J. 1999. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* 398(6723):160-5.
- Tomoda K, Yoneda-Kato N, Fukumoto A, Yamanaka S, Kato JY. 2004. Multiple functions of Jab1 are required for early embryonic development and growth potential in mice. *J Biol Chem* 279(41):43013-8.
- Trapnell BC, Zeitlin PL, Chu CS, Yoshimura K, Nakamura H, Guggino WB, Bargon J, Banks TC, Dalemans W, Pavirani A and others. 1991. Down-regulation of cystic fibrosis gene mRNA transcript levels and induction of the cystic fibrosis chloride secretory phenotype in epithelial cells by phorbol ester. *J Biol Chem* 266(16):10319-23.
- Treize AE, Chambers JA, Wardle CJ, Gould S, Harris A. 1993. Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. *Hum Mol Genet* 2(3):213-8.
- Turjanski AG, Vaque JP, Gutkind JS. 2007. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26(22):3240-53.

U-V

- Uhle S, Medalia O, Waldron R, Dumdey R, Henklein P, Bech-Otschir D, Huang X, Berse M, Sperling J, Schade R and others. 2003. Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *Embo J* 22(6):1302-12.
- Ullah Z, Buckley MS, Arnosti DN, Henry RW. 2007. Retinoblastoma protein regulation by the COP9 signalosome. *Mol Biol Cell* 18(4):1179-86.
- van Dam H, Castellazzi M. 2001. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20(19):2453-64.
- van de Sluis B, Groot AJ, Vermeulen J, van der Wall E, van Diest PJ, Wijnenga C, Klomp LW, Vooijs M. 2009. COMMD1 Promotes pVHL and O2-Independent Proteolysis of HIF-1alpha via HSP90/70. *PLoS One* 4(10):e7332.
- van de Sluis B, Mao X, Zhai Y, Groot AJ, Vermeulen JF, van der Wall E, van Diest PJ, Hofker MH, Wijnenga C, Klomp LW and others. 2010. COMMD1 disrupts HIF-1alpha/beta dimerization and inhibits human tumor cell invasion. *J Clin Invest* 120(6):2119-30.
- van de Sluis B, Muller P, Duran K, Chen A, Groot AJ, Klomp LW, Liu PP, Wijnenga C. 2007. Increased activity of hypoxia-inducible factor 1 is associated with early embryonic lethality in Commd1 null mice. *Mol Cell Biol* 27(11):4142-56.
- van De Sluis B, Rothuizen J, Pearson PL, van Oost BA, Wijnenga C. 2002. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Hum Mol Genet* 11(2):165-73.

- Venkatakrishnan A, Stecenko AA, King G, Blackwell TR, Brigham KL, Christman JW, Blackwell TS. 2000. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23(3):396-403.
- Verhaeghe C, Delbecq K, de Leval L, Oury C, Bours V. 2007a. Early inflammation in the airways of a cystic fibrosis foetus. *J Cyst Fibros* 6(4):304-8.
- Verhaeghe C, Remouchamps C, Hennuy B, Vanderplasschen A, Chariot A, Tabruyn SP, Oury C, Bours V. 2007b. Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways. *Biochem Pharmacol* 73(12):1982-94.
- Vij N, Mazur S, Zeitlin PL. 2009. CFTR is a negative regulator of NFkappaB mediated innate immune response. *PLoS One* 4(2):e4664.
- Vincoff NS, Callen PW, Smith-Bindman R, Goldstein RB. 1999. Effect of ultrasound transducer frequency on the appearance of the fetal bowel. *J Ultrasound Med* 18(12):799-803; quiz 805-6.

W

- Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Voilley N, Lazdunski M. 1995. Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na⁺ channel. *J Biol Chem* 270(46):27411-4.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. 1982. 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* 1(8):945-51.
- Wan M, Cao X, Wu Y, Bai S, Wu L, Shi X, Wang N. 2002. Jab1 antagonizes TGF-beta signaling by inducing Smad4 degradation. *EMBO Rep* 3(2):171-6.
- Wang J, Li C, Liu Y, Mei W, Yu S, Liu C, Zhang L, Cao X, Kimberly RP, Grizzle W and others. 2006. JAB1 determines the response of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* 169(3):889-902.
- Weber AJ, Soong G, Bryan R, Saba S, Prince A. 2001. Activation of NF-kappaB in airway epithelial cells is dependent on CFTR trafficking and Cl⁻ channel function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(1):L71-8.
- Wee S, Geyer RK, Toda T, Wolf DA. 2005. CSN facilitates Cullin-RING ubiquitin ligase function by counteracting autocatalytic adapter instability. *Nat Cell Biol* 7(4):387-91.
- Wei N, Deng XW. 1992. COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in arabidopsis. *Plant Cell* 4(12):1507-18.
- Wei N, Deng XW. 1999. Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from Arabidopsis to human. *Trends Genet* 15(3):98-103.
- Wei N, Deng XW. 2003. The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:261-86.
- Wei N, Serino G, Deng XW. 2008. The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci* 33(12):592-600.
- Wei N, Tsuge T, Serino G, Dohmae N, Takio K, Matsui M, Deng XW. 1998. The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Curr Biol* 8(16):919-22.
- Weil R, Israel A. 2006. Deciphering the pathway from the TCR to NF-kappaB. *Cell Death Differ* 13(5):826-33.
- Weiss KH, Merle U, Schaefer M, Ferenci P, Fullekrug J, Stremmel W. 2006. Copper toxicosis gene MURR1 is not changed in Wilson disease patients with normal blood ceruloplasmin levels. *World J Gastroenterol* 12(14):2239-42.
- Welsh MJ, Rogers CS, Stoltz DA, Meyerholz DK, Prather RS. 2009. Development of a porcine model of cystic fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 120:149-62.
- Welsh MJ, Smith AE. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73(7):1251-4.

- White NL, Higgins CF, Trezise AE. 1998. Tissue-specific in vivo transcription start sites of the human and murine cystic fibrosis genes. *Hum Mol Genet* 7(3):363-9.
- WHO. 2000. Classification of cystic fibrosis and related disorders. Report of a joint WHO/ICF(M)A/ECFTN meeting 1(1):5-8.
- Wietek C, O'Neill LA. 2007. Diversity and regulation in the NF-kappaB system. *Trends Biochem Sci* 32(7):311-9.
- Willems AR, Schwab M, Tyers M. 2004. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3):133-70.
- Wilson MP, Sun Y, Cao L, Majerus PW. 2001. Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase is a protein kinase that phosphorylates the transcription factors c-Jun and ATF-2. *J Biol Chem* 276(44):40998-1004.
- Wiszniewski L, Jornot L, Dudez T, Pagano A, Rochat T, Lacroix JS, Suter S, Chanson M. 2006. Long-term cultures of polarized airway epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34(1):39-48.
- Witt H. 2011. New modifier loci in cystic fibrosis. *Nat Genet* 43(6):508-9.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 49(6 Pt 1):853-60.
- Wolf DA, Zhou C, Wee S. 2003. The COP9 signalosome: an assembly and maintenance platform for cullin ubiquitin ligases? *Nat Cell Biol* 5(12):1029-33.
- Wu JT, Chan YR, Chien CT. 2006a. Protection of cullin-RING E3 ligases by CSN-UBP12. *Trends Cell Biol* 16(7):362-9.
- Wu ZY, Zhao GX, Chen WJ, Wang N, Wan B, Lin MT, Murong SX, Yu L. 2006b. Mutation analysis of 218 Chinese patients with Wilson disease revealed no correlation between the canine copper toxicosis gene MURR1 and Wilson disease. *J Mol Med (Berl)* 84(5):438-42.
- Wulff P, Vallon V, Huang DY, Volkl H, Yu F, Richter K, Jansen M, Schlunz M, Klingel K, Loffing J and others. 2002. Impaired renal Na(+) retention in the sgk1-knockout mouse. *J Clin Invest* 110(9):1263-8.

Y-Z

- Yamamoto Y, Gaynor RB. 2004. I-kappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 29(2):72-9.
- Yoo D, Flagg TP, Olsen O, Raghuram V, Foskett JK, Welling PA. 2004. Assembly and trafficking of a multiprotein ROMK (Kir 1.1) channel complex by PDZ interactions. *J Biol Chem* 279(8):6863-73.
- Yoshimura H, Nakahama K, Safronova O, Tanaka N, Muneta T, Morita I. 2006. Transforming growth factor-beta stimulates IL-1beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human synovial cells via the ERK/AP-1 pathway. *Inflamm Res* 55(12):543-9.
- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. 1991. The cystic fibrosis gene has a "housekeeping"-type promoter and is expressed at low levels in cells of epithelial origin. *J Biol Chem* 266(14):9140-4.
- Yue G, Malik B, Eaton DC. 2002. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) stimulates epithelial sodium channel activity in A6 cells. *J Biol Chem* 277(14):11965-9.
- Zahm JM, Gaillard D, Dupuit F, Hinnrasky J, Porteous D, Dorin JR, Puchelle E. 1997. Early alterations in airway mucociliary clearance and inflammation of the lamina propria in CF mice. *Am J Physiol* 272(3 Pt 1):C853-9.
- Zeitlin PL, Lu L, Rhim J, Cutting G, Stetten G, Kieffer KA, Craig R, Guggino WB. 1991. A cystic fibrosis bronchial epithelial cell line: immortalization by adeno-12-SV40 infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4(4):313-9.
- Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. 2006. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124(3):587-99.

Zheng W, Kuhlicke J, Jackel K, Eltzhig HK, Singh A, Sjoblom M, Riederer B, Weinhold C, Seidler U, Colgan SP and others. 2009. Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)-mediated repression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the intestinal epithelium. *FASEB J* 23(1):204-13.

Zhou C, Arslan F, Wee S, Krishnan S, Ivanov AR, Oliva A, Leatherwood J, Wolf DA. 2005. PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes. *BMC Biol* 3:14.

Zhou C, Wee S, Rhee E, Naumann M, Dubiel W, Wolf DA. 2003. Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p. *Mol Cell* 11(4):927-38.

Zhou Z, Wang X, Liu HY, Zou X, Li M, Hwang TC. 2006. The two ATP binding sites of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) play distinct roles in gating kinetics and energetics. *J Gen Physiol* 128(4):413-22.

Zoubeidi A, Ettinger S, Beraldi E, Hadaschik B, Zardan A, Klomp LW, Nelson CC, Rennie PS, Gleave ME. 2010. Clusterin facilitates COMMD1 and I-kappaB degradation to enhance NF-kappaB activity in prostate cancer cells. *Mol Cancer Res* 8(1):119-30.